



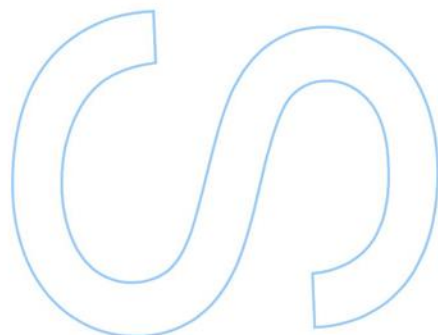
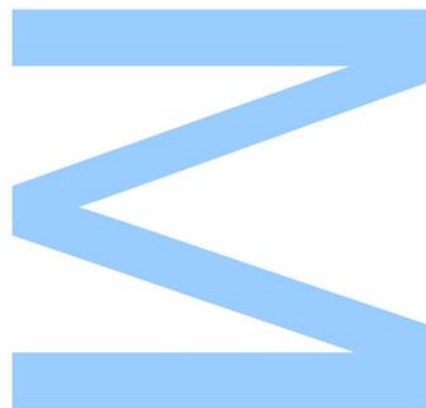
# Estudo do impacto dos fatores abióticos no processo de invasão: o caso das populações de *Artemia parthenogenetica* das salinas de Aveiro e Rio Maior

Filipa João de Sousa

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água  
Departamento de Biologia  
2013

## Orientador

Maria da Natividade Ribeiro Vieira  
Professora Associada com Agregação  
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto



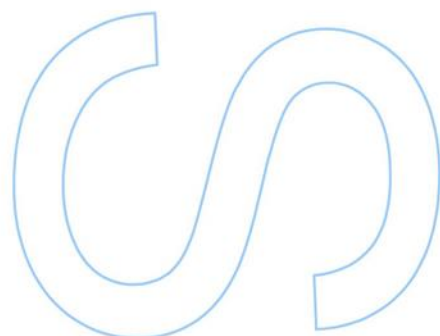
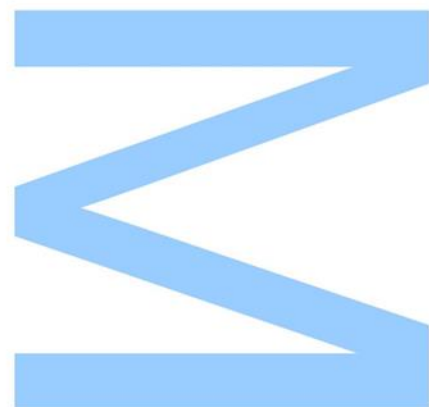




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_





**Ao Miguel, aos meus pais e irmã**

**“POIS QUANDO SOU FRACO, ENTÃO É QUE SOU FORTE.”**

**2COR 12, 10**



## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação encerra mais um período na minha vida, é o culminar de mais um ciclo que marca o início de um novo. Os últimos anos foram marcados por momentos bons e por momentos maus, por pessoas que me apoiaram e por pessoas que, da pior maneira, me deram força. Mas todos eles são um bocadinho de mim, da minha vida e desta dissertação. É hora de vos agradecer!

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Dr.<sup>a</sup> Maria da Natividade Vieira, minha orientadora desde o término da minha licenciatura. Foram alguns anos de partilhas, de experiências novas, de perspetivas e sonhos e de esperança no futuro. Por tudo isto e pelo apoio, muito obrigada.

Esta aventura começou com o meu estágio de final de licenciatura, por isso não me esqueço daqueles que me encorajaram desde então. O meu sincero agradecimento aos Professores Drs. António Paulo Carvalho e Nuno Formigo, pelo apoio, pela ajuda e pelas conversas que fomos tendo ao longo destes anos.

À equipa BOGA, pelo carinho com que sempre me tratou, por toda a ajuda e colaboração e, sobretudo, por me fazerem sentir sempre em casa, obrigada.

Não posso deixar de agradecer também à Dr.<sup>a</sup> Ana Bio, pela importante ajuda no tratamento estatístico dos dados aqui apresentados.

Quero agradecer às “pedras no caminho”, sem elas o fruto deste trabalho não teria sido o mesmo e o sabor seria bem diferente.

Esta dissertação não é só minha, é de todos aqueles que fazem parte de mim, que lidam comigo e me aturam. A todos vocês devo o meu carinho e profundo agradecimento.

Ao Jota, amigo sempre presente, pelas longas conversas, pelo apoio e pela força que sempre me deste para ir em frente.

À Joana, pelo teu apoio incondicional. Às vezes um olhar vale mais do que mil palavras.

Por último, mas sempre em primeiro, aos meus pilares.

Às minhas famílias.

À minha irmã porque, apesar das poucas palavras, sei que sempre tive o teu apoio.

Ao meu pai, pelo gene sonhador que me transmitiu. Eu sei que as desilusões aumentam quando se sonha tanto, mas sou incapaz de deixar de sonhar!

À minha mãe, que me ensinou que o que não nos mata torna-nos mais fortes. Sem ti, não tinha chegado até aqui!

Ao Miguel, o meu companheiro de todas as horas. Esta dissertação é tão minha quanto tua. Foste o meu apoio todos os dias, caminhamos juntos e juntos chegamos até aqui. Nada teria feito o mesmo sentido sem ti!

A todos vós, dedico este trabalho!





## RESUMO

Contrariamente ao que se pensava antigamente, está comprovado que, atualmente, os ecossistemas aquáticos são os sistemas mais vulneráveis e propícios à ocorrência de invasões biológicas. De facto, alguns destes ecossistemas, como os ecossistemas hipersalinos, têm sido alterados, em termos de salinidade e dinâmica hidrológica, e estão sujeitos a uma grande pressão de espécies invasoras. É o caso do género *Artemia*, um crustáceo que habita salinas e lagos salgados, cuja taxa de dispersão mediada pelo Homem, é 50.000 vezes superior à sua taxa de dispersão natural. A presença destas espécies invasoras pode permanecer oculta durante várias décadas, devido às semelhanças morfológicas entre diferentes espécies, sendo necessário, muitas vezes, recorrer-se a métodos moleculares para as identificar.

No caso de Portugal, há apenas duas salinas onde ainda não ocorreu o processo de invasão, a salina da Troncalhada (Aveiro) e a salina de Rio Maior. O objetivo deste trabalho foi compreender melhor a tolerância destas duas populações de *A. parthenogenetica* à variação de alguns fatores ambientais, para avaliar a sua suscetibilidade à invasão.

Foram testadas várias concentrações de salinidade (70, 110 e 150ppt), temperatura (24, 29 e 34°C) e alimento (300000, 150000, 37500 cél mL<sup>-1</sup>) e diferentes fotoperíodos (0, 12 e 24h de luz) e foram monitorizados vários parâmetros reprodutivos.

*Artemia parthenogenetica* de Aveiro mostrou grande susceptibilidade à invasão, ao contrário da população de Rio Maior, que se encontra bem adaptada às condições de 24 °C, 150 ppt e 37 500 células mL<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** Invasões biológicas, *Artemia*, parâmetros demográficos, parâmetros reprodutivos



## ABSTRACT

Unlike it was thought in the past, it is proven that aquatic ecosystems are more vulnerable and favorable to the occurrence of biological invasions. In fact, some of these ecosystems, like the hypersaline ecosystems, have been changed, in terms of salinity and hydrological dynamics, and are subjected to great pressure from invasive species. This is the case of the genus *Artemia*, a crustacean that inhabits salterns and salty lakes, whose dispersion mediated by man is 50,000 times greater than its natural rate of dispersion. The presence of this invasive species may remain unnoticed several decades before being found, being necessary molecular methods to identify them.

In Portugal there are only two salterns where these invasions haven't already happened: the salterns from Troncalhada (Aveiro) and Rio Maior. The aim of this study was to understand the better tolerance to the variation of some environmental factors of these *Artemia parthenogenetica* populations, in order to assess their susceptibility to invasion.

Various concentrations of salinity (70, 110, 150ppt), temperature (24, 29 and 34°C) and food (300000, 150000, 37500 cells ml<sup>-1</sup>) and photoperiod (0, 12 and 24 hours of light) were tested and various reproductive parameters were monitored. *Artemia parthenogenetica* from Aveiro showed to be susceptible to invasion, unlike the population from Rio Maior, which is well adapted to conditions of 24°C, 150 ppt and 37500 cells ml<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Biological invasions, *Artemia*, demographic parameters, reproductive parameters



# ÍNDICE

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introdução Geral .....                                                                                                                                                                      | 3  |
| 1. <i>Artemia</i> .....                                                                                                                                                                     | 3  |
| 1.1. Taxonomia e biogeografia do género <i>Artemia</i> .....                                                                                                                                | 3  |
| 1.2. Biologia de <i>Artemia</i> .....                                                                                                                                                       | 5  |
| 1.3. Ecologia do género <i>Artemia</i> .....                                                                                                                                                | 8  |
| 1.4. Principal problemática do género <i>Artemia</i> no Mediterrâneo.....                                                                                                                   | 10 |
| 2. Enquadramento do tema e objetivos do trabalho.....                                                                                                                                       | 11 |
| Capítulo 1. ....                                                                                                                                                                            | 15 |
| Environmental factors as a barrier to invasion and a tool to characterize demographic parameters and life history traits of <i>Artemia parthenogenetica</i> from Rio Maior (Portugal) ..... | 17 |
| Capítulo 2. ....                                                                                                                                                                            | 43 |
| Influência de fatores abióticos na reprodução de <i>Artemia franciscana</i> e <i>Artemia parthenogenetica</i> de Aveiro.....                                                                | 43 |
| 2.1. Material e Métodos.....                                                                                                                                                                | 45 |
| 2.1.1. Amostragem .....                                                                                                                                                                     | 45 |
| 2.1.2. Manutenção de <i>Artemia</i> em laboratório .....                                                                                                                                    | 45 |
| 2.1.3. Montagem experimental .....                                                                                                                                                          | 46 |
| 2.1.4. Parâmetros reprodutivos e períodos de vida.....                                                                                                                                      | 48 |
| 2.1.5. Parâmetros demográficos .....                                                                                                                                                        | 48 |
| 2.1.6. Análise estatística.....                                                                                                                                                             | 49 |
| 2.2. Resultados .....                                                                                                                                                                       | 50 |
| 2.2.1. Características do ciclo de vida.....                                                                                                                                                | 50 |
| 2.2.2. Parâmetros Reprodutivos .....                                                                                                                                                        | 53 |
| 2.2.3. Parâmetros Demográficos .....                                                                                                                                                        | 61 |
| Discussão Geral .....                                                                                                                                                                       | 71 |
| Conclusões Gerais .....                                                                                                                                                                     | 79 |
| Bibliografia.....                                                                                                                                                                           | 85 |
| Anexos .....                                                                                                                                                                                | 95 |
| Anexo I - Resultados obtidos na análise estatística em R .....                                                                                                                              | 95 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>Artemia</i> (adaptado de Garcia, 2009).....                                                                                                                                                                      | 4  |
| Figura 2 – Aspetos da morfologia de <i>Artemia</i> (adaptado de Amat, 1985).....                                                                                                                                                                          | 6  |
| Figura 3 - Pormenor de quistos (A) e náuplio (B) de <i>A. parthenogenetica</i> .....                                                                                                                                                                      | 7  |
| Figura 4 - Localização geográfica da salina de Rio Maior.....                                                                                                                                                                                             | 12 |
| Figura 5 - Localização geográfica da salina da Troncalhada, Aveiro (adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> , 2012).....                                                                                                                                      | 12 |
| Figura 6 - Pormenor de fêmea adulta de <i>Artemia parthenogenetica</i> de Aveiro (à esquerda) e de Rio Maior (à direita).....                                                                                                                             | 45 |
| Figura 7 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro, dependendo das salinidades testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos .....                | 54 |
| Figura 8 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro, dependendo das temperaturas testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos .....               | 55 |
| Figura 9 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro, dependendo dos fotoperíodos testados; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos .....               | 56 |
| Figura 10 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro, dependendo das concentrações de alimento testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ..... | 57 |
| Figura 11 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. franciscana</i> , dependendo das salinidades testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.....                              | 58 |
| Figura 12 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. franciscana</i> , dependendo das concentrações de alimento testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos .....               | 59 |
| Figura 13 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. franciscana</i> , dependendo dos fotoperíodos testados; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.....                             | 60 |
| Figura 14 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de <i>A. franciscana</i> , dependendo das concentrações de alimento testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos .....               | 61 |

|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15 - Função de sobrevivência ( $l_x$ ) da população de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro, dependente das condições experimentais testadas .....                                                                      | 62 |
| Figura 16 – Parâmetros demográficos de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro: valores médios ( $\pm$ desvio-padrão) da taxa de reprodução líquida ( $R_0$ ), tempo geracional (T) e taxa de crescimento intrínseco ( $r$ )..... | 63 |
| Figura 17 - Função de sobrevivência ( $l_x$ ) da população de <i>A. franciscana</i> , dependente das condições experimentais testadas .....                                                                                    | 64 |
| Figura 18 - Parâmetros demográficos de <i>A. franciscana</i> : valores médios ( $\pm$ desvio-padrão) da taxa de reprodução líquida ( $R_0$ ), tempo geracional (T) e taxa de crescimento intrínseco ( $r$ ) .....              | 65 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Composição do meio de cultura Fábregas <i>et al.</i> (1984) para o cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> . Dosagem de nutrientes por litro de água do mar. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 46 |
| Tabela 2 – Condições experimentais de cultura, sendo o tratamento 1 o tratamento base.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 47 |
| Tabela 3 – Valores de média (desvio-padrão) dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo, pós-reprodutivo e tempo de vida total, em dias, dependendo da salinidade, temperatura, fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de <i>Tetraselmis suecica</i> mL <sup>-1</sup> ) para <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro. O tratamento base é o mesmo para todos os parâmetros. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $\alpha=0,005$ ) entre os tratamentos..... | 51 |
| Tabela 4 - Valores de média (desvio-padrão) dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo, pós-reprodutivo e tempo de vida total, em dias, dependendo da salinidade, temperatura, fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de <i>Tetraselmis suecica</i> mL <sup>-1</sup> ) para <i>A. franciscana</i> . O tratamento base é o mesmo para todos os parâmetros. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $\alpha=0,005$ ) entre os tratamentos.....               | 52 |
| Tabela 5 – Valores de média e desvio-padrão das características reprodutivas e da qualidade da descendência de <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro, dependendo da salinidade (ppt), temperatura (°C), fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de <i>Tetraselmis suecica</i> mL <sup>-1</sup> ). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $\alpha=0,05$ ). O tratamento base foi igual para todos os parâmetros. ....                    | 53 |
| Tabela 6 - Valores de média e desvio-padrão das características reprodutivas e da qualidade da descendência de <i>A. franciscana</i> , dependendo da salinidade (ppt), temperatura (°C), fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de <i>Tetraselmis suecica</i> mL <sup>-1</sup> ). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $\alpha=0,05$ ). O tratamento base foi igual para todos os parâmetros. ....                                  | 57 |







# INTRODUÇÃO GERAL



# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. *Artemia*

### 1.1. TAXONOMIA E BIOGEOGRAFIA DO GÉNERO *Artemia*

A primeira descrição deste género remonta a 1755, quando Schlösser descreveu a sua ocorrência nas salinas de Lymington, Inglaterra. Foi classificada por Linnaeus, em 1758, como *Cancer salinus*, e renomeada, mais tarde, *Artemia salina*, por Leach, em 1819. Durante muitos anos, acreditou-se que este género era composto por apenas uma espécie, no entanto, com a aplicação de novas técnicas utilizando marcadores genéticos, começaram a descobrir-se novas espécies. Revisões taxonómicas (Browne & Bowen, 1991; Triantaphyllidis *et al.*, 1998) levaram à inclusão de oito espécies bissexuais – *A. franciscana franciscana*, *A. franciscana monica*, *A. franciscana sp.*, *A. persimilis*, *A. salina*, *A. urmiana*, *A. sinica* e *Artemia sp.* – e uma espécie partenogenética (*A. parthenogenetica*) composta por várias populações de diferentes ploidias.

Atualmente, o género *Artemia* (subclasse Branchiopoda, ordem Anostraca) compreende um grupo de seis espécies bissexuais (Amat *et al.*, 2005): *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), *A. persimilis* (Piccinelli & Prosdocimi, 1968), *A. salina* (Leach, 1819), *A. urmiana* (Gunther, 1890), *A. sinica* (Cai, 1989) e *A. tibetiana* (Abatzopoulos *et al.*, 1998). Além disso, integra também a espécie partenogenética, que se encontra sobre revisão filogenética, uma vez que o estudo de Baxevanis *et al.* (2006) concluiu que as estirpes partenogenéticas de diferentes ploidias não devem englobar-se numa só espécie. Para se concluir quanto à homogeneidade ou heterogeneidade desta espécie é necessário um estudo aprofundado das populações existentes.

Presentemente, a distribuição geográfica de *Artemia* é a seguinte (Amat *et al.*, 2007) (figura 1):

- *Artemia persimilis*: espécie endémica do continente sul-americano. Acreditava-se que existia exclusivamente na Argentina, mas foi encontrada recentemente no Chile (Gajardo *et al.*, 2001).
- *Artemia urmiana*: apenas existem populações desta espécie no Irão, no Lago Urmia.
- *Artemia sinica*: no norte e centro da China e áreas vizinhas, como a Mongólia.

- *Artemia tibetiana*: encontra-se exclusivamente em lagos salgados do Tibete.
- *Artemia salina*: distribui-se pela Bacia do Mediterrâneo e sul de África.
- *Artemia franciscana*: autóctone do continente americano. Por ser uma espécie muito procurada pela indústria salineira e da aquacultura, tem sido introduzida e hoje em dia, encontra-se dissipada por todos os continentes.
- *Artemia parthenogenetica*: distribuição ampla pela zona do Mediterrâneo, sul da Europa e no norte de África.

Em resumo, este género tem uma distribuição à escala mundial, podendo encontrar-se em todos os continente, exceto na Antártica.

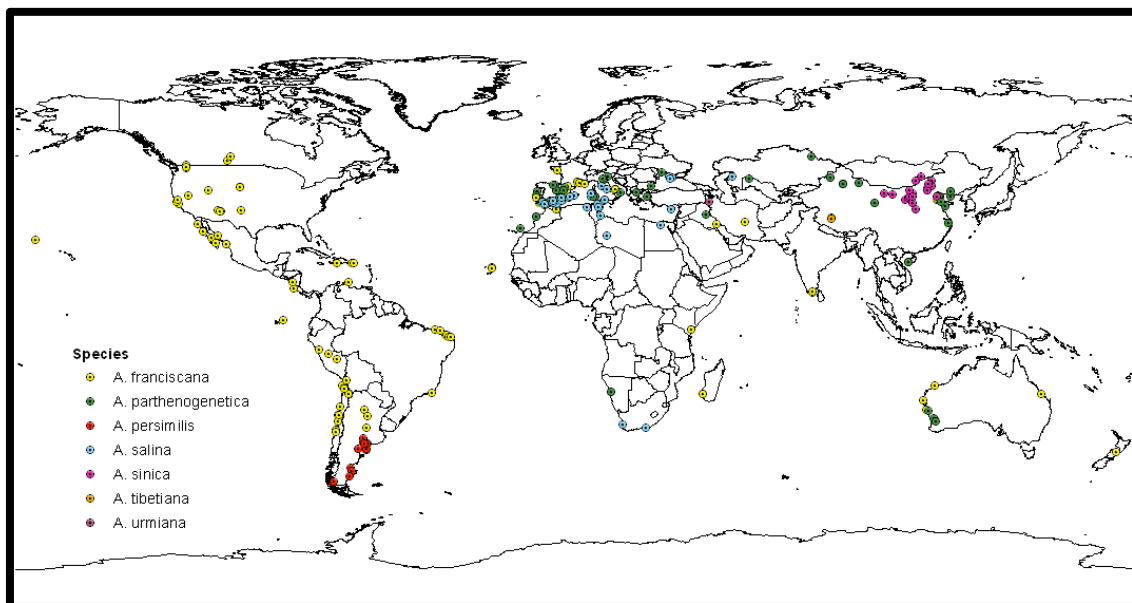


Figura 1 - Distribuição geográfica de *Artemia* (adaptado de Garcia, 2009)

## 1.2. BIOLOGIA DE *Artemia*

*Artemia* tem o corpo fino e alongado, em forma de folha, protegido por um exoesqueleto frágil e o seu tamanho varia entre 10-12mm, podendo chegar aos 17-18mm. Em alguns casos, indivíduos de *Artemia parthenogenetica* poliploide podem atingir cerca de 20mm. Apresenta várias tonalidades, desde o ligeiramente azulado ao avermelhado, ou até vermelho intenso, quando se encontra em águas com salinidades extremas (Amat, 1985). A morfologia deste género é muito variável, alterando com a espécie, a ploidia (no caso das estirpes partenogénéticas) e as características físico-químicas do meio. No entanto, em todos os casos, podemos distinguir três zonas externas do corpo bem diferenciadas: cabeça, tórax e abdómen (figura 2 - A).

Segundo Amat (1985), a cabeça é dividida em cinco segmentos, onde se podem identificar (nos indivíduos adultos) restos do olho naupliar (órgão funcional nos náuplios e que se mantem até ao estado adulto) formado por três ocelos, e dois olhos, que se encontram no final de dois pedúnculos longos, de comprimento variável de acordo com a espécie. Nos machos das espécies bissexuais, os pedúnculos são mais compridos e o diâmetro dos olhos maior. Perto da base de cada um dos pedúnculos nasce uma anténula e uma antena, órgãos diferenciais, uma vez que a sua morfologia varia com a espécie, o sexo e a ploidia. No caso dos machos, as antenas apresentam forma de tenaz (figura 2 – B2), próprio para se agarrarem às fêmeas, na zona anterior do saco ovífero, no momento de copular. Os últimos três segmentos da boca são constituídos por um par de mandíbulas e dois pares de maxilas.

O tórax é formado por onze segmentos bem delimitados, cada um com um par de apêndices foliáceos, chamados filópodes ou toracópodes, que são constituídos por exopoditos e endopoditos. Os exopoditos apresentam um tegumento muito fino e permeável aos iões, funcionando como brânquias e como órgão osmorregulador, uma vez que permitem trocas entre a hemolinfa e o meio. Já os endopoditos funcionam como órgãos natatórios e são os responsáveis por filtrar as partículas do meio e por encaminhá-las para o átrio bucal. Assim, os toracópodes servem como órgãos natatórios, respiratórios e filtradores e batem a um ritmo constante de 150-200 batimentos por minuto (figura 2 – C).

O abdómen é constituído por oito segmentos, sendo que os dois mais próximos ao tórax se designam por segmentos sexuais. Nestes segmentos podemos encontrar nas fêmeas, o saco ovífero e o útero, e a vesícula seminal e pénis, nos machos das espécies bissexuais. Os seis segmentos seguintes terminam no télson que apresenta

uma bifurcação, a furca caudal, onde se encontra o ânus, e onde existem inúmeras sedas. A morfologia do saco ovífero (figura 2 – D) e da furca caudal (figura 2 – E) apresenta dimorfismo, permitindo distinguir diferentes espécies ou estirpes de diferentes ploidias, no caso da espécie partenogenética.

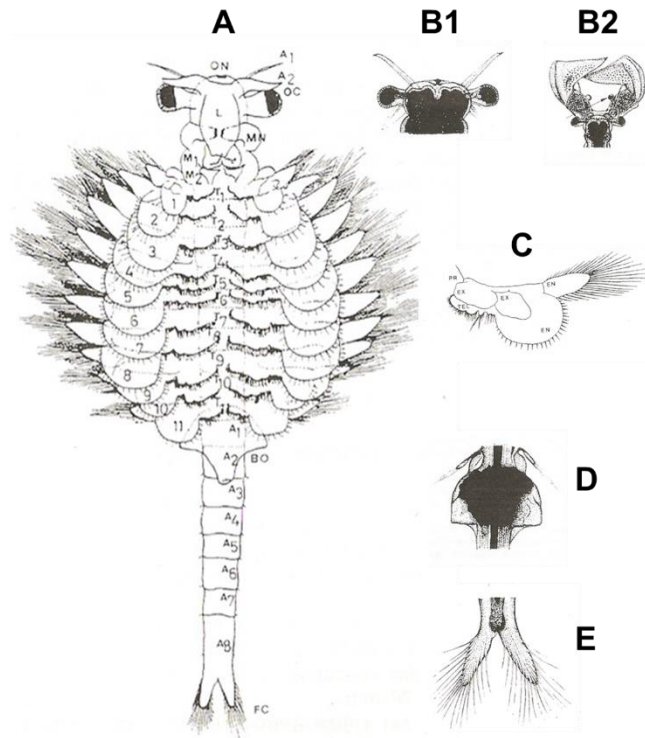


Figura 2 – Aspectos da morfologia de *Artemia* (adaptado de Amat, 1985)

*Artemia* apresenta os sistemas nervoso e circulatório muito primitivos. O primeiro é constituído por um cérebro rudimentar e uma cadeia de gânglios que se distribui por todo o corpo. O sistema circulatório é aberto, formado por um coração tubular com um ostíolo e por diversas cavidades onde circula a hemolinfa.

Os exopoditos são os órgãos que medeiam as trocas gasosas entre os indivíduos e o meio, funcionando como brânquias, e são também responsáveis pela osmorregulação. Nas suas cavidades circula a hemolinfa, que contém várias hemoglobinas, em especial a Hb<sub>3</sub>, uma hemoglobina que apresenta grande afinidade com o oxigénio. Esta capacidade fisiológica permite que *Artemia* se adapte a meios extremamente salinos e com teores muito baixos de oxigénio dissolvido e aumentando a concentração de hemoglobinas, não necessitando por isso de aumentar a sua taxa respiratória (Amat, 1985).

*Artemia* é um crustáceo filtrador que se alimenta de algas unicelulares, bactérias, pequenos protozoários e detritos que se encontram no meio. O alimento é direcionado

para o átrio bucal, pelas movimentações dos toracópodes, passa para o esófago seguindo para um par de ventrículos globulares, uma espécie de estômago, onde se julga haver uma ação digestiva. Através de movimentos de contração, percorre todo o tubo intestinal, até ao ânus, por onde são expulsos os restos.

Este género pode apresentar reprodução bissexuada, com presença de machos e fêmeas, e assexuada, apenas com presença de fêmeas. As fêmeas podem produzir dois tipos de descendência: aquela em que o embrião se desenvolve completamente no interior do útero e de onde nascem diretamente náuplios (modalidade ovovivípara, em condições ambientais ótimas); e outra, cujo desenvolvimento cessa em determinado estado dentro do útero e o embrião é coberto por uma substância segregada pelas glândulas da casca, formando um córion resistente (modalidade ovípara, quando as condições ambientais não são favoráveis). Os embriões dentro dos quistos (figura 3 – A) encontram-se num estado de criptobiose, o que permite a sua conservação por longos períodos de tempo (Amat, 1985). Todas as espécies de *Artemia* possuem as duas modalidades de reprodução e podem alternar entre uma e outra, em resposta às alterações ambientais.

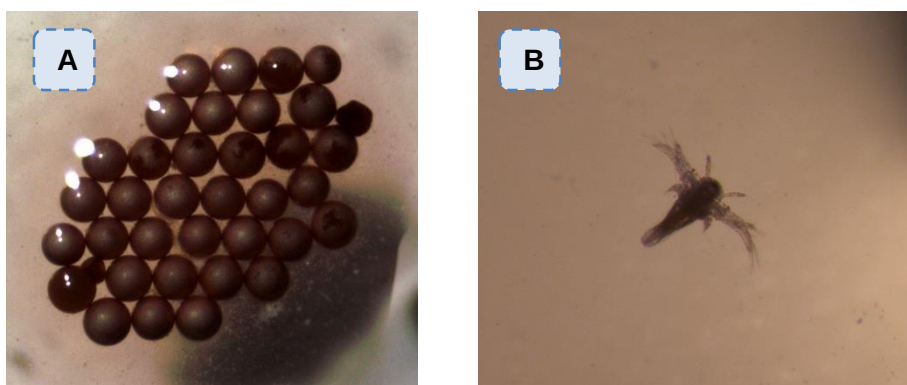


Figura 3 - Pormenor de quistos (A) e náuplio (B) de *A. parthenogenetica*

O desenvolvimento dos náuplios (figura 3 – B) é faseado, progredindo ao longo de 18 estados larvares. No primeiro estado, os náuplios medem cerca de 400µm de comprimento e, geralmente, os de origem ovovivípara são maiores do que os de origem ovípara. Têm uma cor que varia desde o amarelo alaranjado ao avermelhado e alimentam-se das suas reservas vitelinas, durante 2-3 dias, uma vez que o seu sistema digestivo ainda não está completamente desenvolvido (Amat, 1985). No final do primeiro estado larvar, os náuplios começam a filtrar as partículas do meio, mas apenas com a ajuda dos movimentos das antenas, uma vez que os toracópodes ainda não se encontram formados.

### 1.3. ECOLOGIA DO GÉNERO *Artemia*

*Artemia* é um crustáceo cosmopolita, que apresenta uma ampla distribuição geográfica. Habita ecossistemas salinos, como salinas litorais ou interiores, lagos salgados e águas haloalinas, tanto em climas tropicais, subtropicais e zonas temperadas (Persoone & Sorgeloos, 1980). Estes biótopos apresentam comunidades e cadeias alimentares relativamente simples, no entanto, são caracterizados por condições físico-químicas muito adversas.

Os principais fatores abióticos que condicionam o desenvolvimento, reprodução e dinâmica das populações de *Artemia* são a salinidade, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, disponibilidade de alimento, presença de espécies congéneres como competidoras e de outros animais competidores ou predadores. Estes fatores podem influenciar os parâmetros populacionais e reprodutivos (Barata *et al.*, 1996) bem como provocar uma ausência temporária das populações de *Artemia* (Van Stappen, 2002).

É a alta salinidade que determina a presença de *Artemia*, permitindo encontrar populações deste género onde mais nenhum zooplâncton ou organismos bentónicos foram encontrados (Amat, 1985; Van Stappen, 2002). Sabe-se que as populações de *Artemia* sobrevivem a salinidades até 370 ppt, porém, os indivíduos encontrados nestas condições despendem toda a sua energia nas funções de osmorregulação, pondo em risco a sobrevivência das populações, uma vez que não se reproduzem (Amat, 1985; Persoone & Sorgeloos, 1980; Van Stappen, 2002). *Artemia* não possui nenhum mecanismo anatómico de defesa contra predadores, por isso, o limite inferior de tolerância à salinidade não se encontra estabelecido, sendo definido pelos valores que favoreçam o aparecimento de predadores (Amat, 1985; Van Stappen, 2002).

Em termos gerais, os limiares de tolerância de temperatura são os 5 e os 35°C, estando a temperatura ótima situada entre os 25 e os 30°C (Amat, 1985; Persoone & Sorgeloos, 1980). Estes limites não são fixos, podendo variar consoante as condições geográficas e as características de cada espécie (Amat, 1985; Vanhaecke *et al.*, 1987; Van Stappen, 2002). A relação inversa que existe entre a solubilidade de oxigénio, as temperaturas e salinidades elevadas, são um bom indicador da baixa concentração de oxigénio a que *Artemia* está sujeita no seu habitat (Amat, 1985). Quando ocorrem situações de hipoxia e anoxia, *Artemia* recorre ao metabolismo anaeróbico para sobreviver (Varó *et al.*, 1991), utilizando a Hb<sub>3</sub> presente na hemolinfa para assegurar a captação de oxigénio, mantendo taxa respiratória constante. Nestes casos, *Artemia*

apresenta coloração avermelhada, devido às altas concentrações de hemoglobina na hemolinfa.

A composição iónica dos ecossistemas salinos é muito variada, com proporções iónicas muito diferentes às encontradas na água do mar, permitindo-nos encontrar populações de *Artemia* adaptadas a águas cloradas, sulfatadas, carbonatadas e potássicas (Amat, 1985; Persoone & Sorgeloos, 1980).

Em termos de alimentação, este crustáceo é filtrador obrigatório e não seletivo, filtrando todas as partículas em suspensão com tamanhos entre 1 e 50  $\mu\text{m}$  (Amat, 1985). Alimenta-se de bactérias, algas unicelulares, protozoários, partículas e detritos do meio.

Apesar de ser um género pouco evoluído morfologicamente e não possuir nenhum mecanismo de defesa contra predadores, é dotado de vários mecanismos de adaptação fisiológica, nomeadamente a sua adaptação a salinidades extremas e o seu mecanismo de osmorregulação. No entanto, a adaptação que permite assegurar a sobrevivência das diferentes espécies deste género está relacionada com a sua capacidade de produzir ovos de resistência ou quistos. Estes permanecem em diapausa enquanto a salinidade do meio permitir que se mantenham desidratados (salinidades de 85-90 ppt) e se encontrar acima do nível de eclosão, que varia com a espécie (Amat, 1985; Persoone & Sorgeloos, 1989). Os quistos são capazes de resistir a temperaturas desde 0 a 100°C.

## 1.4. PRINCIPAL PROBLEMÁTICA DO GÉNERO *Artemia* NO MEDITERRÂNEO

Um dos problemas relacionados com o género *Artemia* é a perda de biodiversidade na bacia do Mediterrâneo. Isto deve-se à perda de habitats hipersalinos, bem como à erradicação das populações autóctones que têm vindo a ser substituídas pela espécie invasora, *Artemia franciscana*.

A perda destes habitats deve-se, sobretudo, ao abandono das salinas, que são substituídas por campos de arroz e aquaculturas (Amat *et al.*, 2007). Além disso, a importância comercial de quistos para a aquacultura (Lavens & Sorgeloos, 2000) tem motivado a inoculação intencional de *A. franciscana*, por parte de aquacultores, uma vez que a maior parte dos quistos comercializados são provenientes do *Great Salt Lake* (USA), de onde é originária esta espécie.

O aparecimento e distribuição de *A. franciscana* no Mediterrâneo têm sido reportados em inúmeros trabalhos nos últimos anos (Amat *et al.*, 2005; Amat *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2005; Mura *et al.*, 2006) e vários estudos sobre o *fitness* e reprodução desta espécie têm sido levados a cabo, por forma a compreender que fatores potenciam o estabelecimento destas populações em detrimento das populações endémicas (Amat *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 1996a; Barata *et al.*, 1996b; Browne e Wanigasekera, 2000; Pinto *et al.*, 2013b; Ruebhart *et al.*, 2008). *A. franciscana* apresenta algumas características adaptativas, como um rápido crescimento populacional, capacidade de atingir cedo a maturidade, altas taxas de fecundidade, um baixo número de ninhadas ovíparas e maior resistência ao parasitismo, que lhe confere um carácter invasivo (Amat *et al.*, 2005; Browne & Wanigasekera, 2000; Green *et al.*, 2005; Georgiev *et al.*, 2007), permitindo-lhe coexistir com populações autóctones (Redon *et al.*, 2009) e mesmo substituí-las.

A capacidade competitiva desta espécie torna-se mais eficaz quando associada a atividades humanas que potenciam a invasão. Amat *et al.*, (2005) sugere como solução para abrandar a invasão de *A. franciscana* um maior controlo, com legislação mais apertada, à indústria da aquacultura e o encorajamento da utilização de quistos de espécies autóctones.

## 2. ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJETIVOS DO TRABALHO

O aparecimento de espécies ou populações em ecossistemas não-nativos, e a grande elasticidade fenotípica apresentada pelas espécies exóticas, revela a sua capacidade de coexistir com as populações autóctones e de se adaptarem a novos *habitats*, mesmo em condições ambientais hostis (Browne & Wanigasekera, 2000; Redon *et al.*, 2009). Esta capacidade confere a *A. franciscana* um grande potencial invasivo. No entanto, o conhecimento obtido até agora sobre o processo invasivo não permite prever a possibilidade de uma invasão, nem a sua efetividade, nem saber como atuar sobre ecossistemas já invadidos, uma vez que todo este processo está dependente da interação entre as espécies invasora e nativa. O conhecimento desta interação só é possível quando o processo de invasão está a decorrer, o que pode levar a danos irreversíveis (Amat *et al.* 2007).

Assim, são necessários mais estudos, que permitam conhecer melhor o processo invasivo e todos os fatores que nele podem interferir (nomeadamente fatores abióticos) bem como a interação destes com as espécies nativas e a invasora. Este trabalho tem como objetivo principal clarificar quais as influências que alguns fatores ambientais podem ter sobre a reprodução e a história de vida de duas populações partenogenéticas nativas e de *A. franciscana*.

Em Portugal, *Artemia franciscana* apareceu no início da década de 80 do século XX (Hontoria *et al.*, 1987), nas salinas do sul e até ao início da década de 90 espalhou-se ou foi introduzida no centro e norte do país (Amat *et al.*, 2005). Hoje em dia, todas as populações autóctones foram erradicadas das salinas portuguesas, com a exceção da salina interior de Rio Maior (39°21'47"N8°56'33"W) (figura 4) e da salina da Troncalhada (figura 5), pertencente ao complexo de salinas de Aveiro (40°38'37"N8°39'57"W), onde ainda estão estabelecidas populações de *Artemia parthenogenetica* (Pinto *et al.*, 2013a).



Figura 4 - Localização geográfica da salina de Rio Maior

A salina da Troncalhada é uma salina artesanal, alimentada por água da Ria de Aveiro, onde o processo de produção de sal ocorre gradualmente e de forma fracionada, fazendo passar a água salgada (pela própria inclinação da salina) desde os tanques alimentadores para os evaporadores e destes para os cristalizadores (Vieira, 1989; Rodrigues *et al.*, 2012).

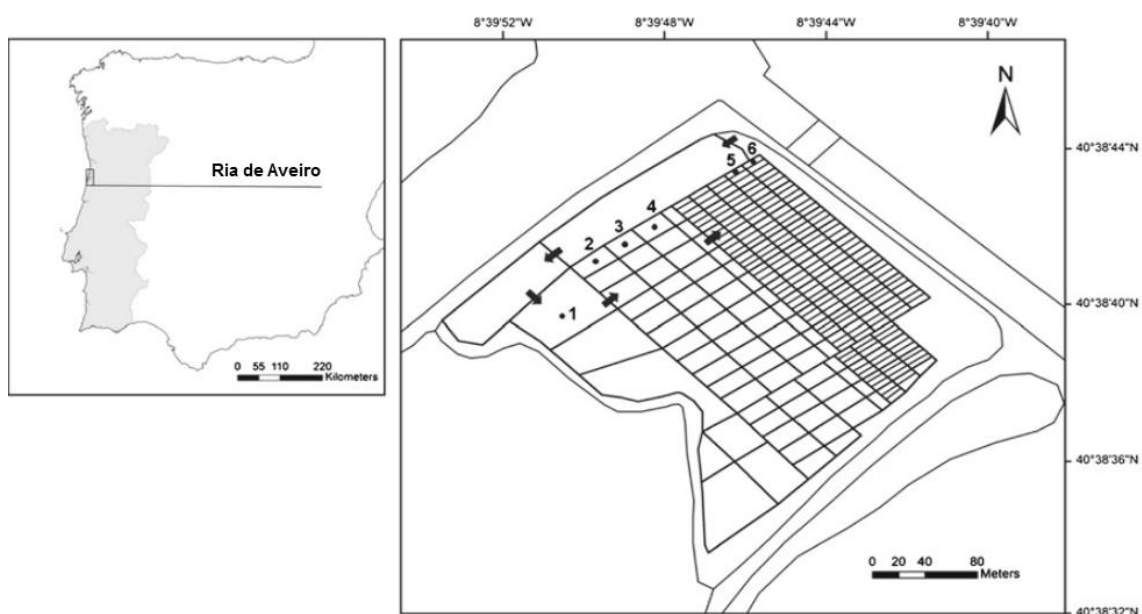


Figura 5 - Localização geográfica da salina da Troncalhada, Aveiro (adaptado de Rodrigues *et al.*, 2012)

Já a salina de Rio Maior é um caso especial, uma vez que é a única salina interior de Portugal que ainda está funcionamento. É composta por cerca de 400 talhos de diferentes proprietários, alimentados por um poço central, e em cada um deles ocorre todo o processo de produção de sal, através da evaporação da água. A água salgada

provém de um filão profundo de sal-gema que é atravessado por uma corrente de água doce, sendo a sua composição iónica muito diferente da água do mar (Calado & Brandão, 2009; Ecosal-Atlantis, 2012). É a particularidade deste biótopo que confere à população de *A. parthenogenetica* lá encontrada um carácter especial.

Foram testados os efeitos da salinidade, temperatura, fotoperíodo e concentração de alimento, em duas populações nativas de Portugal (figura 6) com diferentes origens geográficas (Aveiro e Rio Maior) e em *A. franciscana* comercial, proveniente do Great Salt Lake. A quantificação dos parâmetros demográficos e reprodutivos foi efetuada para melhor compreender a tolerância das espécies aos fatores ambientais estudados e para avaliar a suscetibilidade destas populações à invasão.

Os resultados obtidos para *Artemia parthenogenetica* de Rio Maior já foram submetidos para publicação e o trabalho encontra-se transcrito na íntegra no capítulo 1 desta dissertação.



# CAPÍTULO 1.

**ENVIRONMENTAL FACTORS AS A BARRIER TO INVASION AND A TOOL TO  
CHARACTERIZE DEMOGRAPHIC PARAMETERS AND LIFE HISTORY TRAITS OF  
*Artemia parthenogenetica* FROM RIO MAIOR (PORTUGAL)**

SUBMITTED TO MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH ON AUGUST, 4<sup>TH</sup>



## ENVIRONMENTAL FACTORS AS A BARRIER TO INVASION AND A TOOL TO CHARACTERIZE DEMOGRAPHIC PARAMETERS AND LIFE HISTORY TRAITS OF *Artemia parthenogenetica* FROM RIO MAIOR (PORTUGAL)

Filipa J. Sousa<sup>a</sup>; Francisco M. Ferreira<sup>a</sup>; Carolina M. Rodrigues<sup>b</sup>; Ana M. Bio<sup>b</sup>; Nuno M. Monteiro<sup>c,d</sup>; Francisco D. Amate<sup>e</sup>; Francisco Hontoria<sup>e</sup>; Natividade Vieira<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal. Rua do Campo Alegre s/n, 4169-007 Porto, Portugal.

<sup>b</sup> CIMAR/CIIMAR – Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, University of Porto, Portugal, Rua dos Bragas, 289, 4050-123 Porto, Portugal.

<sup>c</sup> CIBIO/UP – Research Centre in Biodiversity and Genetic Resources, University of Porto, Campus Agrário de Vairão, R. Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão, Portugal.

<sup>d</sup> CEBIMED – Faculty of Health Sciences, University Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal.

<sup>e</sup> IATS - CSIC – Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, 12595 Ribera de Cabanes (Castellón), Spain.

\* Corresponding author

Email address: fmiguelsferreira@gmail.com

Tel (+351) 220 402 000

Fax (+351) 220 402 009

### Abstract

One of the main examples of biodiversity loss in hypersaline aquatic environments of the Mediterranean region is the eradication of the native populations of brine shrimp (*Artemia salina* and *A. parthenogenetica*) by the invasive species, *A. franciscana*. In Portugal, there are only two known places where *Artemia parthenogenetica* can be found. Studying the life span and history traits of this native populations strains could be important to prevent further spread of the exotic species.

The main aim of the present study is a detailed examination of the influence of selected environmental factors (salinity, temperature, photoperiod and food supply) on life history traits, reproduction (in terms of percentage of ovoviviparous vs. oviparous

reproduction and the quality of the respective offspring) and demographic parameters of a native *A. parthenogenetica* population from Portugal in order to assess the tolerance and ecological adaptation strategies of *A. parthenogenetica* to different environments.

### Keywords

*Artemia parthenogenetica*; life history traits; demographic parameters; environmental factors; invasion.

## 1. Introduction

The cosmopolitan genus *Artemia* currently comprises six bisexual species, and a variety of parthenogenetic (clonal) lineages of different ploidy (Van Stappen, 2002). Among the bisexual species of the *Artemia* genus, *A. franciscana* has been the most extensively studied. This species is endemic to the New World and is an invasive species, rapidly expanding its range in hypersaline ecosystems in the Mediterranean region, since the 1980s, and replacing the native *A. parthenogenetica* and *A. salina* (Amat *et al.*, 2005). Apart from their substantial economic impacts, invasive species may alter the evolutionary trajectory of native species through competition, displacement, hybridization and even extinction (Mura *et al.*, 2006). If the exotic species behaves openly as invasive, effects are probably irreversible (Herbold and Moyle, 1986) and, in the case of *Artemia*, exclusion may be attained after only 2 to 3 generations (Lenz and Browne, 1991).

Generally, the success of invasive species has been linked to the biological characteristics of the invaders (such as growth rate and reproductive strategies) (Hufbauer, 2008) or to the environmental conditions of the invaded region (Occhipinti-Ambrogi and Savini, 2003). It has been demonstrated that environmental factors such as salinity, temperature, light and feeding conditions influence *Artemia* populations. The impact of these ecological parameters can be explained through different *Artemia* responses in terms of biological fitness and life span (Amat *et al.*, 2007; Naceur *et al.*, 2011). *Artemia* strains may show a wide variation in survival and reproductive characteristics, probably as a result of different selective pressures experienced in their original habitats (Browne and Bowen, 1991).

Reproductive and life span characteristics have been intensively studied in *Artemia* and have provided valuable data for the understanding of their life history development and adaptation strategies to different conditions (e.g., Agh *et al.*, 2008;

Browne and Wanigasekera, 2000; Browne *et al.*, 1988; Wear and Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986). Quantification of demographic variables as a function of environmental changes is also important to understand competitive fitness of *Artemia* species and populations (Barata *et al.*, 1996a).

Although many factors influence *Artemia* reproductive success, temperature and salinity have been demonstrated to exert a pronounced impact. Previous studies have shown that, when subjected to a broad range of salinities, *A. franciscana* seems to be a better performer, in terms of survival and reproductive characteristics, than other bisexual and parthenogenetic strains (e.g., Soniraj, 2004; Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Wear and Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986). Temperatures reaching about 20°C are likely to be optimal for survival and reproduction for most *Artemia* species but *A. franciscana* is also a good performer at both lower (e.g., Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Wear and Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986) and higher (e.g., Browne and Wanigasekera, 2000; Quynh and Lam, 1987) temperatures. Besides, during laboratory competition experiments (incorporating intra- and interspecific variability as well as variation in food level) *A. franciscana* swiftly eliminated parthenogenetic strains in 91% of the scorable trials (Browne and Halanych, 1984). It is therefore remarkable that the biological attributes and levels of phenotypic plasticity in this species may eventually outweigh even the advantages of parthenogenetic reproduction, enabling *A. franciscana* to adapt to a wide range of ecological settings and to invade and spread in occupied niches, unlike other *Artemia* (Mura *et al.*, 2006).

In Portugal, the autochthonous *Artemia* seems to have been eradicated in almost all salinas with the exception of some salinas belonging to Aveiro's complex (40°39'43.78"N; 8°43'11.35"W; North of Portugal) and the inland rock salt salinas of Rio Maior (39°21'49.90"N; 8°56'38.93"W; Centre of Portugal) (Amat *et al.*, 2007; Amat *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, in press; Rodrigues *et al.*, 2012).

The inland salinas of Rio Maior are far from aquaculture activities and important water bird flyways, allowing them to be a protected habitat for native *Artemia*. Despite the fact that the salinas of Rio Maior are less exposed to invasion, there is the risk of future anthropogenic interventions that may cause the inoculation of the exotic species and the subsequent eradication of the diploid parthenogenetic *Artemia* strains.

Studies on the phenomenon of biological invasions generally focus on the biological characteristics and demographic strategies of species that are successfully established in non-native environments (Hufbauer, 2008). However, despite much investigation, it has been proven difficult to identify traits that predict the success of these

species. This may largely be due to the fact that different traits favour invasiveness in different habitats (Hufbauer 2008).

The present work focuses on the diploid parthenogenetic *Artemia* strain from the Rio Maior inland salinas. Survival, growth, reproductive and life cycle characteristics of this *Artemia* population have already been studied by Amat *et al.* (2007), under standard conditions (70 ppt salinity; 24°C; 12L:12D regime and oxygenation). However, culture conditions that are considered standard for rearing *Artemia* may be optimal for some strains, but suboptimal for others; their effects are strain dependent (Agh *et al.*, 2008). The main aim of the present study was a detailed examination of the influence of selected environmental factors on life history traits (life cycle and reproductive characteristics), demographic parameters and qualitative reproduction (in terms of percentage of ovoviviparous vs. oviparous reproduction and the quality of the ovoviviparous offspring) of *A. parthenogenetica* from Rio Maior. Effects of salinity, temperature, photoperiod and food concentration conditions were tested to achieve a better understanding of the tolerance and adaptation strategies of this strain to different environments, and to evaluate the susceptibility of this population to an invasion of *A. franciscana*. Because biological invasions are threatening global biodiversity worldwide, changing the structure and functioning of ecosystems, a better understanding of the factors that affect the invasion process is urgently needed, as well as studies evaluating the risk of invasion in order to prevent the spread of exotic invasive species in salinas and the consequent elimination of native species.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling

*Artemia parthenogenetica* was sampled in the inland salinas of Rio Maior, situated in central Portugal (39°21'49.90"N; 8°56'38.93"W), approximately 3 km from the city of Rio Maior (Fig. 1) and lie approximately 30 km from the Atlantic Ocean. Sampling took place in April 2011, in a crystallizer pond (44 ppt) where the yearly preparation works for salt production had not yet started. *Artemia* were collected with a 160 µm mesh size zooplankton net and samples were transported alive to the laboratory. At that time, neither *Artemia* cysts nor biomass were found in evaporation and crystallizing ponds that were filled with brine and ready to start salt production. The brine that feeds the evaporation ponds comes from an extensive and deep rock-salt lode crossed by a

subterranean fresh-water stream that becomes salty brine (6.3 times saltier than the Atlantic Ocean water) and is pumped up from a capture well, in the centre of the salinas (Calado and Brandão, 2009; Ecosal-Atlantis, 2012). Decreases in salinity in this inland salina occur mostly on a seasonal basis, due to rainfall. Whenever the salinity drops to a value below the species' hatching upper limit a new brine shrimp population can develop.



**Figure 1 - Sample location:** location of Rio Maior (square) in Portugal (grey area) and scheme of the Rio Maior salinas and location of the sampling sites (black dots).

## 2.2. Culture experiments

*Artemia* sampled in Rio Maior was maintained in laboratory in standard conditions (24°C, 70 ppt, 12:12h L:D (light:darkness) and *Tetraselmis suecica* as food supply). This culture was used to provide cysts. After there were enough cysts, they were hatched and *Artemia* nauplii were transferred into jars (300 nauplii per treatment) and were raised under the following distinct different treatment conditions.

**Table 1 - Experimental treatment conditions.** Treatment 1 was the treatment base, only one parameter was changed at a time.

| Treatment | Salinity (ppt) | Temperature (°C) | Light (h) | Food supply (cells ml <sup>-1</sup> ) |
|-----------|----------------|------------------|-----------|---------------------------------------|
| 1         | 70             | 24               | 12        | 300000                                |
| 2         | 110            | 24               | 12        | 300000                                |
| 3         | 150            | 24               | 12        | 300000                                |
| 4         | 70             | 29               | 12        | 300000                                |
| 5         | 70             | 34               | 12        | 300000                                |
| 6         | 70             | 24               | 0         | 300000                                |
| 7         | 70             | 24               | 24        | 300000                                |
| 8         | 70             | 24               | 12        | 150000                                |
| 9         | 70             | 24               | 12        | 37500                                 |

Experiments were set up to assess each variable independently, maintaining all other parameters constant, at their base values, which were: 24°C temperature, 70 ppt salinity, 12:12h L:D photoperiod and  $\pm 300000$  cells *T. suecica* ml<sup>-1</sup> of food supply. Experiments are described on Table 1.

Solutions of different salinities (70, 110 and 150 ppt) were prepared using natural sea water and Tropic Marine Sea Salt. Salinities were measured using a refractometer. The three experimental temperatures (24, 29 and 34°C  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) were maintained in thermostatically controlled water baths. The microalgae *T. suecica* cultures were enriched with nutrients according to Fabregas *et al.* (1984). An improved Neubauer-counting chamber was used to count microalgae cells in order to dilute the medium to the desired concentration levels.

The culture medium was monitored and renewed every 2 days in each treatment.

When females reached maturity, 30 females were separated to 50 ml individual containers and kept in the same experimental conditions they had been raised in, in order to determine the lifespan, reproductive and demographic parameters.

### 2.3. Life span and reproductive parameters

Individual females were monitored until death. The life span characteristics monitored were: pre-reproductive (time to attain the first brood), reproductive (time between the first and the last brood) and post-reproductive (time elapsed between the last brood and death) periods, and the total lifespan (time since hatching to death), in days. The reproductive characteristics monitored were: the mean time elapsed between broods (in days), the number of broods per female, and the total offspring per female (produced by an individual female in its reproductive cycle) and per brood (Amat *et al.*, 2007; Browne *et al.*, 1988; Browne *et al.*, 1984). The time between broods was calculated considering only females that had at least three broods, since we need more than two values to calculate means. We also calculated the total ovoviviparous and oviparous offspring produced by each individual female during its reproductive period. Finally, the type of reproduction (ovoviviparous/oviparous) and the quality of the ovoviviparous offspring (living or dead nauplii and abortive embryos) were assessed.

## 2.4. Demographic parameters

The generation time ( $T$ ; the average time period elapsed between the birth of a female and the production of the first offspring), the net reproductive rate ( $R_0$ ; average number of female offspring born from a female over her lifetime, assuming constant age, specific schedules of death and reproduction), the survival function ( $l_x$ ; probability of surviving on time  $x$ ) and the intrinsic rate of natural increase ( $r$ ; rate of population increase in a closed population, assuming constant age, specific schedules of death and reproduction and a stable age distribution) were calculated following the equations used by Meyer *et al.* (1986). When none of the females presented signs of sexual maturity (e.g., at 34°C *Artemia* only survived 4 days), neither reproductive nor demographic parameters were calculated. Only nauplii were considered for calculating demographic parameters from life-table experiments, because cysts enter diapause and do not contribute to immediate population growth.

## 2.5. Data analysis

Treatments were compared in terms of their mean values and SD, and differences were tested for significance. First, the Shapiro-Wilk Normality test and Levene's test for homogeneity of variance across groups were applied. If results did not fail both tests, the treatment groups were compared through an ANOVA followed by multiple comparisons by Tukey's HSD. If, however, one or more treatments failed the normality and/or the homogeneity of variance tests, treatment effects were assessed through a distribution free analysis of variance using the Kruskal-Wallis test to determine if any treatment group was different from the others, and post-hoc pair-wise Wilcoxon rank sum tests, corrected for multiple testing, to see which groups differed (Hollander and Wolfe, 1973). All test results refer to an  $\alpha = 0.05$  significance level. Analyses were done using the statistical package R (R Dev. Core Team, 2009).

### 3. Results

#### 3.1. Life cycle characteristics

Life cycle characteristics of *A. parthenogenetica* varied significantly ( $p < 0.05$ ) amongst the treatment levels of the environmental parameters studied (Table 2, Figs. 2 to 6). For most parameters, the duration of the pre-reproductive and reproductive periods and the total lifespan were different, whereas only variations in temperature and food availability led to differences between the post-reproductive periods. For many of the treatments, the specimens showed high individual variability reflected in large deviations from the mean values; therefore, markedly different means may have not been significantly different, whereas apparently similar ones were (Table 2).

**Table 2 - Mean (SD) values of pre-reproductive, reproductive and post-reproductive periods and their sum, e.g. the total lifespan, in days, depending on experimental salinity, temperature, photoperiod (in hours of light per day), food density (in cells of *Tetraselmis suecica* ml<sup>-1</sup>). The base treatment is the same for all parameters. Different letters mean significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments.**

| Parameter   | Level                         | Period length (SD)       |                           |                          |                           |
|-------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|             |                               | pre-reproductive         | Reproductive              | post-reproductive        | Lifespan                  |
| Salinity    | 70 ppt                        | 26.3 (2.9) <sup>a</sup>  | 27.7 (16.4) <sup>a</sup>  | 4.1 (3.7) <sup>a</sup>   | 58.2 (15.7) <sup>a</sup>  |
|             | 110 ppt                       | 27.3 (11.8) <sup>a</sup> | 33.1 (38.9) <sup>ab</sup> | 7.3 (8.2) <sup>a</sup>   | 67.7 (40.5) <sup>ab</sup> |
|             | 150 ppt                       | 30.9 (6.3) <sup>b</sup>  | 10.4 (14.2) <sup>b</sup>  | 4.8 (3.8) <sup>a</sup>   | 46.2 (17.7) <sup>b</sup>  |
| Temperature | 24 °C                         | 26.3 (2.9) <sup>a</sup>  | 27.7 (16.4) <sup>a</sup>  | 4.1 (3.7) <sup>a</sup>   | 58.2 (15.7) <sup>a</sup>  |
|             | 29 °C                         | 16.2 (12.3) <sup>b</sup> | 1.7 (3.2) <sup>b</sup>    | 13.8 (13.7) <sup>b</sup> | 31.7 (4.6) <sup>b</sup>   |
| Light       | 12 h                          | 26.3 (2.9) <sup>a</sup>  | 27.7 (16.4) <sup>a</sup>  | 4.1 (3.7) <sup>a</sup>   | 58.2 (15.7) <sup>a</sup>  |
|             | 24 h                          | 29.3 (1.7) <sup>b</sup>  | 3.7 (4.6) <sup>b</sup>    | 3.5 (2.2) <sup>a</sup>   | 36.5 (2.7) <sup>b</sup>   |
|             | 0 h                           | 35.2 (3.4) <sup>c</sup>  | 4.7 (5.1) <sup>b</sup>    | 3.3 (3.6) <sup>a</sup>   | 43.1 (6.0) <sup>c</sup>   |
| Food supply | 300000 cells ml <sup>-1</sup> | 26.3 (2.9) <sup>a</sup>  | 27.7 (16.4) <sup>a</sup>  | 4.1 (3.7) <sup>a</sup>   | 58.2 (15.7) <sup>a</sup>  |
|             | 150000 cells ml <sup>-1</sup> | 24.1 (6.0) <sup>b</sup>  | 27.3 (19.9) <sup>a</sup>  | 6.0 (5.8) <sup>ab</sup>  | 57.4 (21.3) <sup>a</sup>  |
|             | 37500 cells ml <sup>-1</sup>  | 66.3 (44.1) <sup>c</sup> | 0.4 (1.7) <sup>b</sup>    | 33.5 (44.3) <sup>b</sup> | 100.2 (9.4) <sup>b</sup>  |

Increasing the culture salinity to 150 ppt led to longer pre-reproductive period and markedly shorter (though very variable) reproductive period and total life span, in comparison to the 70 ppt treatment. Differences in reproductive and post-reproductive periods between 110 ppt and the other two salinities were not significant because of the marked variability ( $SD > \text{mean}$ ) observed for that salinity. At a temperature of 29°C the pre-reproductive, reproductive and lifespan periods were significantly shorter and the post-reproductive period longer than at 24°C. Notice that no *Artemia* survived more than 4 days at 34°C, so these results for this temperature are not shown. The pre-reproductive period was significantly shorter at a 12:12h L:D photoperiod and longer in complete

darkness. Whereas the length of the reproductive period and total lifespan increased when the organisms were cultured at 12:12h L:D. Under food shortage (37500 cells ml<sup>-1</sup> of *T. suecica*) *A. parthenogenetica* showed extremely long pre-reproductive and post-reproductive periods, and an increased total lifespan, but practically no reproduction. The reproductive and post-reproductive periods, and the total lifespan showed similar lengths when animals were fed with concentrations of 150000 and 300000 cells ml<sup>-1</sup> of *T. suecica*, but the pre-reproductive period was significantly shorter for 150000 cells ml<sup>-1</sup> food supply.

### 3.2. Reproductive characteristics

Broods per female and offspring per female and per brood were significantly ( $p < 0.05$ ) less at a salinity of 150 ppt than at 70 ppt (Fig. 2); differences to the 110 ppt treatment were not significant given the high variability observed at that salinity (mean=6.75, SD=5.94). The time elapsed between broods did not statistically differ amongst salinities. While reproductive outputs presented similar values at 70 and 110 ppt, there was significantly less ovoviviparous offspring produced per female at 110 ppt (Table 3).

**Table 3** - Mean and SD values of reproductive characteristics and quality, depending on salinity (Sal., in ppt), temperature (Temp., in °C), photoperiod (Light, in hours light per day), food density (in cells of *Tetraselmis suecica* ml<sup>-1</sup>). Different letters mean significant ( $\alpha = 0.05$ ) differences between treatments (the base treatment is the same for all parameters).

| Parameter   | Level                         | Ovoviviparous              | Nauplii                    |                         |                          | Encysted                   |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
|             |                               |                            | Live                       | Dead                    | Abortive                 |                            |
| Salinity    | 70 ppt                        | 252.0 (232.1) <sup>a</sup> | 245.6 (228.4) <sup>a</sup> | 4.4 (9.4) <sup>a</sup>  | 2.0 (5.5) <sup>a</sup>   | 225.8 (360.1) <sup>a</sup> |
|             | 110 ppt                       | 96.0(40.6) <sup>b</sup>    | 90.1(40.9) <sup>b</sup>    | 1.5 (1.4) <sup>b</sup>  | 4.4 (6.3) <sup>ab</sup>  | 507.7 (513.1) <sup>a</sup> |
|             | 150 ppt                       | 92.7(51.1) <sup>b</sup>    | 83.6(49.4) <sup>b</sup>    | 1.2 (2.4) <sup>c</sup>  | 7.9 (9.5) <sup>b</sup>   | 38.4 (68.6) <sup>b</sup>   |
| Temperature | 24 °C                         | 252.0 (232.1) <sup>a</sup> | 245.6 (228.4) <sup>a</sup> | 4.4 (9.4) <sup>a</sup>  | 2.0 (5.5) <sup>a</sup>   | 225.8 (360.1) <sup>a</sup> |
|             | 29 °C                         | 35.9(21.0) <sup>b</sup>    | 23.8(17.6) <sup>b</sup>    | 2.5 (3.4) <sup>a</sup>  | 9.7 (19.8) <sup>b</sup>  | 6.8 (9.9) <sup>b</sup>     |
| Light       | 12 h                          | 252.0 (232.1) <sup>a</sup> | 245.6 (228.4) <sup>a</sup> | 4.4 (9.4) <sup>a</sup>  | 2.0 (5.5) <sup>a</sup>   | 225.8 (360.1) <sup>a</sup> |
|             | 24 h                          | 6.9(13.7) <sup>b</sup>     | 5.8(12.8) <sup>b</sup>     | 0.2 (0.4) <sup>b</sup>  | 0.9 (2.8) <sup>a</sup>   | 129.8 (76.9) <sup>a</sup>  |
|             | 0 h                           | 69.6(78.6) <sup>c</sup>    | 53.4(70.6) <sup>c</sup>    | 1.7 (3.6) <sup>ab</sup> | 14.5 (33.2) <sup>a</sup> | 64.3 (61.9) <sup>b</sup>   |
| Food supply | 300000 cells ml <sup>-1</sup> | 252.0 (232.1) <sup>a</sup> | 245.6 (228.4) <sup>a</sup> | 4.4 (9.4) <sup>a</sup>  | 2.0 (5.5) <sup>a</sup>   | 225.8 (360.1) <sup>a</sup> |
|             | 150000 cells ml <sup>-1</sup> | 363.6 (239.5) <sup>a</sup> | 356.3 (239.9) <sup>a</sup> | 1.1 (1.8) <sup>a</sup>  | 6.3 (11.9) <sup>ab</sup> | 96.6 (80.4) <sup>a</sup>   |
|             | 37500 cells ml <sup>-1</sup>  | 13.8(9.3) <sup>b</sup>     | 13.7(9.1) <sup>b</sup>     | 0.0 (0.0) <sup>b</sup>  | 0.2 (0.6) <sup>ac</sup>  | 0.0 (0.0) <sup>b</sup>     |

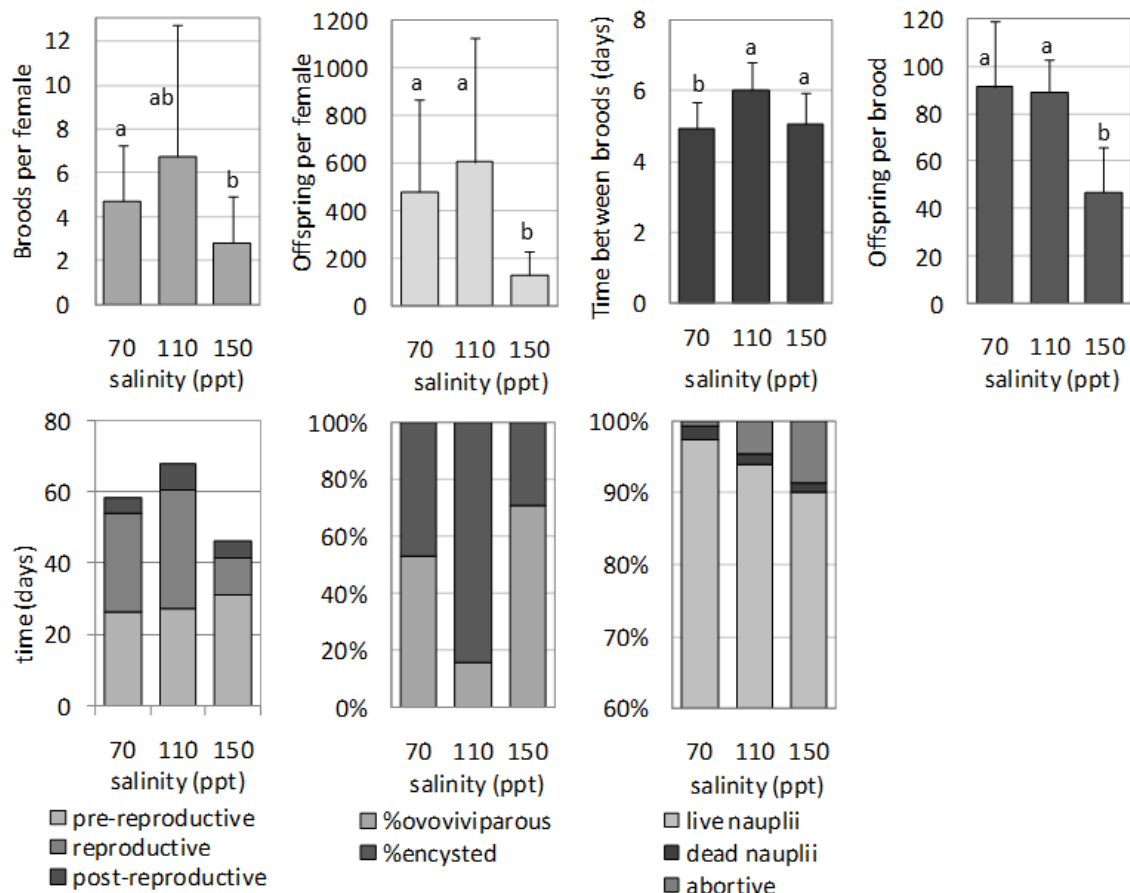


Figure 2 - Mean life cycle and reproductive parameter values, depending on experimental salinity. SD bars are presented for brood and offspring data; different letters indicate significant differences between treatment levels. See Tables 2 and 3 for mean values, SD and test results for life cycle periods, offspring type and quality.

*A. parthenogenetica* showed an approximate balance between oviparism and ovoviviparism at 70 ppt but at salinities of 110 ppt and 150 ppt oviparity (84%) and ovoviviparity (71%) dominated, respectively (Fig. 2). Notice that the quality of the ovoviviparous offspring decreased when salinities exceeded 70 ppt, showing higher percentage of abortive embryos and lower percentage of live nauplii (Fig. 2).

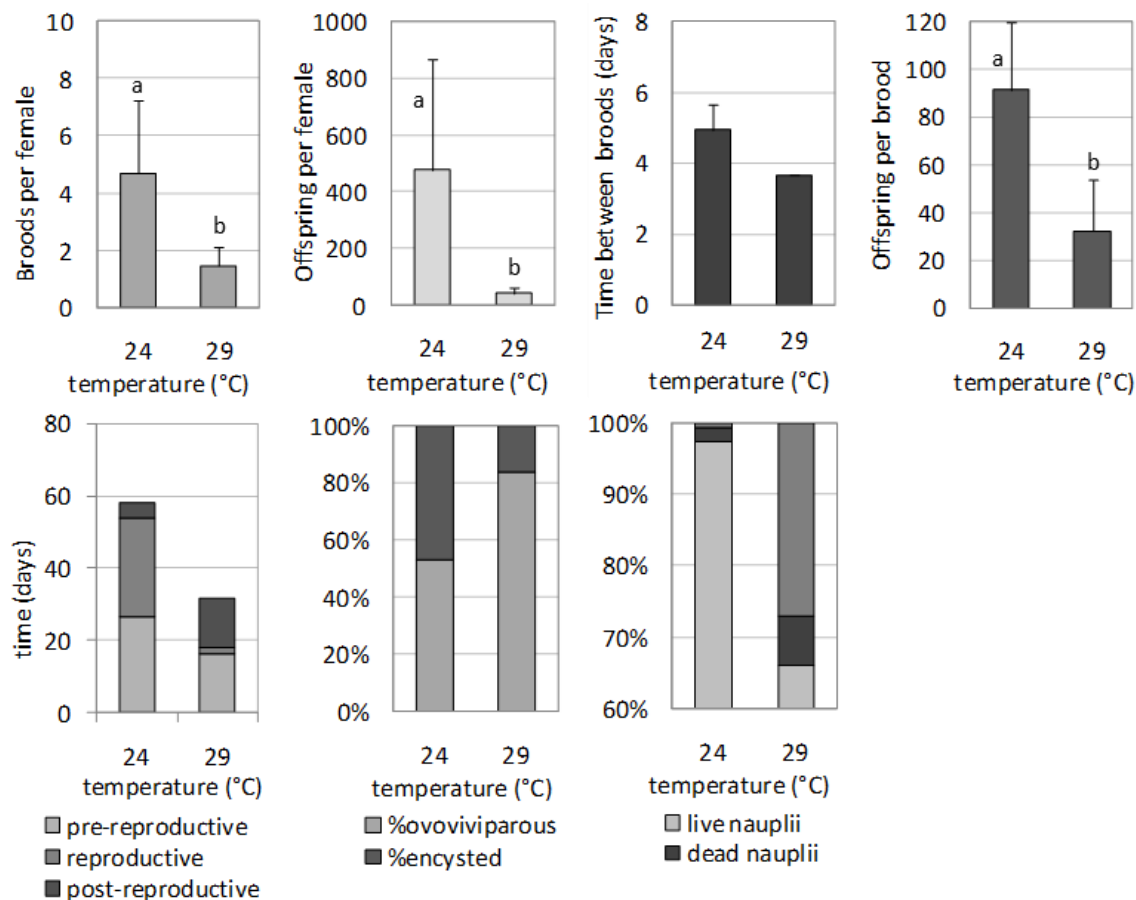


**Figure 3 - Mean life cycle and reproductive parameter values, depending on experimental temperature. SD bars are presented for brood and offspring data; different letters indicate significant differences between treatment levels (there is no test result for Time between broods, because only one female had more than 2 broods at 29°C). See Tables 2 and 3 for mean values, SD and test results for life cycle periods, offspring type and quality.**

At 29°C, all the studied reproductive outputs were severely affected when compared to 24°C (Fig. 3). There was a predominance of ovoviviparity (81%), but the number of ovoviviparous offspring per female was much lower than at 24°C (Table 3). From 24°C to 29°C the percentage of abortive embryos increased (from 1% to 27%) and that of live nauplii decreased (from 97% to 66%) (Fig. 3).

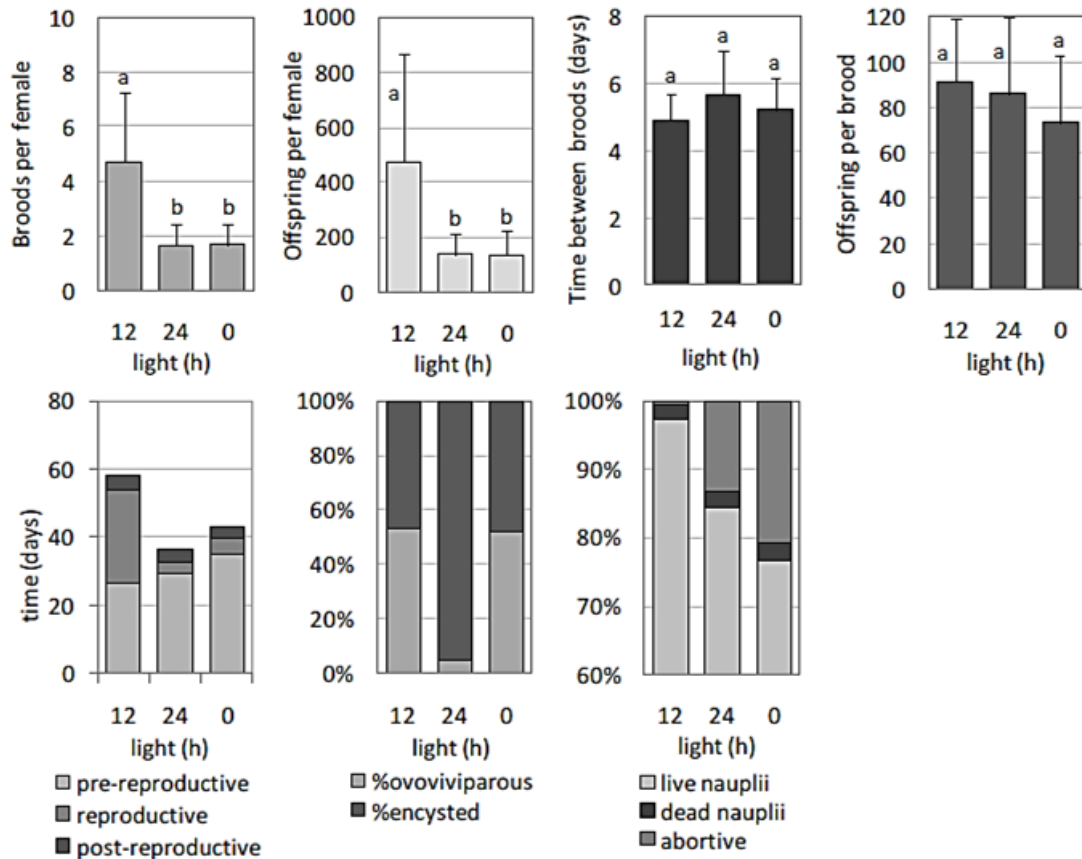


**Figure 4 - Mean life cycle and reproductive parameter values, depending on experimental photoperiod. SD bars are presented for brood and offspring data; different letters indicate significant differences between treatment levels. See Tables 2 and 3 for mean values, SD and test results for life cycle periods, offspring type and quality.**

Under constant light or darkness (24:0h L:D and 0:24h L:D photoperiods), all of the studied reproductive characteristics were significantly affected when compared to the 12:12h L:D photoperiod, except the number of offspring per brood which was similar for all photoperiods ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4). Photoperiod also influenced the mode of reproduction of *A. parthenogenetica*. The number of ovoviviparous offspring was significantly lower in constant light or darkness (Table 3). The percentage of ovoviviparous and oviparous offspring was similar for the 12:12h L:D and 0:24h L:D photoperiods, but under constant illumination (24:0h L:D photoperiod), 95% of the total offspring were cysts. Under constant light or darkness, the percentages of live nauplii was lower than that observed for the 12:12h L:D photoperiod (Fig. 4).

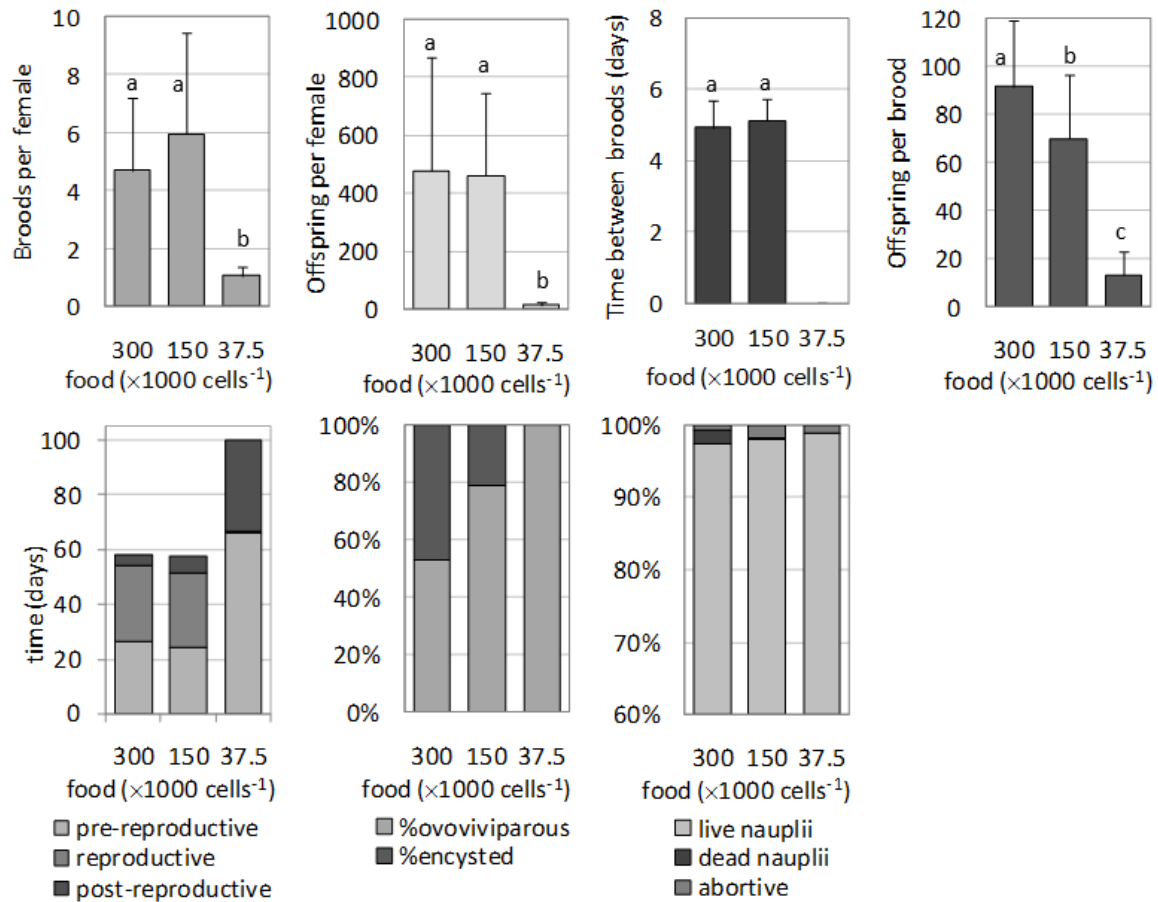


Figure 5 - Mean life cycle and reproductive parameter values, depending on experimental food supply. SD bars are presented for brood and offspring data; different letters indicate significant differences between treatment levels (there is no test result for Time between broods for the lowest food supply, because no female had more than 1 brood under that condition). See Tables 2 and 3 for mean values, SD and test results for life cycle periods, offspring type and quality.

A limited availability of food (37500 cells *T. suecica* ml<sup>-1</sup>) negatively affected all reproductive outputs of *A. parthenogenetica* (Fig. 5, Table 3). The quantity of food supplied also influenced the dominant mode of reproduction. The percentage of ovoviviparity increased and the percentage of oviparity decreased with increasing food concentration (Fig. 5). When fed with a concentration of 37500 cells ml<sup>-1</sup>, *A. parthenogenetica* reproduced only by ovoviviparity, with a very low number of total offspring per female (13.8±9.3). When fed with a concentration of 150000 cells ml<sup>-1</sup>, ovoviviparity was also the dominant mode of reproduction (79%) but the total number of ovoviparous and oviparous offspring produced per female did not significantly differ from the values found for an abundant food supply (300000 cells ml<sup>-1</sup>). The quality of the ovoviviparous offspring of both modes of reproduction was not much affected by the quantity of food supplied (Fig. 5).

### 3.3. Demographics Parameters

Survival curves ( $l_x$ ) showed that *Artemia* live longer at 110 ppt salinity, 24°C temperature, 12:12h L:D photoperiod and with a low concentration of *Tetraselmis suecica* (37500 cells ml<sup>-1</sup>), compared to the other treatment levels (Fig. 6).

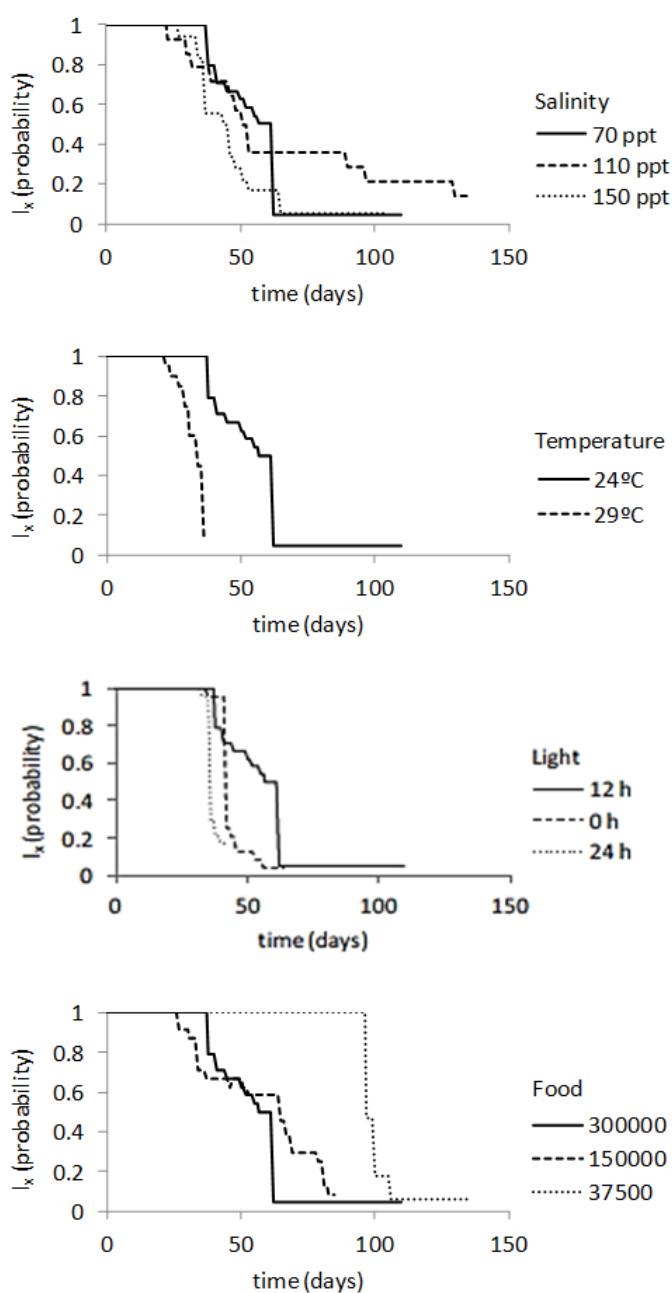


Figure 6 - Survival function ( $l_x$ ), depending on experimental conditions.

Considering the different culture conditions (salinities, temperatures, food densities and photoperiods), the demographic parameters  $T$ ,  $R_0$  and  $r$  obtained from the *A. parthenogenetica* life tables showed significant ( $p < 0.05$ ) differences amongst all treatment levels (Fig. 7).

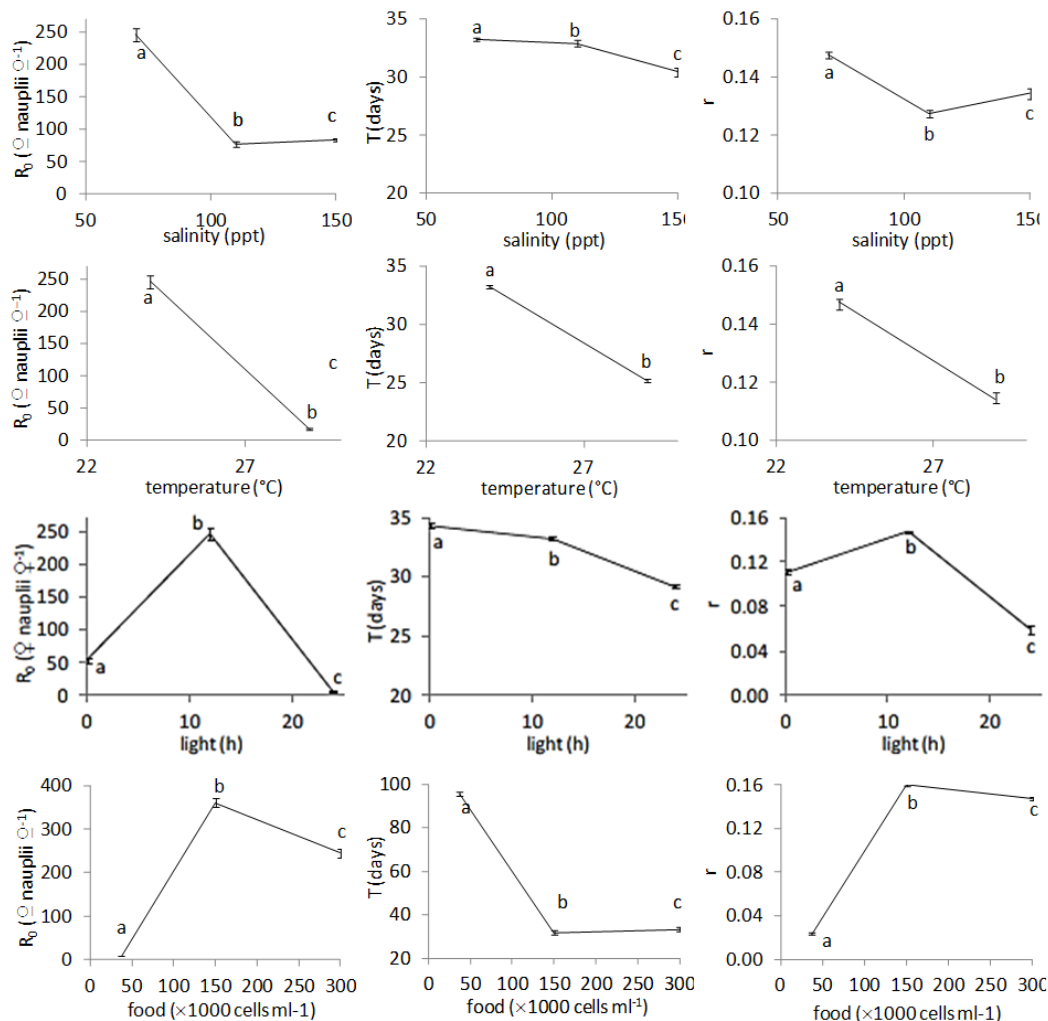


**Figure 7 - Demographic parameters:** mean values ( $\pm$ SD) of the net reproductive rate ( $R_0$ ; number of daughters that replace an average female in the course of a generation), mean generation time ( $T$ ; the average length of time between the birth of a female and the birth of her daughters), and intrinsic rate of natural increase ( $r$ ), depending on experimental conditions. Different letters indicate significant differences between treatment levels.

The mean generation time, period elapsed between the birth of a female and the production of the first offspring ( $T$ ), decreased markedly with increasing temperature (from 24°C to 29°C) and slightly increasing the salinity to 150 ppt (at 70 and 110 ppt the  $T$  values were quite similar) (Fig. 7).  $T$  was higher for the lower food supply (37500 cells ml<sup>-1</sup> *Tetraselmis suecica*), decreasing sharply with intermediate and high food supply.  $T$  decreased with increasing hours of light-

The net reproductive rate ( $R_0$ ) decreased markedly for medium to high salinities, food shortage and high temperature and extreme light conditions. High  $R_0$  values were obtained in the 12:12h L:D photoperiod and 150000 cells ml<sup>-1</sup> treatments (Fig. 7).

The intrinsic rate of natural increase ( $r$ ) was significantly higher at 70 ppt salinity and, 24°C temperature, 12:12h L:D photoperiod (Fig. 7). Organisms fed with 37500 cells ml<sup>-1</sup> showed significantly lower  $r$  values than those fed with higher food concentrations (Fig. 7).

#### 4. Discussion

Temperature and salinity are the most important environmental factors that influence the life cycle of marine organisms (Browne and Wanigasekera, 2000) but this study shows that light and food concentration also influence reproductive characteristics and demographic parameters.

Although some of the responses found were different from those published earlier (Barata *et al.*, 1996a, 1996b; Browne and Wanigasekera, 2000; Browne *et al.*, 1984; Wear and Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986) this may be explained by variations in the methodology or by the intrinsic characteristics of this particular strain of *A. parthenogenetica*.

Our findings show that *A. parthenogenetica* from Rio Maior is better adapted to moderate salinities and temperatures than to extreme ones. Amat *et al.* (1995) came to similar conclusions when monitoring parthenogenetic diploid strains from Spain. Temperatures around 24°C are likely to be optimal for survival and reproduction for most *Artemia* species but *A. franciscana* is also a good performer at both low (e.g., Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Wear and Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986) and high (e.g., Browne and Wanigasekera, 2000; Quynh and Lam, 1987) temperatures. Also, according to previous studies, when subjected to a broad range of salinities, *A. franciscana* seems to be a better performer, in terms of survival and reproductive characteristics, than other bisexual and parthenogenetic strains (e.g., Soniraj, 2004; Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Wear and Haslett, 1986; Wear *et al.*, 1986).

In our study, the reproductive characteristics assessed, the length of the pre-reproductive and the reproductive periods, and the total life span were similar at 70 and 110 ppt. Previous studies on the effect of salinity on the life cycle parameters of *A. franciscana* and *A. parthenogenetica* strains concluded that the maturation time was longer at higher salinities (e.g., Soniraj, 2004; Triantaphyllidis *et al.*, 1995), what was

confirmed our study for *A. parthenogenetica* kept at 150 ppt. *Artemia* can maintain osmotic homeostasis at high salinities and the consequently increased energy requirement may affect other functions such as growth and reproduction (El-Magsodi *et al.*, 2005). This explains why the reproductive period, total life span and important reproductive outputs such as total number of broods per female and offspring per female and per brood, were significantly affected by higher salinity treatment (150 ppt). The post-reproductive period had a similar duration at all salinity levels, showing that salinity does not affect it (Sonijah, 2004).

The two modes of reproduction of *A. parthenogenetica* were almost balanced at 70 ppt, whereas there was a clear dominance of oviparous reproduction at 110 ppt. Thus, *A. parthenogenetica* from Rio Maior responded to increased salinity (from 70 ppt to 110 ppt) moving from naupliar to cyst production. Although, at 150 ppt, ovoviviparity was the dominant mode of reproduction, it is important to refer that the number of broods at this salinity was very low and that *Artemia* females tend to reproduce by ovoviviparity in early life.

Amat *et al.* (2007) also studied the qualitative reproduction of *A. parthenogenetica* in terms of percentage of total ovoviviparous and oviparous offspring using similar experimental conditions (70 ppt salinity; 24°C; 12L:12D), except for the type of food provided (mixture of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella salina*). They concluded that, at their experimental conditions, about 80% of the offspring was cysts. This may also be related to the quality of the food used, since it has been recognized that food quality and quantity can induce oviparity in *Artemia* (e.g., D'Agostino and Provasoli, 1968).

The entire life cycle of *A. parthenogenetica* were negatively affected by increased temperature (29°C). Similar results were obtained for other species and strains, especially *A. franciscana* (e.g., Abatzopoulos *et al.*, 2003a; Medina *et al.*, 2007; Triantaphyllidis *et al.*, 1995). These authors supported their assertion claiming that *Artemia* could display a r-strategy of reproduction: an increase in temperature implies a reduction of pre-reproductive and reproductive periods, and life span, requiring a large number of offspring within the shortest time. The same cannot be said for *A. parthenogenetica* since its fecundity was severely affected at 29°C, where the ovoviviparous mode of reproduction clearly dominated over the oviparous one. Similar results were obtained by Abatzopoulos *et al.* (2003b) for a tetraploid *A. parthenogenetica* population from Greek saltworks, at a temperature of 30°C. A simple explanation for this is the fact that the number of broods at this temperature was extremely low ( $1.5 \pm 0.7$ ) and it is well known that *Artemia* females in their first and/or

second brood are mainly ovoviviparous (Abatzopoulos *et al.*, 2003b). Vanhaecke *et al.* (1984) studied the combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* from different geographical origins, and concluded that temperature is the most important factor to affect survival, with *A. parthenogenetica* strains not surviving temperatures exceeding 30°C. The same was evidenced in this study at 34°C.

The quality of the ovoviviparous offspring should also be considered when estimating the reproductive success. For *A. parthenogenetica*, there was a significant decrease in quality of ovoviviparous offspring at higher salinities (110 and 150 ppt) and temperature (29°C), with a lower percentage of live nauplii and a higher percentage of abortive embryos showing a suspended development, compared to the lower salinity (70 ppt) and temperature (24°C) levels.

Photoperiod is also a factor that influence life cycle (Asil *et al.*, 2013; Villamizar *et al.*, 2012) and it is known that this strain shows low survival at total darkness (Pinto *et al.*, 2013). Once it is difficult that total light or darkness occur in the environment, so it doesn't seem to be the most important factor related to invasiveness.

Provasoli and Pintner (1980) noticed that both continuous light and darkness favoured ovoviviparity and oviparity (such as Nambu *et al.*, 2004), respectively, in *A. franciscana* from the Great Salt Lake (Utah, USA). For *A. parthenogenetica* from Rio Maior, the percentages of ovoviviparity and oviparity were similar under 12L:12D conditions, but at constant light, nearly all offspring was oviparous. The quality of the ovoviviparous offspring was also affected by constant darkness and constant light, showing a higher percentage of abortive nauplii.

According to Abatzopoulos *et al.*, (2006), animals that breed in laboratory conditions generally attain sexual maturity 3-4 weeks after hatching. In our study, food shortage caused a marked delay in the development of *A. parthenogenetica* (the first brood occurred after 66 days). In addition, the mean reproductive period was less than 1 day and all the studied reproductive outputs showed significantly lower values than those observed for higher food concentrations. It has been confirmed that *Artemia* specimens whose reproduction is not made because of castrating parasitism (strategy, by a parasite, of blocking reproduction, completely or in part, by its host) generally present a longer lifespan than usual, redirecting the energy invested in reproduction to obtain a higher lifespan (Amat *et al.*, 1991). Similarly, and since *Artemia* does not reproduce under limiting feeding conditions (375000 cells ml<sup>-1</sup>), it is likely that that energy is used to survive for a longer periods of time as it was shown in our study, where the total lifespan and the pre and post-reproductive periods were longer.

Several authors consider that insufficient food is the determining factor for *Artemia* to select the oviparous mode of reproduction (e.g., Amat, 1985; D'Agostino and Provasoli, 1968; Roman and Rodriguez, 1986). We observed an increase in the percentage of ovoviviparous reproduction and a decrease in the percentage of oviparous reproduction with decreasing food concentrations. Under severe food shortage, *A. parthenogenetica* reproduced exclusively through ovoviviparity, where its reproduction had been expected to be mostly by oviparity. The explanation for this result lies in the extremely low number of broods per female produced in this trial ( $1.1 \pm 0.3$ ). According to Amat (1985) most *Artemia* species reproduce primarily by ovoviviparity under favorable environmental conditions, especially when there is no food limitation, but they switch to oviparity when unfavourable environmental conditions threaten the ovoviviparous reproduction. D'Agostino and Provasoli (1968) ascertained that the diploid bisexual *A. franciscana* of Great Salt Lake (Utah, USA) and the tetraploid parthenogenetic strain from Comacchio (Italy) showed oviparous reproduction invariably correlated with periods in which ovulation coincided with fasting phases or abundant food. The same conclusions were presented by McDermott (1974) for the diploid bisexual *A. franciscana* of San Francisco Bay (California, USA) saltworks, by Lenz (1980) for the bisexual *A. franciscana* of Mono Lake (California, USA), and by Ballardin and Metalli (1963) for the diploid parthenogenetic strain of Santa Gilla (Cagliari, Sardinia, Italy). In our experiments, abundant food supply caused similar percentages of ovoviviparous and oviparous reproduction. Ovoviviparous reproduction tended to become dominant with the decreasing of food supply. The quality of the ovoviviparous offspring of both modes of reproduction was not negatively affected by food density. During laboratory competition experiments with incorporating intra- and interspecific variability as well as variation in food level, *A. franciscana* swiftly eliminated parthenogenetic strains in 91% of the scorable trials (Browne and Halanych, 1984).

The studied demographic parameters are usually analysed considering the results gathered for the life cycle and reproductive parameters obtained from life tables. As expected, *A. parthenogenetica* survival ( $l_x$ ) was longer for the experimental conditions that allowed a longer life span (e.g., at 110 ppt, 24°C, 12L:12D and 37500 cells ml<sup>-1</sup> *T. suecica*). The mean generation time ( $T$ ) generally reflects the length of the pre-reproductive period; e.g., it tends to be longer when the pre-reproductive period is longer. This pattern was observed for all treatment parameters except salinity in which  $T$  was inferior at 150 ppt whilst the pre-reproductive period was superior when compared with the remaining tested salinities.

Both the intrinsic rate of natural increase ( $r$ ) and the net reproductive rate ( $R_0$ ) estimate population growth, but  $r$  is scaled to time, whereas  $R_0$  is scaled per generation and is independent from time (Huey and Berrigan, 2001). Hence, elevated  $r$  values were obtained in conditions where ovoviparous offspring per female was more abundant, except for the salinity of 150 ppt. In 150 ppt, although the amount of ovoviparous offspring is similar to that obtained at 110 ppt, the value of  $r$  is higher because the lifetime in 150 ppt was smaller than in 110 ppt, improving the value of  $r$ . As expected, high  $R_0$  values reflected high naupliar production in *Artemia*; these were observed in conditions in which ovoviparous offspring per female was abundant, especially at 70 ppt, 24°C, 12L:12D, 150000 cells ml<sup>-1</sup> food supply .

## Conclusions

*Artemia parthenogenetica* from Rio Maior presents adaptive and tolerance mechanisms to well defined ranges of environmental conditions. As it was shown in Pinto *et al.*, 2013, regarding to survival, *A. parthenogenetica* from Rio Maior is more resistant than *A. franciscana* at 24 °C, 150 ppt and 37 500 cells ml<sup>-1</sup>. These conditions are usually found in Rio Maior, so it is possible that this special biotope constitute himself a barrier to invasion. Furthermore, we must consider the geographical inland location of the Rio Maior salinas, which lies far from main bird migration routes and aquaculture industries, reducing the possibility of an accidental introduction (Amat *et al.*, 2007).

Although the success of invasive species has been linked to biological characteristics of the invaders or to the environmental conditions of the receptor region, a new trend is now focusing on chemical signalling processes and their significant importance to invasive species colonization, perpetuation and expansion in a new region. The study of the role of chemical signals as potential regulators of competitive interactions and, by extent, in population regulation and community structure, has never been contemplated in the genus *Artemia* and its study may fine-tune our current understanding in the establishment and spread of invasive species.

Although not all of the questions related to this particular population have been solved yet, the results obtained in this study are of both fundamental and practical value, providing ecological insight and suggestions for more studies related to invasiveness.

## References

- Abatzopoulos, J.T., Triantaphyllidis, G.V., Roedaki, N., Baxevanis, A.D., Triantaphyllidis, A., Sorgeloos, P., 2003a. Elevated salinities may enhance the recovery of hydrated heat-shocked *Artemia franciscana* cysts. LXV. International Study on *Artemia*. Belg. J. Zool. 133, 103-110.
- Abatzopoulos, J.T., Baxevanis, D.A., Triantaphyllidis, V.G., Criel, G., Pador, L.E., Van Stappen, G., Sorgeloos, P., 2006. International Study on *Artemia*. LXIX. Quality evaluation of *Artemia urmiana* Günther (Urmia Lake, Iran) with special emphasis on its particular cyst characteristics. Aquaculture 254, 442-454.
- Abatzopoulos, T.J., El-Bermawi, N., Vasdekis, C., Baxevanis, A.D., Sorgeloos, P., 2003b. International Study on *Artemia*. LXVI. Effects of salinity and temperature on reproductive and life span characteristics of clonal *Artemia*. Hydrobiologia 492, 191-199.
- Agh, N., Van Stappen, G., Bossier, P., Yari, A.M., Rahimian, H., Sorgeloos, P., 2008. Life cycle characteristics of six *Artemia* populations from Iran. Aquac. Res. 1-13.
- Amat, F., 1985. Biología de *Artemia*. Inf. Tec. Inst. Invest. Pesq. 126-127, p. 60.
- Amat, F., Barata, C., Hontoria, I., 1995. Biogeography of genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. Int. J. Salt Lake Res. 3, 175-190.
- Amat, F., Gozalbo, A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Varó, I., 1991. Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism Hydrobiologia 121, 39-44.
- Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., Vieira, N., Mura, G., 2007. Biodiversity loss in the Genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. Limnetica 26, 177-194.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sanchez, M.I., Figuerola, J., Hortas, F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the Western Mediterranean Region. Biol. Invasions 7, 37-47.
- Asil, S.M., Fereidouni, A.E., Ouraji, H., Khalili, K.J., 2013. Effects of different light intensities on growth, survival, reproductive and life span characteristics of *Artemia urmiana* (Günther 1890). Aquac. Res. 44, 554-566.
- Ballardin, E., Metall, P., 1963. Osservazioni sulla biologia di *Artemia salina* Leach. Tecniche di colture e fenomeni riproduttivi. Istituto Lombardo (Rend. Sci.) 97(B), 194-254.
- Barata, C., Hontoria, F., Amat, F., Browne, R.A., 1996a. Demographic parameters of sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 196, 329-340.
- Barata, C., Hontoria, F., Amat, F., Browne, R., 1996b. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 196, 313-328.
- Browne, R., Bowen, S., 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*, in: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N. (Eds.), *Artemia* Biology. CRC Press, Boca Raton, Florida. 9, pp. 221-235.
- Browne, R.A., Davis, L.E., Sallee, S.E., 1988. Effects of temperature and relative fitness of sexual and asexual brine shrimp *Artemia*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 124, 1-20.
- Browne, R.A., Halanych, K.M., 1984. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation (Branchiopoda, Anostraca). Crustaceana 57, 57-71.
- Browne, R.A., Sallee, S.E., Grosch, D.S., Segreti, W.O., Purser, S.M., 1984. Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. Ecology 65, 949-960.
- Browne, R.A., Wanigasekera, G., 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 244, 29-44.

- Calado, C., Brandão, J.M., 2009. Salinas interiores em Portugal: o caso das marinhas de Rio Maior. *Geonovas* 22, 45-54.
- D'Agostino, A.S., Provasoli, L., 1968. Effect of salinity and nutrients on mono- and diaxenic cultures of two strain of *Artemia salina*. *Biol. Bull.* 134, 1-14.
- Ecosal-Atlantis, 2012. (last access February 2012), <http://ecosal-Atlantis.ua.pt/>.
- El-Magsodi, M.O., El-Ghebli, M.O., Enbaya, M.A., Hamza, M., Drebiga, U.A., Sorgeloos, P., 2005. Reproductive and lifespan characteristics of *Artemia* from Libyan Abu Kammash Sabkha. *Libyan J. Mar. Sci.* 10, 1-8.
- Fabregas, J., Herreo, C., Cabezas, B., Abalde, A., 1984. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* with high nutrient concentrations. *Aquac. Res.* 49, 231-244.
- Herbold, B., Moyle, P., 1986. Introduced species and vacant niches. *Am. Nat.* 125, 751-760.
- Hollander, M., Wolfe, D.A., 1973. Non-parametric statistical methods. New York: John Wiley & Sons., pp. 68-75.
- Huey, R.B., Berrigan, D., 2001. Temperature, demography and ectotherm fitness. *Am. Nat.* 158(2), 204-210.
- Hufbauer, R.A., 2008. Biological invasions: paradox lost and paradise gained. *Curr. Biol.* 18(6), R246-247.
- Lenz, P.H., 1980. Ecology of an alkali-adapted variety of *Artemia* from Mono Lake, California, U.S.A., in: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The brine shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*. Universa in Aquaculture, Wetteren, Belgium. 3, pp. 79-96.
- Lenz, P.H., Browne, R.A., 1991. Ecology of *Artemia*, in: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N. (Eds.), *Artemia Biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 237-253.
- McDermott, M.J., 1974. Trehalose and glycogen accumulation in cryptobiotic stages of three invertebrates. M. S. Thesis. Biology. St. John's University, New York, p. 62.
- Medina, G., Goenaga, J., Hontoria, F., Cohen, G., Amat, F., 2007. Effects of temperature and salinity on prereproductive life span and reproductive traits of two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Argentina: *Artemia franciscana* and *A. persimilis*. *Hydrobiologia* 579, 41-53.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S., 1986. Estimating Uncertainty in Population Growth Rates: Jackknife vs. Bootstrap Techniques. *Ecology* 67(5), 1156-1166.
- Mura, G., Kappas, I., Baxevanis, A., Moscatello, S., D'Amico, Q., Medina, G., Hontoria, F., Amat, F., Abatzopoulos, T.J., 2006. Morphological and Molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savoia salterns (Italy). *Int. Rev. Hydrobiol.* 91(6), 539-554.
- Naceur, H.B., Jenhani, A.B.R., Romdhane, M.S., 2011. Influence of some environmental factors on *Artemia salina* life cycle and morphology in Sabkhet El Adhibet (southeast Tunisia). *Biological Lett.* 48, 67-83.
- Nambu, Z., Tanaka, S., Nambu, F., 2004. Influence of photoperiod and temperature on reproductive mode in the Brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology* 301 (6), 542-546.
- Occhipinti-Ambrogi, A., Savini, D., 2003. Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 542-551.
- Pinto, P., Amat, f., Almeida, V., Vieira, N., in press. Review of the biogeography of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Portugal. *International Journal of Artemia Biology*.
- Pinto, P.M., Bio, A., Hontoria, F., Almeida, V., Vieira, N., 2013. Portuguese native *Artemia parthenogenetica* and *Artemia franciscana* survival under different abiotic conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 440 (2013) 81-89.

- Quynh, V.D., Lam, N.N., 1987. Inoculation of *Artemia* in experimental ponds in central Vietnam: an ecological approach and a comparison of three geographical strains, in: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decleir, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* research and its applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa in Aquaculture, Wetteren, Belgium. 3, pp. 253-269.
- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>.
- Rodrigues, C.M., Bio, A.M., Amat, F.D., Monteiro, N.M., Vieira, N.M., 2012. Surviving an invasion: characterization of one of the last refugia for *Artemia* diploid parthenogenetic strains. *Wetlands* 32(6), 1079-1090.
- Roman, J.M., Rodriguez, A., 1986. Cultivo de *Artemia* en estanques de salinas de Cádiz (SO de España). *Invest. Pesq.* 50(3), 407-419.
- Soniraj, N., 2004. Effect of salinity on the life span and reproductive characteristics of brine shrimps in the salt pans at Tuticorin. *J. Mar. Biol. Ass. India* 46(2), 133-140.
- 'Triantaphyllidis, G.V., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T.J., Perez, C.A.P., Sorgeloos, P., 1995. International study on *Artemia*. XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia* 302, 215-227.
- Van Stappen, G., 2002. Chapter IV. Zoogeography, in: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg J.S., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia* basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 171-224.
- Vanhaecke, P., Siddall, E., Sorgeloos, P., 1984. International study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 80, 259-275.
- Villamizar, N., García-Mateos, G., Sánchez-Vázquez, F., 2011. Behavioral responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and *Artemia* sp. exposed to constant light or darkness vs. light/dark cycles of white, red or blue wavelengths. *Aquaculture* 317 (1–4), 197–202.
- Wear, R.G., Haslett, S.J., 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* Kellogg from Lake Grassmere, New Zealand. I. Growth and mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98, 153-166.
- Wear, R.G., Haslett, S.J., Alexander, N.L., 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* Kellogg from Lake Grassmere, New Zealand. II. Maturation, fecundity and generation times. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98, 167-183.
- Varó, I., Taylor, A.C., Amat, F., 1993. Comparison of two methods for measuring the rates of oxygen consumption of small aquatic animals (*Artemia*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 106(3), 551-555.
- Varó, I., Taylor, A.C., Amat, F., 1998. The effects of temperature and oxygen tension (PO<sub>2</sub>) on the oxygen consumption rates of adults of different *Artemia* strains. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120(2), 385-390.
- Varó, I., Taylor, A.C., Navarro, J.C., Amat, F., 1991. Effects of temperature and oxygen tension on oxygen consumption rates of nauplii of different *Artemia* strains. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76, 25-31.







## CAPÍTULO 2.

**INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA REPRODUÇÃO DE *Artemia franciscana* E *Artemia parthenogenetica* DE AVEIRO**



## 2.1. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1.1. Amostragem

*Artemia parthenogenetica* diploide adulta (figura 6) foi recolhida na salina da Marinha da Troncalhada (40°39'43.78"N; 8°43'11.35"W; Norte de Portugal), pertencente ao complexo de salinas de Aveiro, e na salina interior de Rio Maior (39°21'49.90"N; 8°56'38.93"W; Centro de Portugal), em Abril. Em Rio Maior, os indivíduos foram recolhidos de um cristalizador (44ppt), e em Aveiro, de um evaporador (49 ppt), com uma rede de zooplâncton (160µm). A *Artemia* recolhida foi colocada em arcas térmicas contendo água da salina e transportada para o laboratório.

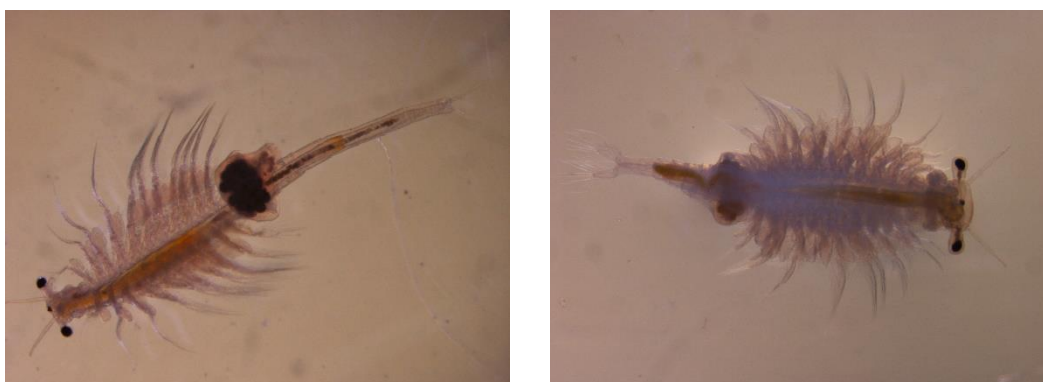


Figura 6 - Pormenor de fêmea adulta de *Artemia parthenogenetica* de Aveiro (à esquerda) e de Rio Maior (à direita)

### 2.1.2. Manutenção de *Artemia* em laboratório

Os indivíduos das duas populações foram mantidos em laboratório e aclimatados às condições *standard*: 24°C, 70ppt, fotoperíodo 12:12h e *Tetraselmis suecica*, como alimento (Amat *et al.*, 2007).

A microalga foi cultivada em balões de 6L, com água do mar (35±1ppt) filtrada e autoclavada, enriquecida com nutrientes, de acordo com Fábregas *et al.*, 1984 (tabela 1), na proporção de 1:100. Os balões foram colocados com aeração e luz constantes, numa sala sem temperatura controlada, mas termicamente estável, a 18±1°C.

Os meios das culturas de *Artemia* eram renovados a cada dois dias, com o intuito de recolher os quistos e remover os animais mortos acumulados, por forma a evitar a

acumulação de matéria orgânica, que se poderia tornar nociva para a cultura. Os quistos recolhidos eram colocados em salmoura para desidratar e depois eram tratados para armazenar.

**Tabela 1 - Composição do meio de cultura Fábregas *et al.* (1984) para o cultivo de *Tetraselmis suecica*. Dosagem de nutrientes necessária para obter um litro de meio de cultura.**

| Meio de cultura (Fábregas <i>et al.</i> , 1984) |        |                                                     |         |
|-------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------|---------|
| NO <sub>3</sub> Na                              | 17g    | MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 24,2mg  |
| PO <sub>4</sub> HNa.2H <sub>2</sub> O           | 1,6g   | Cl <sub>3</sub> Co                                  | 2,375mg |
| TRIS                                            | 1,8g   | SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O                | 2,49mg  |
| Citrato férrico                                 | 0,67g  | Tiamina                                             | 3,5mg   |
| EDTA                                            | 908mg  | Biotina                                             | 0,5mg   |
| Cl <sub>2</sub> Zn                              | 13,6mg | Vitamina B12                                        | 0,3mg   |
| Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O            | 19,7mg |                                                     |         |

### 2.1.3. Montagem experimental

Após serem recolhidos quistos suficientes, estes foram eclodidos em água do mar com salinidade de 35 ppt, a 28°C, com luz e aeração constantes (Amat *et al.*, 2007). Simultaneamente, foram colocados a eclodir quistos comerciais de *A. franciscana* (Ocean Nutrition™, Great Salt Lake).

Para cada tratamento, foram transferidos para recipientes com 1L de água, 300 náuplios recém-eclodidos (até 24h de vida).

As experiências foram efetuadas de forma a avaliar cada variável independentemente, partindo-se de uma condição *standard* (condição 1 – tabela 2) e variando apenas um parâmetro de cada vez. Todas as condições testadas estão representadas na tabela 2.

**Tabela 2 – Condições experimentais de cultura, sendo o tratamento 1 o tratamento base. Apenas um parâmetro foi alterado de cada vez.**

| Condição de cultura | Salinidade (ppt) | Temperatura (°C) | Luz (h) | Alimento (células ml <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|------------------|------------------|---------|--------------------------------------|
| 1                   | 70               | 24               | 12      | 300000                               |
| 2                   | 110              | 24               | 12      | 300000                               |
| 3                   | 150              | 24               | 12      | 300000                               |
| 4                   | 70               | 29               | 12      | 300000                               |
| 5                   | 70               | 34               | 12      | 300000                               |
| 6                   | 70               | 24               | 0       | 300000                               |
| 7                   | 70               | 24               | 24      | 300000                               |
| 8                   | 70               | 24               | 12      | 150000                               |
| 9                   | 70               | 24               | 12      | 37500                                |

As soluções a diferentes salinidades (70, 110 e 150 ppt) foram preparadas usando água do mar e Tropic Marin Sea Salt e acertadas com um refratómetro. Para controlar as temperaturas (24, 29 e 34°C  $\pm 1^\circ\text{C}$ ), foram usados sistemas de banho-maria, controlados com um termostato. A microalga *Tetraselmis suecica* foi cultivada de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. Foi utilizada uma câmara de Neubauer modificada para contar o número de células, antes de se procederem às diluições necessárias, até se atingirem as concentrações pretendidas (tabela 2). A salinidade da solução de microalgas foi acertada com Tropic Marin Sea Salt, para não haver diluição do meio final. De referir que a concentração de alimento foi independente do número de indivíduos, por isso, com o decorrer da experiência e aumento da mortalidade, o alimento disponível por indivíduo era maior.

O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, em cada espécie e tratamento.

Quando as fêmeas atingiram a maturidade, apresentando a formação do saco ovífero, foram individualizadas, em *falcons* de 50mL, 30 fêmeas (30 casais, no caso de *A. franciscana*) de cada cultura, e mantidas nas mesmas condições em que cresceram, por forma a determinar os parâmetros reprodutivos e demográficos e os períodos de vida. No caso de *Artemia franciscana*, os machos sobranes eram mantidos nas mesmas condições de cultura, para reporem eventuais machos que morressem.

#### 2.1.4. Parâmetros reprodutivos e períodos de vida

As fêmeas foram monitorizadas até à sua morte. Foram avaliadas as seguintes características: períodos pré-reprodutivo (tempo até à primeira ninhada), reprodutivo (tempo decorrido entre a primeira e a última ninhada) e pós-reprodutivo (tempo entre a última ninhada e a morte) e tempo total de vida (desde a eclosão até à morte), em dias. As características reprodutivas monitorizadas foram: tempo entre ninhadas (em dias), o número de ninhadas por fêmea, e o total de descendentes por fêmea (produzidos por cada fêmea, durante o seu período reprodutivo) e por ninhada (Amat *et al.*, 2007; Browne *et al.*, 1988; Browne *et al.*, 1984). O tempo entre ninhadas foi calculado considerando apenas fêmeas com 3 ou mais ninhadas, uma vez que são necessários mais do que dois valores para calcular médias.

Também foram calculados os totais de descendentes ovovivíparos e ovíparos de cada fêmea. O tipo de reprodução (ovovivípara/ovípara) e a qualidade da descendência ovovivípara (náuplios vivos, mortos ou abortos) foram avaliados.

#### 2.1.5. Parâmetros demográficos

O tempo médio geracional ( $T$  - período médio de tempo decorrido entre o nascimento de uma fêmea e o nascimento da primeira descendência), a taxa líquida de reprodução ( $R_0$  - média do número de ninhadas produzidas por uma fêmea durante todo o seu ciclo de vida), a sobrevivência ( $l_x$  - probabilidade de sobrevivência no tempo  $x$ ) e a taxa de crescimento intrínseco ( $r$  - diferença entre a taxa de mortalidade e natalidade de uma população – dependente das variáveis  $R_0$  e  $T$ ) foram calculados através de uma folha de cálculo, seguindo as equações descritas por Meyer *et al.* (1986).

Quando nenhuma das fêmeas apresentava sinais de maturação sexual, os parâmetros demográficos e reprodutivos não eram calculados.

Apenas os náuplios foram considerados para o cálculo dos parâmetros demográficos, uma vez que os quistos se encontram em diapausa, não contribuindo para o crescimento da população no imediato.

### 2.1.6. Análise estatística

As médias e desvios-padrão dos períodos de vida e da descendência foram comparados separadamente para cada condição de cultura, em ambas as espécies de *Artemia*.

Os testes de normalidade (com  $p < 0.05$ ) falharam para os resultados (mesmo transformados logaritmicamente) de muitos tratamentos. Assim, as médias foram comparadas com o teste de Kruskal-Wallis, para determinar se algum tratamento era diferente dos outros e com o teste post-hoc de Wilcoxon, corrigidos para testes múltiplos (com  $p$ -value ajustado pelo método de Holm; Holm, 1979), para ver quais grupos diferiam (Hollander and Wolfe, 1973).

Toda a análise estatística foi efetuada no R (R Dev. Core Team 2009).

Os gráficos e tabelas apresentados nesta dissertação foram elaborados em folhas de cálculo do Excel.

## 2.2. RESULTADOS

Os resultados para o tratamento de 150 ppt e 34°C não se apresentam, uma vez que nenhuma fêmea das duas espécies se reproduziu, não sendo possível calcular os parâmetros demográficos e reprodutivos. No entanto, estudos de sobrevivência revelam que a espécie partenogenética sobrevive apenas 8 e 4 dias (respetivamente), enquanto a espécie invasora atinge os 15 e os 25 dias de vida (Pinto *et al.*, 2013b). No caso de *A. parthenogenetica* de Aveiro também nenhuma fêmea se reproduziu quando a quantidade de alimento testada foi de 37500 células mL<sup>-1</sup>.

De notar que os parâmetros reprodutivos de *Artemia parthenogenetica* de Aveiro para a condição de 110 ppt foram calculados com um n=2, uma vez que apenas duas fêmeas atingiram a maturidade. Os parâmetros demográficos não foram calculados, uma vez que apenas uma dessas fêmeas se reproduziu.

### 2.2.1. Características do ciclo de vida

Quanto ao ciclo de vida e de acordo com muitos dos tratamentos, as amostras apresentaram elevada variabilidade individual refletida pelos grandes desvios-padrão relativamente às médias. Portanto, valores médios dispares podem não ser significativamente diferentes, enquanto valores aparentemente semelhantes o são (tabelas 3, 4, 5 e 6).

- ***Artemia parthenogenetica* de Aveiro**

As características do ciclo de vida de *A. parthenogenetica* de Aveiro variam significativamente entre os diversos parâmetros testados (tabela 3, figuras 7-10) Para a maioria dos parâmetros a duração dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e tempo total de vida foram significativamente diferentes. No caso do período pós-reprodutivo, os resultados obtidos para o tratamento base (70 ppt) são estatisticamente iguais aos obtidos para 0 h de luz e 150000 células mL<sup>-1</sup>.

Tabela 3 – Valores de média (desvio-padrão) dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo, pós-reprodutivo e tempo de vida total, em dias, dependendo da salinidade, temperatura, fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de *Tetraselmis suecica* mL<sup>-1</sup>) para *A. parthenogenetica* de Aveiro. O tratamento base é o mesmo para todos os parâmetros. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $\alpha=0,005$ ) entre os tratamentos.

| Parâmetro   |                             | Períodos de vida        |                          |                          |                          |
|-------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|             |                             | Pré-reprodutivo         | Reprodutivo              | Pós-reprodutivo          | Tempo de vida            |
| Salinidade  | 70 ppt                      | 37,9 (2,2) <sup>a</sup> | 35,6 (6,5) <sup>a</sup>  | 1,7 (1,7) <sup>a</sup>   | 73,5 (10,1) <sup>a</sup> |
|             | 110 ppt                     | 11 (15,6) <sup>b</sup>  | 10,5 (14,8) <sup>b</sup> | 13,5 (12) <sup>b</sup>   | 35 (18,4) <sup>b</sup>   |
| Temperatura | 24 °C                       | 37,9 (2,2) <sup>a</sup> | 35,6 (6,5) <sup>a</sup>  | 1,7 (1,7) <sup>a</sup>   | 73,5 (10,1) <sup>a</sup> |
|             | 29 °C                       | 35,8 (3,1) <sup>b</sup> | 11,6 (10,4) <sup>b</sup> | 11,6 (14,2) <sup>b</sup> | 47,2 (12,1) <sup>b</sup> |
| Luz         | 12 h                        | 37,9 (2,2) <sup>a</sup> | 35,6 (6,5) <sup>a</sup>  | 1,7 (1,7) <sup>a</sup>   | 73,5 (10,1) <sup>a</sup> |
|             | 24 h                        | 29 (4) <sup>b</sup>     | 12 (12,4) <sup>b</sup>   | 4,1 (5,5) <sup>b</sup>   | 43,5 (12,8) <sup>b</sup> |
|             | 0 h                         | 28 (3,1) <sup>b</sup>   | 18,9 (12,5) <sup>b</sup> | 3,9 (7,1) <sup>a,b</sup> | 48,9 (15,1) <sup>b</sup> |
| Alimento    | 300000 cél mL <sup>-1</sup> | 37,9 (2,2) <sup>a</sup> | 35,6 (6,5) <sup>a</sup>  | 1,7 (1,7) <sup>a</sup>   | 73,5 (10,1) <sup>a</sup> |
|             | 150000 cél mL <sup>-1</sup> | 36,7 (5,1) <sup>a</sup> | 4,1 (4,2) <sup>b</sup>   | 1,2 (1,8) <sup>a</sup>   | 42,1 (3,7) <sup>b</sup>  |

O aumento da salinidade provocou uma diminuição acentuada de todos os períodos de vida, comparativamente com o tratamento base, exceto do período pós-reprodutivo. Este caso também se verifica quando se eleva a temperatura para 29°C ou quando se varia a luminosidade, no entanto, a média do período pós-reprodutivo nas condições de 0h de luz e de 150000 células mL<sup>-1</sup>, é significativamente semelhante à média obtida para 12h e 300000 células mL<sup>-1</sup> (tratamento base).

A reprodução parece ter ficado muito condicionada quando se diminuiu a quantidade de alimento, uma vez que esta condição apresentou o período reprodutivo mais curto.

- ***Artemia franciscana***

As características do ciclo de vida de *A. franciscana* variam significativamente entre os diversos parâmetros testados (tabela 4, figuras 11-14) Para a maioria dos parâmetros a duração dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e tempo total de vida foram significativamente diferentes, no entanto, podemos encontrar parâmetros com resultados muito parecidos com o tratamento base, como é o caso de 0h de luz e 150000 células mL<sup>-1</sup>, em que apenas o período pré-reprodutivo médio é ligeiramente mais longo.

O aumento da salinidade (110 ppt) promoveu o aumento do período pré-reprodutivo e do tempo total de vida para o dobro (quando comparado com o teste base). Este parece ser o fator que reuniu as condições mais favoráveis ao desenvolvimento de uma população de *A. franciscana*.

**Tabela 4 - Valores de média (desvio-padrão) dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo, pós-reprodutivo e tempo de vida total, em dias, dependendo da salinidade, temperatura, fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de *Tetraselmis suecica* mL<sup>-1</sup>) para *A. franciscana*. O tratamento base é o mesmo para todos os parâmetros. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $\alpha=0,005$ ) entre os tratamentos.**

| Parâmetro   |                                | Períodos de vida         |                          |                         |                          |
|-------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|             |                                | Pré-reprodutivo          | Reprodutivo              | Pós-reprodutivo         | Tempo de vida            |
| Salinidade  | 70 ppt                         | 18,8 (2,2) <sup>a</sup>  | 23,3 (13,6) <sup>a</sup> | 1,5 (1,7) <sup>a</sup>  | 42,5 (14,5) <sup>a</sup> |
|             | 110 ppt                        | 24 (4,6) <sup>b</sup>    | 52,7 (24,4) <sup>b</sup> | 4,4 (4,9) <sup>b</sup>  | 81 (24,5) <sup>b</sup>   |
| Temperatura | 24 °C                          | 18,8 (2,2) <sup>a</sup>  | 23,3 (13,6) <sup>a</sup> | 1,5 (1,7) <sup>a</sup>  | 42,5 (14,5) <sup>a</sup> |
|             | 29 °C                          | 20,1 (3,7) <sup>a</sup>  | 9,5 (9,5) <sup>b</sup>   | 1,9 (1,7) <sup>a</sup>  | 31,5 (11,8) <sup>b</sup> |
| Luz         | 12 h                           | 18,8 (2,2) <sup>a</sup>  | 23,3 (13,6) <sup>a</sup> | 1,5 (1,7) <sup>a</sup>  | 42,5 (14,5) <sup>a</sup> |
|             | 24 h                           | 22,4 (3,4) <sup>b</sup>  | 9,5 (8,7) <sup>b</sup>   | 2,5 (3,9) <sup>a</sup>  | 34,4 (10,6) <sup>b</sup> |
|             | 0 h                            | 24,4 (3,5) <sup>b</sup>  | 25,1 (14,4) <sup>a</sup> | 2,2 (2,9) <sup>a</sup>  | 51,7 (14,5) <sup>a</sup> |
| Alimento    | 300000 cél<br>mL <sup>-1</sup> | 18,8 (2,2) <sup>a</sup>  | 23,3 (13,6) <sup>a</sup> | 1,5 (1,7) <sup>a</sup>  | 42,5 (14,5) <sup>a</sup> |
|             | 150000 cél<br>mL <sup>-1</sup> | 24,9 (3) <sup>b</sup>    | 19,7 (14) <sup>a</sup>   | 2,1 (2,8) <sup>a</sup>  | 46,7 (14,6) <sup>a</sup> |
|             | 37500 cél<br>mL <sup>-1</sup>  | 38,3 (12,3) <sup>c</sup> | 12,5 (11,4) <sup>b</sup> | 11,3 (9,4) <sup>b</sup> | 62,5 (17,2) <sup>b</sup> |

O período reprodutivo diminuiu significativamente quando se aumentou a temperatura (29°C) e o tempo de exposição à luz (24h) e se diminuiu a concentração de alimento disponível (37500 células mL<sup>-1</sup>). É também na condição de 37500 células mL<sup>-1</sup> que pudemos observar os períodos pré e pós-reprodutivos mais longos.

## 2.2.2. Parâmetros Reprodutivos

- ***Artemia parthenogenetica* de Aveiro**

As ninhadas por fêmea, bem como a descendência por fêmea diminuíram significativamente quando se aumentou a salinidade de 70 para 110 ppt (figura 7). O tempo entre ninhadas, a descendência por ninhadas, bem como a quantidade e a qualidade da reprodução ovovivípara, não variaram significativamente com a salinidade (tabela 5 e figura 7). A percentagem de reprodução ovípara aumentou significativamente com a diminuição da salinidade.

**Tabela 5 – Valores de média e desvio-padrão das características reprodutivas e da qualidade da descendência de *A. parthenogenetica* de Aveiro, dependendo da salinidade (ppt), temperatura (°C), fotoperíodo (em horas de luz por dia) e concentração de alimento (em células de *Tetraselmis suecica* mL<sup>-1</sup>). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $\alpha=0,05$ ). O tratamento base foi igual para todos os parâmetros.**

| Parâmetro   |                             | Reprodução Ovovivípara     | Núplios                    |                         |                          | Reprodução Ovípara         |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
|             |                             |                            | Vivos                      | Mortos                  | Abortos                  |                            |
| Salinidade  | 70 ppt                      | 324,9 (193,5) <sup>a</sup> | 303,7 (183,4) <sup>a</sup> | 3,8 (4,7) <sup>a</sup>  | 17,5 (23,1) <sup>a</sup> | 374,2 (215,9) <sup>a</sup> |
|             | 110 ppt                     | 321 (227) <sup>a</sup>     | 311 (219,9) <sup>a</sup>   | 4 (2,8) <sup>a</sup>    | 6 (4,2) <sup>a</sup>     | 11 (7,8) <sup>b</sup>      |
| Temperatura | 24 °C                       | 324,9 (193,5) <sup>a</sup> | 303,7 (183,4) <sup>a</sup> | 3,8 (4,7) <sup>a</sup>  | 17,5 (23,1) <sup>a</sup> | 374,2 (215,9) <sup>a</sup> |
|             | 29 °C                       | 82,9 (102,6) <sup>b</sup>  | 74 (93,9) <sup>b</sup>     | 2,4 (3,8) <sup>a</sup>  | 6,5 (12,8) <sup>b</sup>  | 15,1 (21,2) <sup>b</sup>   |
| Luz         | 12 h                        | 324,9 (193,5) <sup>a</sup> | 303,7 (183,4) <sup>a</sup> | 3,8 (4,7) <sup>a</sup>  | 17,5 (23,1) <sup>a</sup> | 374,2 (215,9) <sup>a</sup> |
|             | 24 h                        | 159,7 (150,1) <sup>b</sup> | 138,2 (142,2) <sup>b</sup> | 2,6 (5,6) <sup>a</sup>  | 18,8 (29,6) <sup>a</sup> | 18,9 (23,6) <sup>b</sup>   |
|             | 0 h                         | 3 (12,4) <sup>c</sup>      | 0,7 (3,3) <sup>c</sup>     | 0,9 (3,2) <sup>b</sup>  | 1,3 (6,1) <sup>b</sup>   | 250,6 (159,6) <sup>c</sup> |
| Alimento    | 300000 cél ml <sup>-1</sup> | 324,9 (193,5) <sup>a</sup> | 303,7 (183,4) <sup>a</sup> | 3,8 (4,7) <sup>a</sup>  | 17,5 (23,1) <sup>a</sup> | 374,2 (215,9) <sup>a</sup> |
|             | 150000 cél ml <sup>-1</sup> | 18,8 (39,5) <sup>b</sup>   | 13,3 (30,1) <sup>b</sup>   | 3,8 (11,3) <sup>b</sup> | 1,7 (5,4) <sup>b</sup>   | 44,3 (39,5) <sup>b</sup>   |

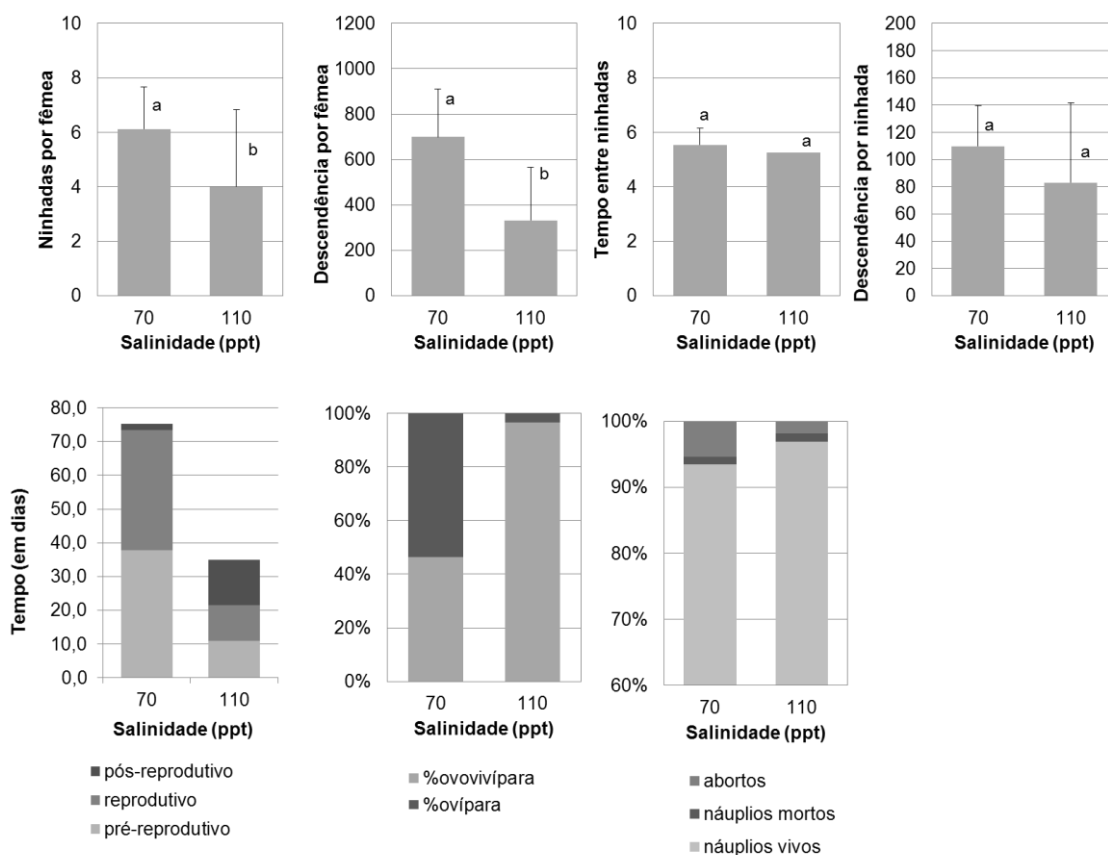


**Figura 7 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. parthenogenetica* de Aveiro, dependendo das salinidades testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos**

Todas as características avaliadas foram afetadas pelo aumento de temperatura para 29°C (figura 8). Apesar da reprodução ovovivípara ser predominante a 29°C, verificou-se uma diminuição acentuada, principalmente ao nível dos náuplios vivos, quando comparados com os resultados obtidos para 24°C (tabela 5 – figura 8). Apesar disso, a percentagem de náuplios abortivos diminuiu.

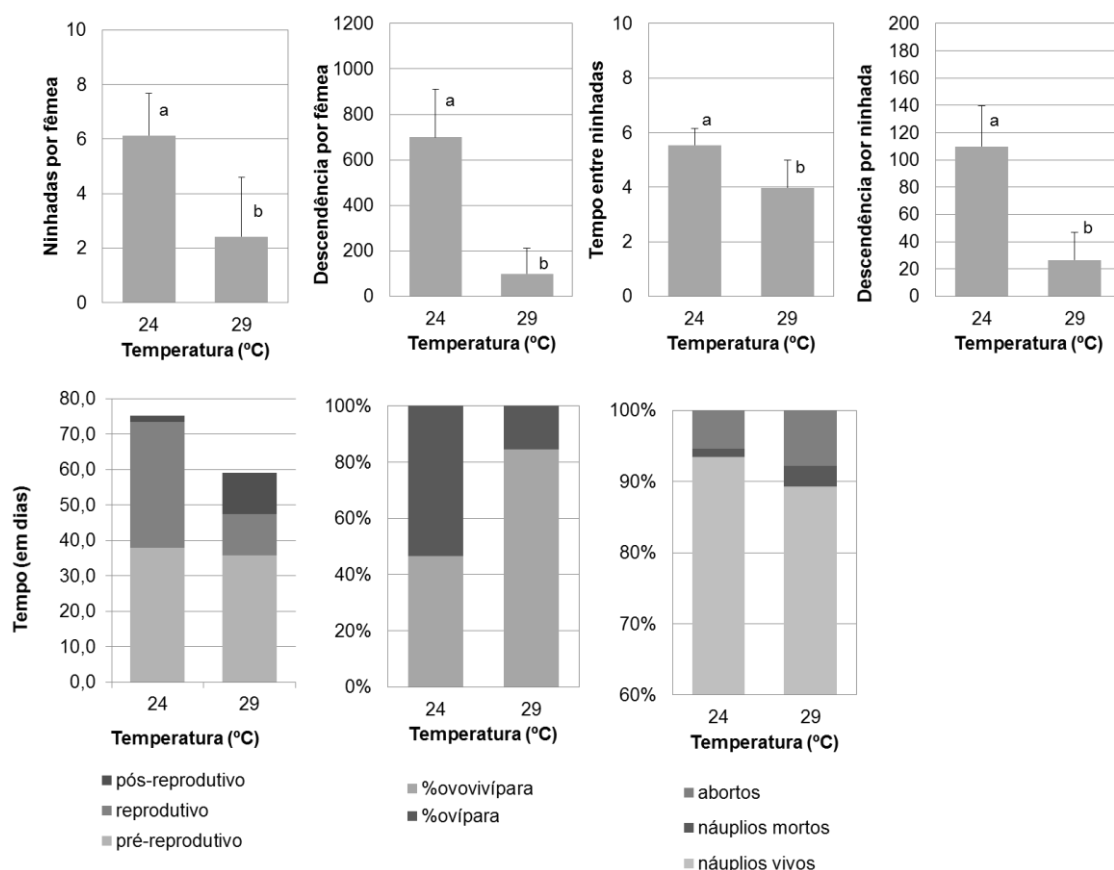


Figura 8 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. parthenogenetica* de Aveiro, dependendo das temperaturas testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos

Os resultados obtidos para o fotoperíodo de 12h:12h L:O são melhores, no entanto, não existem diferenças significativas quanto ao tempo entre ninhadas entre 0h e 12h:12h. O fotoperíodo influencia significativamente a modalidade de reprodução, fazendo aumentar a percentagem de ovoviviparidade sob luz constante e aumenta a percentagem de oviparidade sob obscuridade total (figura 9). As percentagens de abortos e náuplios mortos não são estatisticamente diferentes, quando comparamos o fotoperíodo de 12h:12h com luz constante.

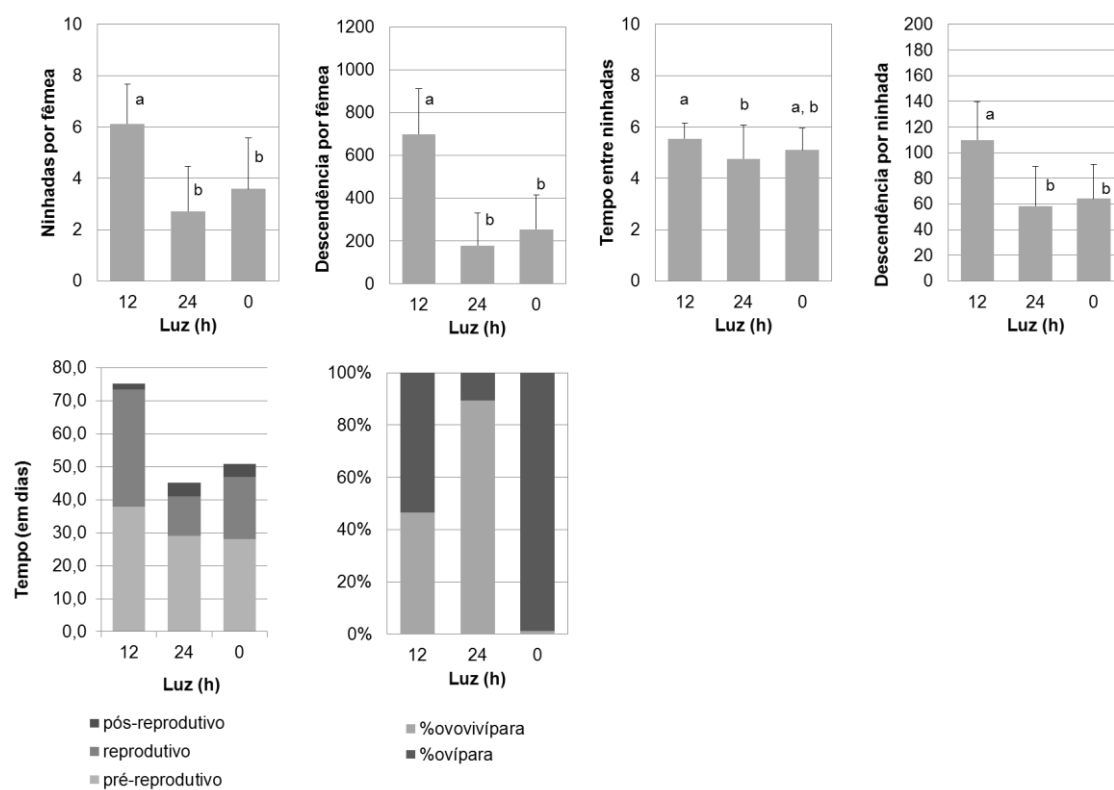


**Figura 9 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. parthenogenetica* de Aveiro, dependendo dos fotoperíodos testados; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos**

As características reprodutivas em estudo foram sempre significativamente afetadas pela variação de alimento (tabela 5, figura 10). Uma quantidade inferior de alimento afeta negativamente a reprodução das fêmeas de *A. parthenogenetica* de Aveiro, aumentando a produção de quistos e a percentagem de náuplios mortos.

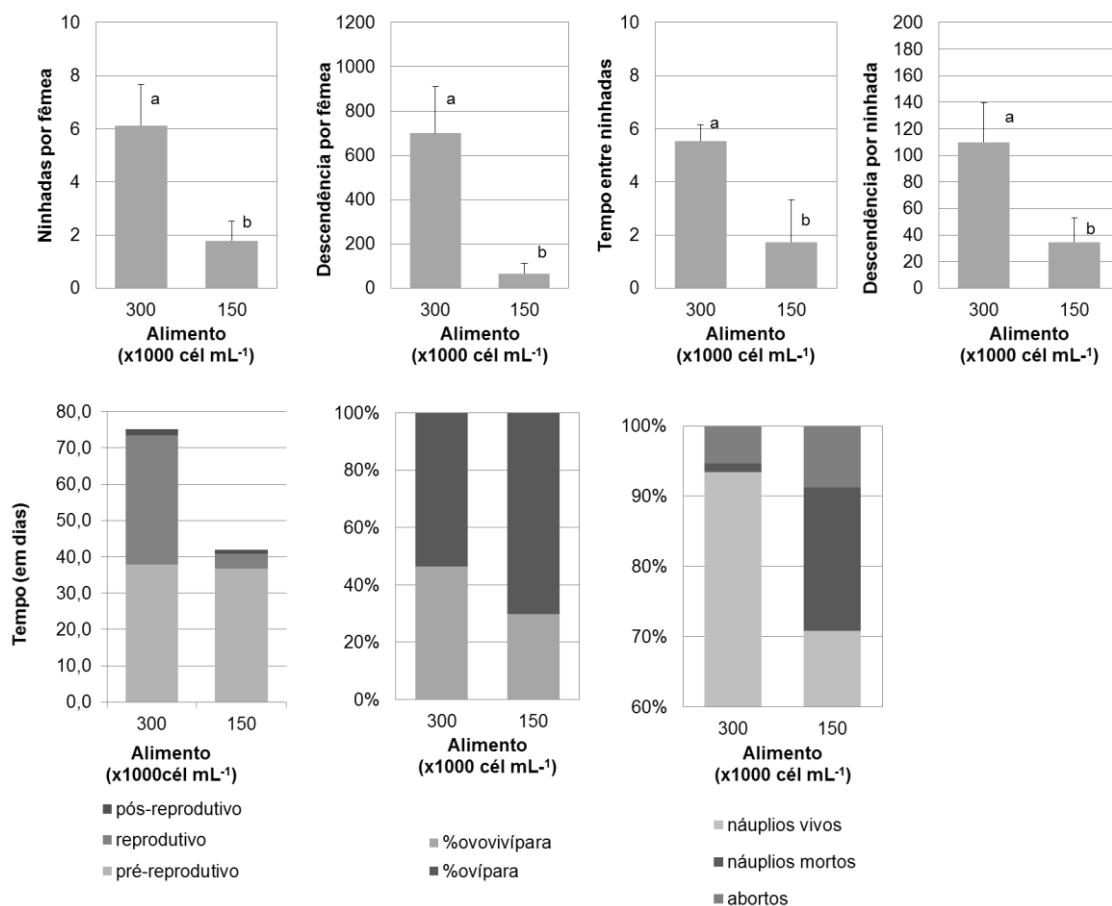


Figura 10 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. parthenogenetica* de Aveiro, dependendo das concentrações de alimento testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos

### • *Artemia franciscana*

Quase todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças significativas nas diferentes salinidades testadas (figura 11). As ninhadas e a descendência por fêmea aumentaram significativamente quando as fêmeas foram sujeitas quando se aumentou a salinidade de 70 para 110 ppt. A salinidade de 110 ppt promoveu a produção de quistos e aumentou a média de abortos

Tabela 6 - Valores de média e desvio-padrão das características reprodutivas e da qualidade da descendência de *A. franciscana*, dependendo da salinidade (ppt), temperatura (°C), fotoperíodo (em horas de luz por dia) e

concentração de alimento (em células de *Tetraselmis suecica* mL<sup>-1</sup>). Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $\alpha=0,05$ ). O tratamento base foi igual para todos os parâmetros.

| Parâmetro   |                             | Reprodução Ovovivípara     | Náuplios                   |                          |                            | Reprodução Ovípara         |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
|             |                             |                            | Vivos                      | Mortos                   | Abortos                    |                            |
| Salinidade  | 70 ppt                      | 156 (275,1) <sup>a</sup>   | 151,8 (271,6) <sup>a</sup> | 3,4 (10,3) <sup>a</sup>  | 0,9 (2,9) <sup>a</sup>     | 464,1 (406,1) <sup>a</sup> |
|             | 110 ppt                     | 596,4 (622,1) <sup>b</sup> | 395,5 (398,3) <sup>b</sup> | 1,8 (2,8) <sup>a</sup>   | 206 (299,3) <sup>b</sup>   | 671,4 (556,8) <sup>a</sup> |
| Temperatura | 24 °C                       | 156 (275,1) <sup>a</sup>   | 151,8 (271,6) <sup>a</sup> | 3,4 (10,3) <sup>a</sup>  | 0,9 (2,9) <sup>a</sup>     | 464,1 (406,1) <sup>a</sup> |
|             | 29 °C                       | 123,4 (181,1) <sup>a</sup> | 112,1 (171,2) <sup>a</sup> | 0,9 (3,2) <sup>a</sup>   | 10,4 (25,7) <sup>a</sup>   | 120 (152,2) <sup>b</sup>   |
| Luz         | 12 h                        | 156 (275,1) <sup>a</sup>   | 151,8 (271,6) <sup>a</sup> | 3,4 (10,3) <sup>a</sup>  | 0,9 (2,9) <sup>a</sup>     | 464,1 (406,1) <sup>a</sup> |
|             | 24 h                        | 271,2 (211,4) <sup>b</sup> | 213,3 (201,7) <sup>a</sup> | 11,3 (26,4) <sup>a</sup> | 46,6 (61,4) <sup>b</sup>   | 16,8 (38,1) <sup>b</sup>   |
|             | 0 h                         | 403,6 (308,7) <sup>b</sup> | 275,4 (244,7) <sup>a</sup> | 17,9 (39) <sup>a</sup>   | 110,2 (109,7) <sup>c</sup> | 240,8 (238) <sup>c</sup>   |
| Alimento    | 300000 cél mL <sup>-1</sup> | 156 (275,1) <sup>a</sup>   | 151,8 (271,6) <sup>a</sup> | 3,4 (10,3) <sup>a</sup>  | 0,9 (2,9) <sup>a</sup>     | 464,1 (406,1) <sup>a</sup> |
|             | 150000 cél mL <sup>-1</sup> | 29,4 (59,7) <sup>a</sup>   | 28,3 (57,9) <sup>a</sup>   | 0,5 (2) <sup>a</sup>     | 0,5 (2,1) <sup>a</sup>     | 253,3 (174,6) <sup>b</sup> |
|             | 37500 cél mL <sup>-1</sup>  | 16,5 (18,6) <sup>a</sup>   | 7,7 (17) <sup>a</sup>      | 0,1 (0,5) <sup>a</sup>   | 8,8 (13,6) <sup>b</sup>    | 65,7 (95,1) <sup>c</sup>   |

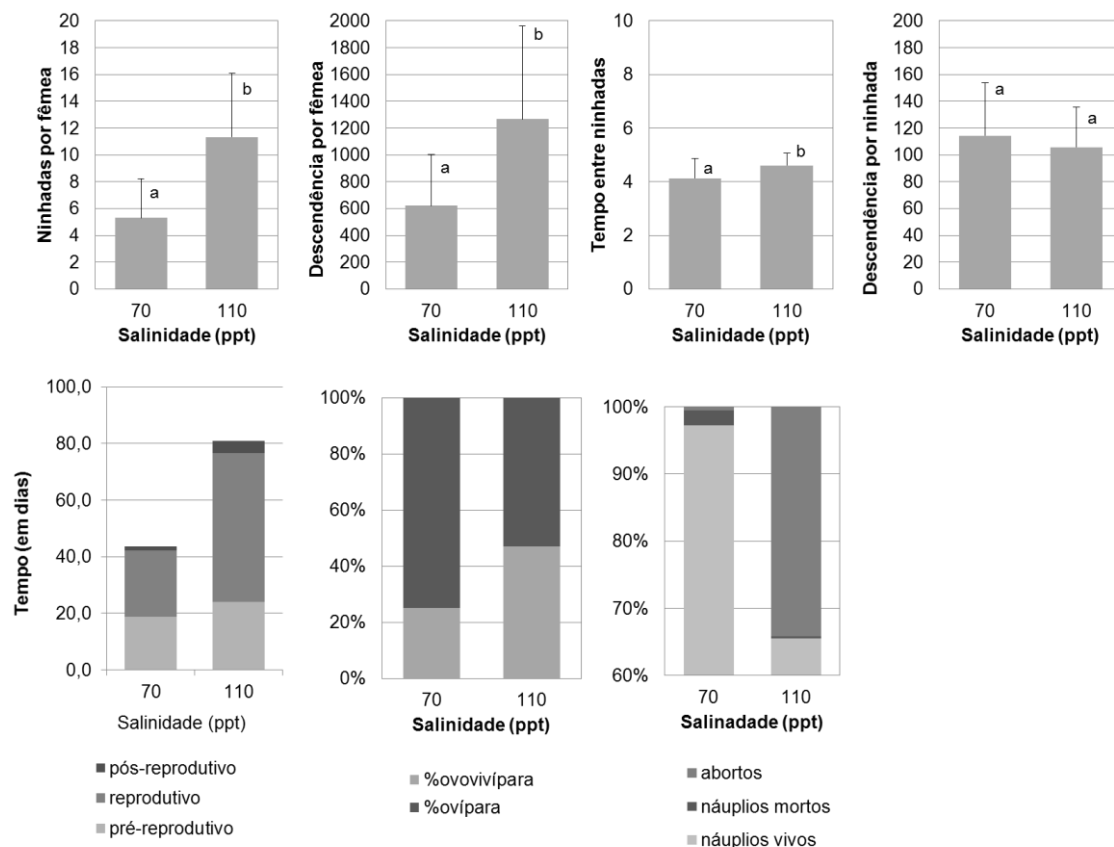


Figura 11 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. franciscana*, dependendo das salinidades testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos

Por outro lado, *A. franciscana* mostrou-se mais sensível ao aumento da temperatura, já que todos os parâmetros testados apresentaram valores significativamente menores a 29°C (tabela 6 – figura 12). A reprodução a 24°C foi maioritariamente ovovivípara, porém, com o aumento de temperatura, aumentou também a percentagem de oviparidade. Apesar disso, a qualidade da reprodução ovovivípara é semelhante, quando comparadas as duas temperaturas (figura 12).

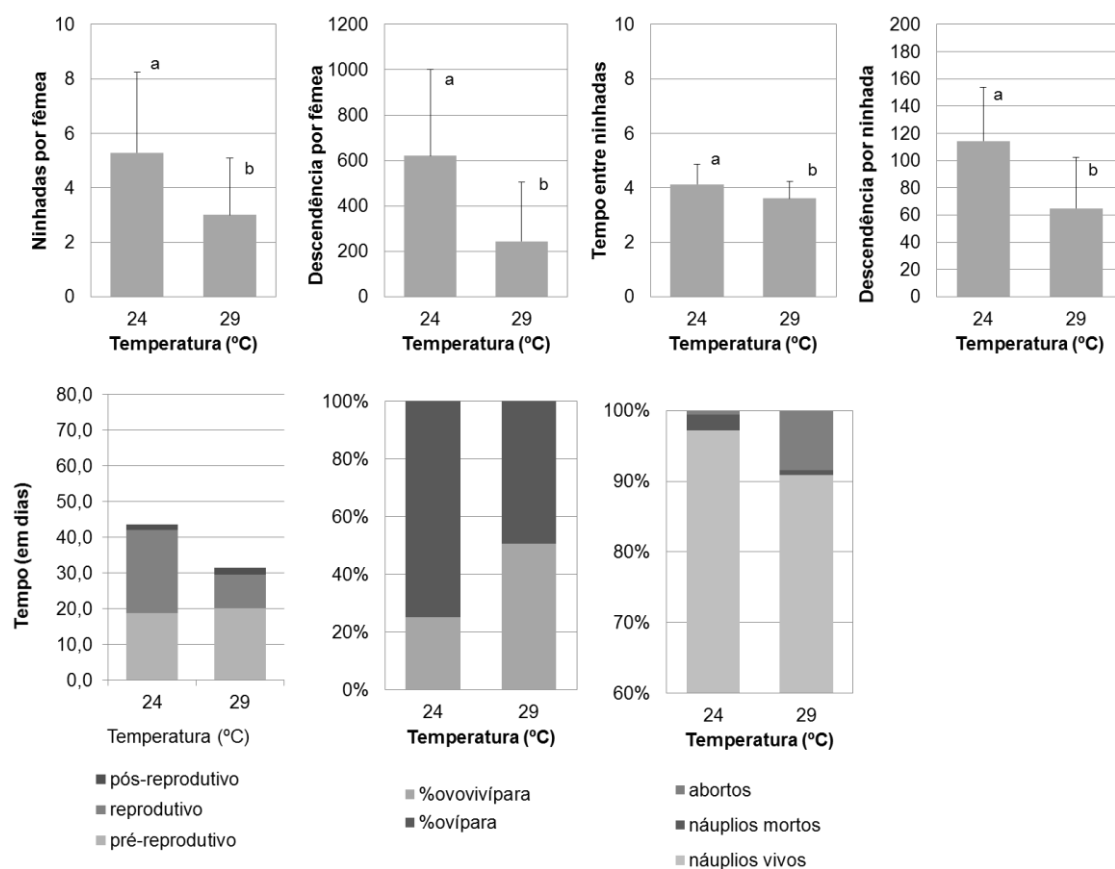


**Figura 12 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. franciscana*, dependendo das concentrações de alimento testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos**

Em relação ao fotoperíodo, os valores obtidos para as características “ninhadas por fêmeas”, “tempo entre ninhadas”, “descendência por fêmea” e “descendência por ninhada”, são estatisticamente semelhantes, quando as sujeitamos as fêmeas a 12h:12h L:O e a obscuridade total. As condições extremas de luminosidade não influenciaram significativamente o tempo entre ninhadas e a descendência por ninhada (figura 13). Relativamente à reprodução ovovivípara e à qualidade dos descendentes produzidos, sob luz e obscuridade constante, os resultados foram semelhantes. Apesar de a 12h:12h L:O a percentagem de náuplios vivos ser maior, este fotoperíodo é aquele que promove uma maior percentagem de reprodução ovípara.

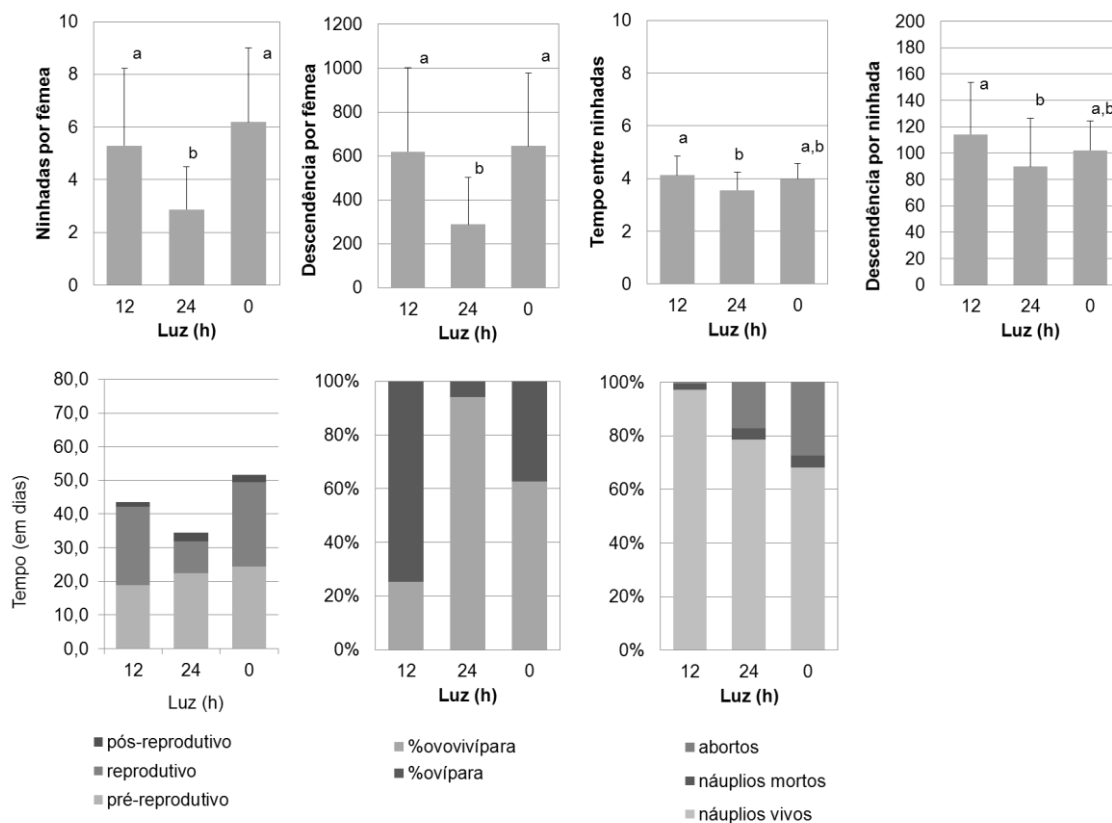


**Figura 13 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. franciscana*, dependendo dos fotoperíodos testados; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos**

Esta espécie demonstrou-se vulnerável, em termos de reprodução, à diminuição da concentração de alimento disponível (figura 14 – tabela 6). Em alguns parâmetros todas as concentrações são estatisticamente diferentes entre si (ninhadas por fêmea, descendência por fêmea, descendência por ninhada), no entanto, são semelhantes noutros (tempo entre ninhadas e percentagem de reprodução ovovivípara) (figura 14). A escassez de alimento ( $37500 \text{ células mL}^{-1}$ ) aumenta abundantemente a percentagem de abortos.

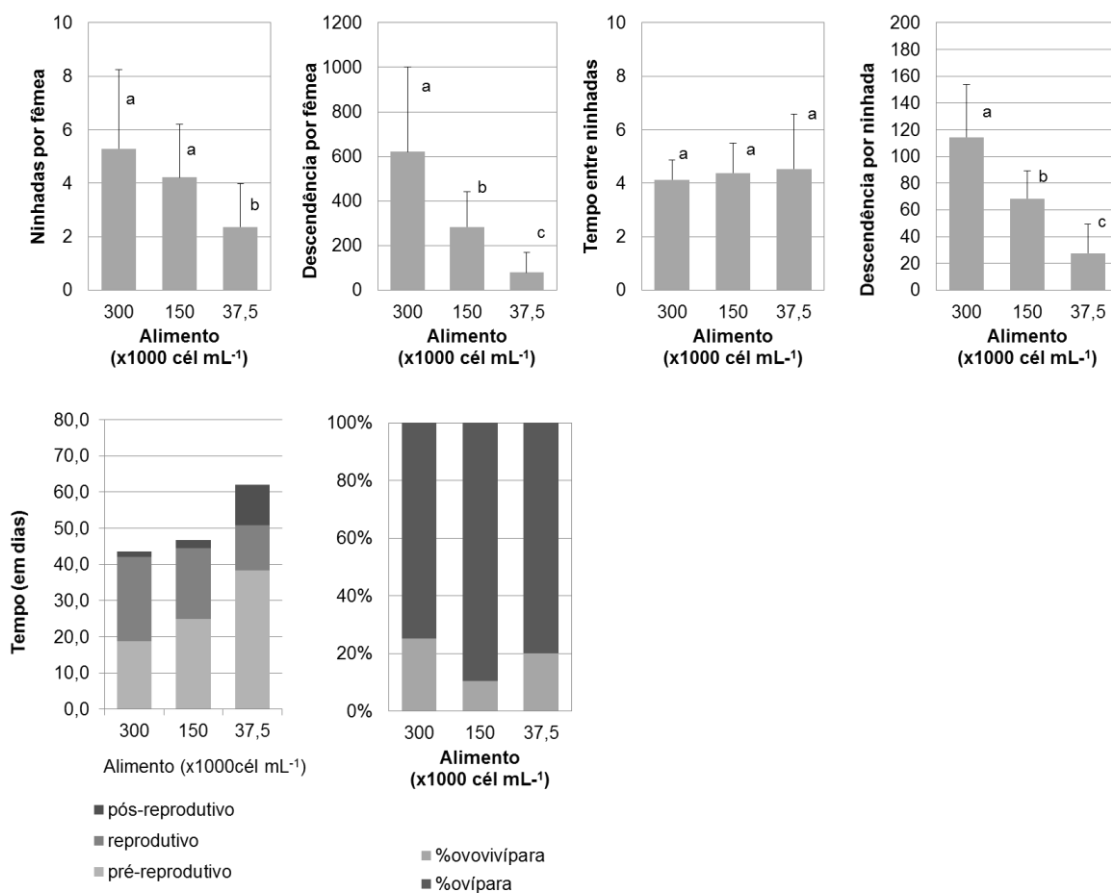


Figura 14 - Média dos valores dos ciclos de vida e dos parâmetros reprodutivos de *A. franciscana*, dependendo das concentrações de alimento testadas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos

### 2.2.3. Parâmetros Demográficos

- Artemia parthenogenetica* de Aveiro**

As curvas de sobrevivência ( $I_x$ ) mostram que a probabilidade de *A. parthenogenetica* sobreviver é maior nas condições de 70 ppt, 24°C, 12h:12h (luz:obscuridade) de fotoperíodo e 300000 células mL<sup>-1</sup> (figura 15).

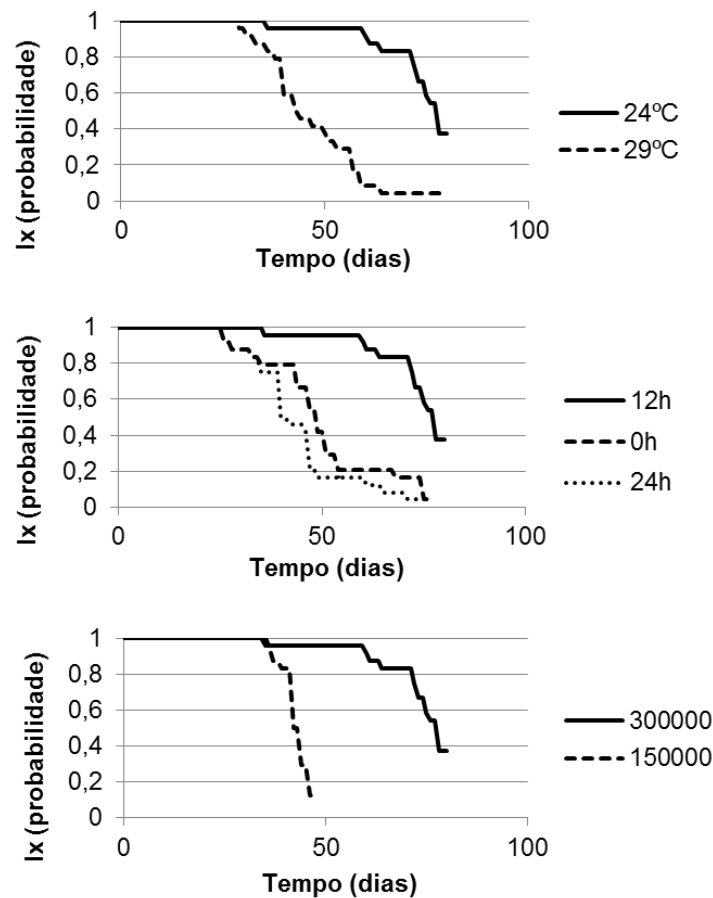


Figura 15 - Função de sobrevivência ( $I_x$ ) da população de *A. parthenogenetica* de Aveiro, dependente das condições experimentais testadas

Os parâmetros demográficos ( $T$ ,  $R_0$  e  $r$ ) obtidos a partir das tabelas de vida de *A. parthenogenetica* apresentam diferenças significativas, com  $p < 0.05$ , entre todos os parâmetros testados (figura 16).

O tempo geracional ( $T$ ), período entre o nascimento de uma fêmea e a sua primeira ninhada, diminui com o aumento da temperatura. Quando sujeitamos as fêmeas a uma variação da quantidade de luz,  $T$  diminui. No entanto, esta diminuição é mais acentuada quando privamos *Artemia* de luz (figura 16).

A taxa reprodutiva líquida ( $R_0$ ) diminui bruscamente quando aumentamos a temperatura para 29°C, bem como quando diminuimos a concentração de alimentos disponível (de 300000 para 150000 células  $\text{mL}^{-1}$ ). Relativamente ao fotoperíodo, o valor de  $R_0$  é maior para a condição de 12h:12h L:O e diminui quando variamos a exposição à luz. Esta diminuição é mais abrupta na condição de 24h (figura 16).

A taxa de crescimento intrínseco ( $r$ ) diminuiu, relativamente ao tratamento base, quando aumentamos a temperatura, diminuimos a concentração de alimento e a

exposição à luz. Neste último caso, os valores de  $r$  são negativos, portanto, uma população exposta a estas condições não subsistiria. O valor de  $r$  apenas é melhor do que o do tratamento base quando expomos esta espécie à luz total (figura 16).

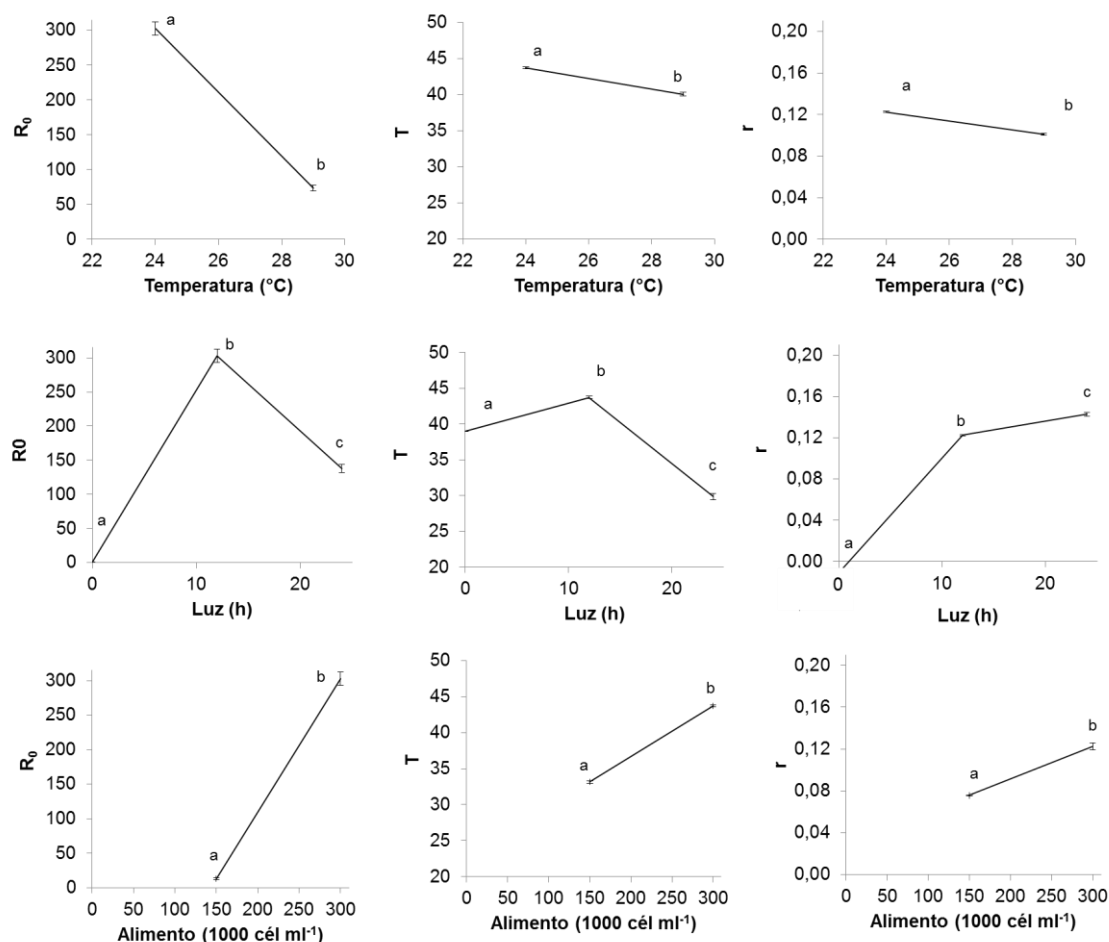


Figura 16 – Parâmetros demográficos de *A. parthenogenetica* de Aveiro: valores médios ( $\pm$ desvio-padrão) da taxa de reprodução líquida ( $R_0$ ), tempo geracional ( $T$ ) e taxa de crescimento intrínseco ( $r$ )

### • *Artemia franciscana*

As curvas de sobrevivência ( $l_x$ ) mostram que a probabilidade de *A. franciscana* sobreviver é maior nas condições de 110 ppt, 24°C, 12h:12h ou 0h de luz de fotoperíodo e com qualquer concentração de alimento no meio (figura 17).

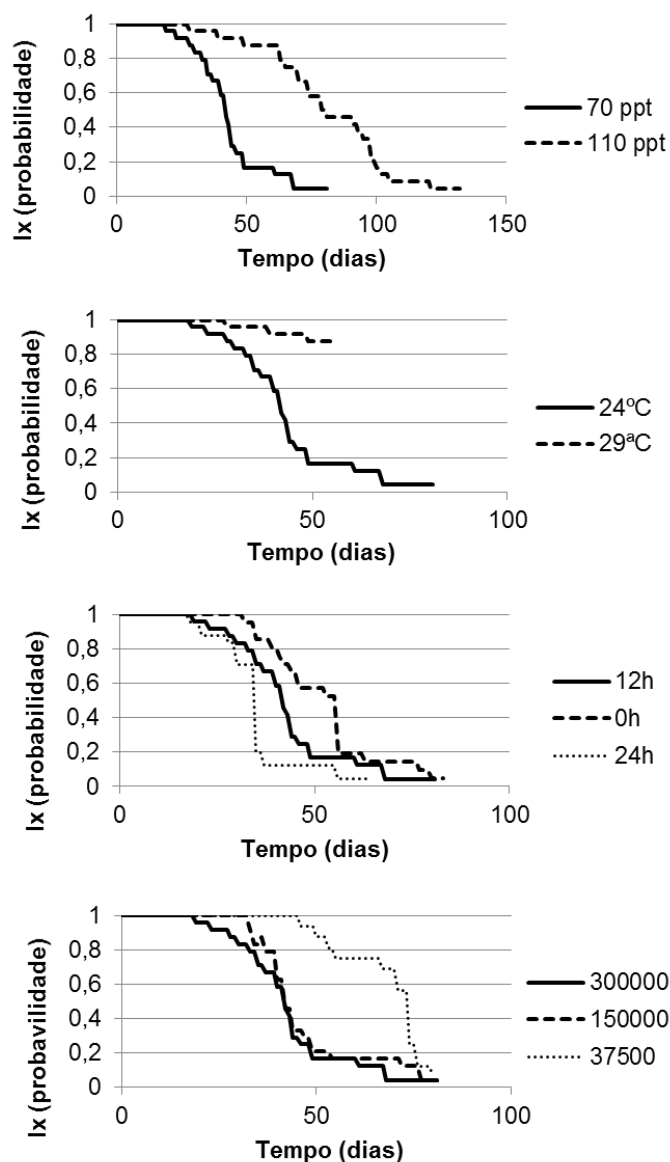


Figura 17 - Função de sobrevivência ( $I_x$ ) da população de *A. franciscana*, dependente das condições experimentais testadas

Os parâmetros demográficos ( $T$ ,  $R_0$  e  $r$ ) obtidos a partir das tabelas de vida desta espécie apresentam diferenças significativas, com  $p < 0.05$ , entre todos os parâmetros testados (figura 18).

Quando se aumenta a temperatura, o valor de  $T$  aumenta também.  $T$  é menor na condição de 12h:12h L:O do que nas condições de 0h e 24h. À medida que a concentração de alimento disponível aumenta,  $T$  diminui (figura 18). Quando aumentamos a salinidade,  $T$  aumenta ligeiramente (figura 18 – conferir diferenças significativas no anexo I).

$R_0$  aumenta quando aumentamos a concentração de alimento (consecutivamente de 37500 para 150000 e de 150000 para 300000 células  $\text{mL}^{-1}$ ) e

quando aumentamos a salinidade de 70 para 110 ppt. Quando a temperatura aumenta para 29°C,  $R_0$  diminui. Relativamente ao fotoperíodo,  $R_0$  aumenta quando os indivíduos são expostos a condições extremas (figura 18).

A taxa de crescimento intrínseco ( $r$ ) varia ligeiramente em todos os parâmetros, com valores compreendidos entre 0,16 e 0,2. No entanto, estes valores descem demarcadamente à medida que diminuimos a concentração de alimento no meio (figura 18).

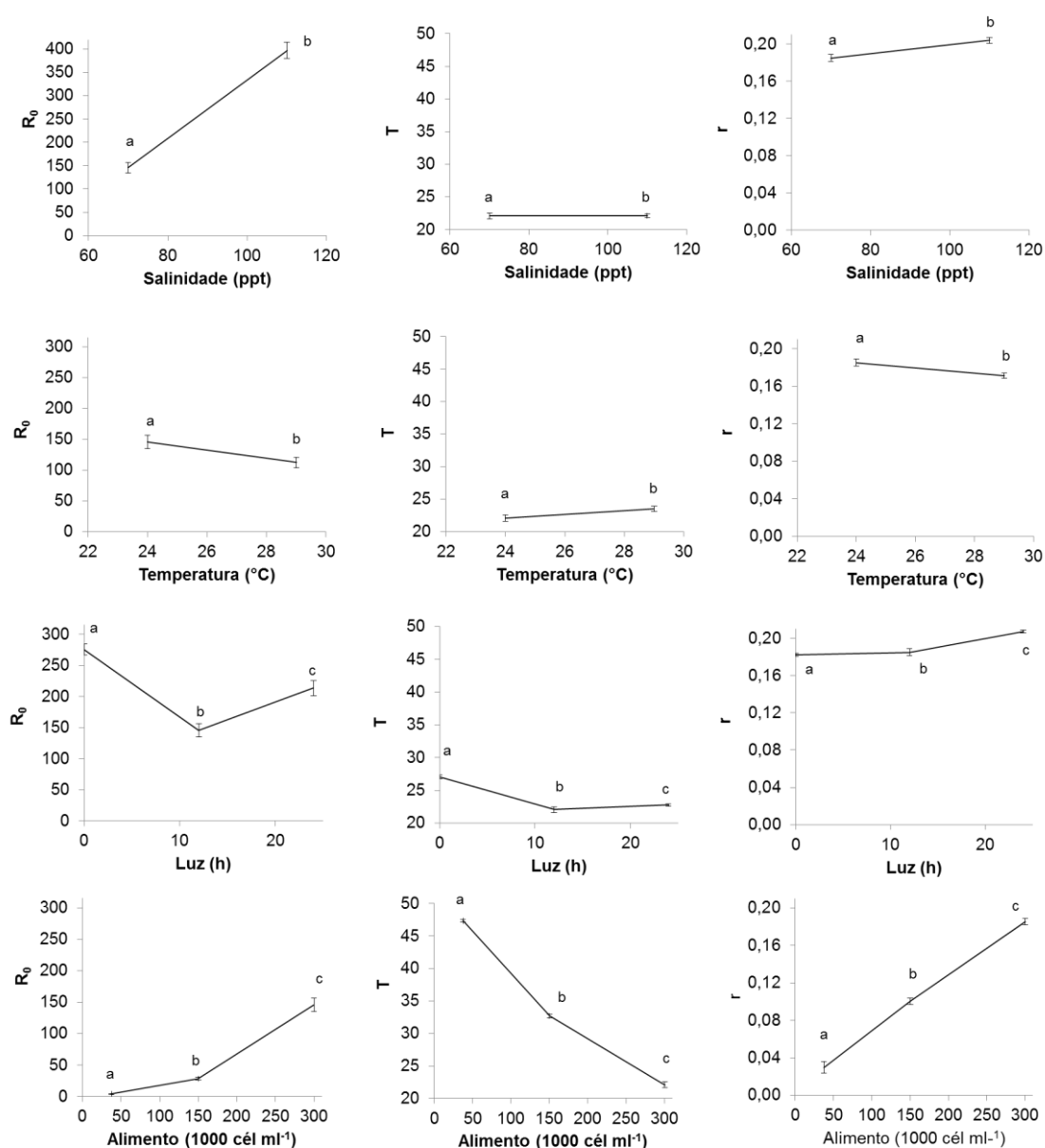


Figura 18 - Parâmetros demográficos de *A. franciscana*: valores médios ( $\pm$ desvio-padrão) da taxa de reprodução líquida ( $R_0$ ), tempo geracional ( $T$ ) e taxa de crescimento intrínseco ( $r$ )







## DISCUSSÃO GERAL



## DISCUSSÃO GERAL

Este estudo demonstra que a salinidade, temperatura, luz e concentração de alimento são fatores ambientais que influenciam a reprodução de *Artemia*. Os resultados obtidos confirmam as conclusões de estudos efetuados anteriormente (Amat *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 1996a; Barata *et al.*, 1996b; Browne & Wanigasekera, 2000).

Os nossos resultados mostram que a população de Rio Maior se encontra mais bem adaptada a salinidades e temperaturas moderadas, uma vez que os períodos de vida são semelhantes a 70 e 110 ppt. *Artemia parthenogenetica* de Aveiro apresentou resultados semelhantes a 70 ppt, mas mostrou-se mais sensível ao aumento da salinidade. Estudos anteriores sobre o efeito da salinidade nos ciclos de vida de *A. parthenogenetica* e *A. franciscana* concluíram que o período pré-reprodutivo é maior quando a salinidade aumenta, uma vez que as fêmeas despendem mais energia com os processos de osmorregulação, em detrimento de outras funções, como o crescimento e reprodução (El-Magsodi *et al.*, 2005). Tal se pode comprovar com os resultados deste estudo, uma vez que *A. parthenogenetica* de Aveiro e *A. franciscana* não atingiram a maturação a 150 ppt e *A. parthenogenetica* de Rio Maior viu as suas funções reprodutivas serem muito comprometidas (capítulo 1 – table 3).

Era expectável que, uma vez que a salinidade da água utilizada nas salinas de Rio Maior é cerca de 150 ppt (Pinto *et al.*, 2013), esta espécie fosse mais resistente ao aumento da salinidade. No entanto, em Rio Maior, as maiores densidades de *Artemia* foram encontradas em tanques que serviam para armazenar água e onde a salinidade é mais baixa do que nos tanques de produção do sal, devido às águas da chuva (Pinto *et al.*, 2013b). Os nossos resultados demonstram que o aumento da salinidade não é um fator diferencial, comparativamente com a espécie invasora, uma vez que *A. franciscana* (apesar de não se reproduzir a 150 ppt) apresenta melhores resultados a 110 ppt, nomeadamente na produção de náuplios vivos. Neste caso e em caso de invasão, parece mais provável o estabelecimento da população não-nativa, uma vez que são os náuplios que contribuem para o crescimento efetivo da população, no imediato.

Relativamente à produção de quistos, os resultados obtidos demonstram que, na maior parte das condições testadas, *A. parthenogenetica* de Rio Maior e *A. franciscana* são capazes de produzir uma grande percentagem de quistos, ao contrário de *A. parthenogenetica* de Aveiro, cuja modalidade de reprodução mais utilizada é a ovovivípara. Amat *et al.*, (2007) concluiu que 80% da descendência da espécie

partenogenética é ovípara, o que contraria os resultados deste estudo. Porém, o tipo de alimento utilizado foi diferente e sabe-se que a qualidade e quantidade de alimento podem induzir a oviparidade em *Artemia* (D'Agostino & Provasoli, 1968). Nestes resultados, *A. parthenogenetica* de Aveiro e *A. franciscana* aumentam a produção de quistos, quando sujeitas à concentração de alimento mais reduzida.

Como em estudos anteriores (Abatzopoulos *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2007; Triantaphyllidis *et al.*, 1995), também estes resultados demonstram que todo o ciclo de vida das duas espécies testadas é afetado negativamente pelo aumento da temperatura para 29°C. Vanhaecke *et al.* (1984) e Browne & Wanigasekera (2000) estudaram os efeitos combinados de temperatura e salinidade em diferentes espécies de *Artemia*, de diferentes localizações geográficas, concluindo que as estirpes de *A. parthenogenetica* não sobrevivem a temperaturas acima dos 30°C. Concluíram também que não existe uma combinação de salinidade e temperatura ideal para o género *Artemia*, uma vez que cada espécie, pelas suas adaptações e características fisiológicas intrínsecas, tem a sua própria combinação ideal (Vanhaecke *et al.*, 1984; Browne & Wanigasekera, 2000). Neste estudo, nenhuma das espécies atingiu a maturidade, quando submetidas à temperatura de 34°C.

Relativamente à reprodução ovovivípara das duas populações partenogenéticas, os nossos resultados sugerem um decréscimo da qualidade quando se aumenta a temperatura. Nestes casos, verifica-se uma redução em grande escala do número de náuplios vivos, contrariamente ao que acontece com *A. franciscana*.

O fotoperíodo pode também influenciar o ciclo de vida e os parâmetros reprodutivos de *Artemia*. Provasoli & Pintner (1980) observaram que a luz e a obscuridade constante favorecem a ovoviviparidade e a oviparidade, respetivamente, de *A. franciscana* do Great Salt Lake. Neste estudo, a luminosidade constante favorece a ovoviviparidade, no entanto, a obscuridade total beneficia não só a oviparidade como faz aumentar ainda mais a descendência ovovivípara (tabela 6). A conclusão de Provasoli & Pintner (1980) pode adaptar-se ao caso de Aveiro. Já a população de Rio Maior, quando sujeita a obscuridade total, diminui largamente a sua capacidade de reprodução, mantendo a percentagem de descendência ovovivípara e ovípara idêntica.

Como já foi referido, quando a disponibilidade de alimento é limitante (37500 células mL<sup>-1</sup>), o tempo total de vida e os períodos pré e pós-reprodutivo aumentam, uma vez que *Artemia* utiliza o alimento disponível para sobreviver por um período de tempo maior, não despendendo energia na reprodução. *Artemia parthenogenetica* de Aveiro não chegou a atingir a maturidade, nestas condições.

Vários autores sugerem que a falta de alimento é um fator determinante para *Artemia* na seleção da modalidade de reprodução ovípara (Amat *et al.*, 1985; D'Agostino & Provasoli, 1968; Roman & Rodriguez, 1986). No caso da população de Rio Maior, ao contrário do que era de esperar, a sua reprodução é exclusivamente ovovivípara. D'Agostino & Provasoli (1968) constatou que *A. franciscana* do Great Salt Lake se reproduzia oviparamente nos períodos em que a ovulação coincidia com as fases de alimento abundante ou escasso. Os resultados deste estudo não são coincidentes, uma vez que a percentagem da reprodução ovípara é muito maior nas condições de concentração de alimento intermédia.

O estudo dos parâmetros demográficos está dependente dos resultados obtidos para as características do ciclo de vida e da reprodução. Como expectável, para *A. parthenogenetica* de Rio Maior a sobrevivência ( $l_x$ ) é maior para as condições de 110 ppt, 24°C, 12h:12h L:O e 37500 células mL<sup>-1</sup> de *Tetraselmis suecica*, uma vez que são estas condições que proporcionam um tempo total de vida maior. A sobrevivência de *A. parthenogenetica* de Aveiro é maior quando as fêmeas são expostas às condições do tratamento base. Já a espécie invasora tem uma sobrevivência maior quando exposta às condições de 110 ppt, 24°C, 0h e 37500 células mL<sup>-1</sup> de alimento.

O tempo geracional (T) reflete o comprimento do período pré-reprodutivo, ou seja, os valores de T tendem a ser maiores, quanto maiores forem os períodos pré-reprodutivos. Este padrão foi observado para todos os tratamentos, de todas as populações testadas, exceto para *A. parthenogenetica* de Rio Maior, quando exposta a 150 ppt. Neste caso, o T é inferior, apesar do período pré-reprodutivo ser maior, comparado com as outras salinidades.

Tanto a taxa de crescimento intrínseco ( $r$ ) como a taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) estimam o crescimento da população, porém o  $r$  é baseado na escala temporal, ao passo que o  $R_0$  é independente do tempo (Huey & Berrigan, 2001). Uma vez que o valor de  $r$  depende exclusivamente da produção de náuplios, é de esperar que os valores mais altos de  $r$  coincidam com as condições em que a descendência ovovivípara é mais abundante. Isto ocorre em todas as condições de todas as espécies exceto: *A. parthenogenetica* de Rio Maior a 150 ppt, *A. parthenogenetica* de Aveiro e *A. franciscana* a 0h. Além disso, *A. parthenogenetica* de Aveiro, quando exposta a total obscuridade, apresenta valores de  $r$  negativos, o que revela que uma população sujeita a estas condições entraria em regressão. No entanto, não é de esperar que a condição de 0h de luz se observe no meio ambiente.

Os parâmetros demográficos ( $r$ ,  $R_0$  e T) foram calculados apenas tendo em conta as ninhadas de náuplios, pelo que os resultados expressos nas figuras 16 e 18 e nas

tabelas dos parâmetros e ciclos reprodutivos (tabelas 5 e 6) são diferentes (conferir significâncias no anexo I).





## CONCLUSÕES GERAIS



## CONCLUSÕES GERAIS

*Artemia parthenogenetica* de Rio Maior apresenta tolerância e adaptação a condições bem definidas: 24 °C, 150 ppt e 37 500 células mL<sup>-1</sup>. Estas condições são normalmente encontradas nas salinas de Rio Maior, pelo que é possível que este biótopo constitua uma barreira à invasão. Além da particularidade da composição da água da salina, a sua localização interior, distante de aquaculturas e fora de rotas migratórias de aves, pode reduzir a possibilidade uma introdução, quer intencional ou acidental, de *A. franciscana*.

*A. parthenogenetica* de Aveiro, apresentou, neste estudo, uma grande vulnerabilidade à invasão, uma vez que o *fitness* e as características reprodutivas da espécie invasora revelaram uma melhor resistência à variabilidade dos fatores ambientais testados. Rodrigues *et al.* (2012) sugere como hipótese para a não-invasão deste biótopo a existência de químicos e poluentes nas salinas de Aveiro. O estudo do papel dos sinais químicos como potenciais mediadores e reguladores de interações competitivas nunca foi contemplado no género *Artemia* e pode ser um fator fundamental para compreender a disseminação de espécies invasoras.

Assim, se quisermos avançar para além de uma compreensão rudimentar de limitações fisiológicas sobre a distribuição biogeográfica das espécies, ecologias populacionais e interações competitivas, será necessário utilizar abordagens multifatoriais mais complexas, em estudos futuros (Browne & Wanigasekera, 2000), e monitorizar o processo invasivo com o objetivo de evitar a extinção de espécies nativas. Além disso, devem ser implementadas políticas de proteção destes ecossistemas, uma vez que o abandono das atividades económicas a eles associadas tem aumentando o risco de perda da biodiversidade.

Apesar de este estudo não responder a todas as questões sobre estas duas populações nativas, os resultados obtidos fornecem informações e sugestões ecológicas para mais estudos relacionados com a invasão.







## BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

- Abatzopoulos T.J., Zhang. B. & Sorgeloos. P., (1998) International study on *Artemia*. LIX. *Artemia tibetiana* preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's republic of China). *International Journal of Salt Lake Research*, **7**: 41–44.
- Abatzopoulos, T.J., Triantaphyllidis, G.V., Roedaki, N., Baxevanis, A.D., Triantaphyllidis, A. & Sorgeloos, P., (2003a). Elevated salinities may enhance the recovery of hydrated heat-shocked *Artemia franciscana* cysts. LXV. International Study on *Artemia*. Belg. J. Zool. 133, 103-110.
- Abatzopoulos, T.J., Baxevanis, D.A., Triantaphyllidis, V.G., Criel, G., Pador, L.E., Van Stappen, G. & Sorgeloos, P., (2006). International Study on *Artemia*. LXIX. Quality evaluation of *Artemia urmiana* Günther (Urmia Lake, Iran) with special emphasis on its particular cyst characteristics. *Aquaculture*, **254**: 442-454.
- Abatzopoulos, T.J., El-Bermawi, N., Vasdekis, C., Baxevanis, A.D. & Sorgeloos, P., (2003b). International Study on *Artemia*. LXVI. Effects of salinity and temperature on reproductive and life span characteristics of clonal *Artemia*. *Hydrobiologia*, **492**: 191-199.
- Agh, N., Van Stappen, G., Bossier, P., Yari, A.M., Rahimian, H. & Sorgeloos, P., (2008). Life cycle characteristics of six *Artemia* populations from Iran. *Aquaculture Research*. 1-13.
- Amat, F. (1985). Biología de *Artemia*. *Informes Tecnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras*, **126-127**: 3-60.
- Amat, F., Barata, C. & Hontoria, I., (1995). Biogeography of genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *International Journal of Salt Lake Research*. **3**: 175-190.
- Amat, F., Gozalbo, A., Navarro, J.C., Hontoria, F. & Varó, I., (1991). Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism. *Hydrobiologia*, **121**: 39-44.
- Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., Vieira, N. & Mura, G. (2007). Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica*, **26 (2)**: 387-404.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, J., Sánchez, M.I., Figuerola, J. & Hortas, F. (2005). The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, **7**: 37-47.
- Asil, S.M., Fereidouni, A.E., Ouraji, H. & Khalili, K.J., (2013). Effects of different light intensities on growth, survival, reproductive and life span characteristics of *Artemia urmiana* (Günther 1890). *Aquaculture Research*, **44**: 554-566.
- Ballardin, E. & Metalli, P., (1963). Osservazioni sulla biologia di *Artemia salina* Leach. Tecniche di colture e fenomeni riproduttivi. *Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Lettere, Rendiconti*, **97(B)**: 194-254.
- Barata, C., Hontoria, F., Amat, F. & Browne, R.A., (1996a). Demographic parameters of sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **196**: 329-340.

Barata, C., Hontoria, F., Amat, F. & Browne, R. (1996b). Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **196**: 313-328.

Browne, R. & Bowen, S., (1991). Taxonomy and population genetics of *Artemia*, em: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N. (Eds.), *Artemia Biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. **9**, pp. 221-235.

Browne, R.A., Davis, L.E. & Sallee, S.E., (1988). Effects of temperature and relative fitness of sexual and asexual brine shrimp *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **124**: 1-20.

Browne, R.A. & Halanych, K.M., (1984). Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana* **57** : 57-71.

Browne, R.A., Sallee, S.E., Grosch, D.S., Segreti, W.O. & Purser, S.M., (1984). Partitioning genetic and environmental components of reproduction and lifespan in *Artemia*. *Ecology*, **65**: 949-960.

Browne, R.A. & Wanigasekera, G. (2000). Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **244**: 29-44.

Cai, Y., (1989) A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). *The Wasmann Journal of Biology*, **47**: 105–110.

Calado, C. & Brandão, J.M., (2009). Salinas interiores em Portugal: o caso das marinhas de Rio Maior. *Geonovas*, **22**: 45-54.

D'Agostino, A.S. & Provasoli, L., (1968). Effect of salinity and nutrients on mono- and diaxenic cultures of two strain of *Artemia salina*. *The Biological Bulletin*, **134**: 1-14.

El-Magsodi, M.O., El-Ghebli, M.O., Enbaya, M.A., Hamza, M., Drebig, U.A. & Sorgeloos, P., (2005). Reproductive and lifespan characteristics of *Artemia* from Libyan Abu Kammash Sabkha. *Libyan Journal of Marine Science*, **10**: 1-8.

Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in bath cultures with different salinities and nutrients concentration. *Aquaculture*, **42**: 207-215.

Fabregas, J., Herreo, C., Cabezas, B. & Abalde, A., (1984). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* with high nutrient concentrations. *Aquaculture Research*, **49**: 231-244.

Gajardo, G., Beardmore, J.A. & Sorgeloos, P. (2001). International study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. *Heredity*, **87** (2): 172-7.

Garcia, J.M., (2009). Implicaciones de la dispersión actual e histórica para la biología evolutiva y conservación de *Artemia* y otros invertebrados acuáticos con estadio de diapausa. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Biologia da Universidade de Sevilha, 142 pp.

Green, A.J., Sánchez, M.I., Amat, F., Figuerola, J., Hontoria, F., Riuz, O. & Hortas, F. (2005). Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. *Limnology and Oceanography*, **50** (2): 737-742.

Gunther, R.T., (1890) Crustacea. Em: Gunther RT (ed) Contributions to the Natural History of Lake Urmi, N.W. Persia and its Neighbourhood. *Journal of the Linnean Society (Zoology)*, **27**: 394–398

Herbold, B. & Moyle, P., (1986). Introduced species and vacant niches. *The American Naturalist*, **125**: 751-760.

Hollander, M. & Wolfe, D.A., (1973). Non-parametric statistical methods. *New York: John Wiley & Sons*, pp. 68-75.

Holm, S., (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**: 65–70.

Hontoria, F., Navarro, J.C., Varo, I., Gozalbo, A., Amat, F. & Vieira, N. (1987). Ensayo de caracterización de cepas autóctonas de *Artemia* de Portugal. Seminário aquacultura. Instituto de Ciências Biomédicas “Abel Salazar Porto (Portugal). Publicação do Instituto de Ciências Biomédicas.

Huey, R.B. & Berrigan, D., (2001). Temperature, demography and ectotherm fitness. *The American Naturalist*, **158**(2): 204-210.

Hufbauer, R.A., (2008). Biological invasions: paradox lost and paradise gained. *Current Biology*, **18**(6): R246-247.

Kellogg, V.A., (1906) A new *Artemia* and its life conditions. *Science*, **24**: 594–596.

Leach, W.E., (1819). Entomostraca, *Dictionnaire des Science Naturelles*, **14**: pág. 524.

Lenz, P.H., (1980). Ecology of an alkali-adapted variety of *Artemia* from Mono Lake, California, U.S.A., em: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The brine shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*. Universa in Aquaculture, Wetteren, Belgium. **3**: pp. 79-96.

Lenz, P.H. & Browne, R.A., (1991). Ecology of *Artemia*, em: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N. (Eds.), *Artemia Biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 237-253.

López, G.R.M., (2012). El recurso de *Artemia* de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Valência, 257 pp.

McDermott, M.J., (1974). Trehalose and glycogen accumulation in cryptobiotic stages of three invertebrates. M. S. Thesis. Biology. St. John's University, New York, p. 62.

Medina, G., Goenaga, J., Hontoria, F., Cohen, G. & Amat, F., (2007). Effects of temperature and salinity on prereproductive life span and reproductive traits of two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Argentina: *Artemia franciscana* and *A. persimilis*. *Hydrobiologia* **579**: 41-53.

Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L. & Boyce, M.S., (1986). Estimating Uncertainty in Population Growth Rates: Jackknife vs. Bootstrap Techniques. *Ecology*, **67**(5): 1156-1166.

Mura, G., Kappas, I., Baxevanis, A., Moscatello, S., D'Amico, Q., Medina, G., Hontoria, F., Amat, F. & Abatzopoulos, T.J., (2006). Morphological and Molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savoia salterns (Italy). *International Review of Hydrobiology*, **91**(6): 539-554.

Naceur, H.B., Jenhani, A.B.R. & Romdhane, M.S., (2011). Influence of some environmental factors on *Artemia salina* life cycle and morphology in Sabkhet El Adhibet (southeast Tunisia). *Biological Letters*. **48**: 67-83.

Nambu, Z., Tanaka, S. & Nambu, F., (2004). Influence of photoperiod and temperature on reproductive mode in the Brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*, **301**(6): 542–546.

Occhipinti-Ambrogi, A. & Savini, D., (2003). Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*. **46**: 542-551.

Persoone, G. & Sorgeloos, P., (1980). General aspects of biogeography of *Artemia*. em: Persoone, G., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 3-24.

Piccinelli, M. & Prosdocimi, T., (1968) Descrizione tassonomica delle due species *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* n. sp. *Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Lettere, Rendiconti B* **102**: 170–179

Pinto, P., Amat, F., Almeida, V. & Vieira, N., (2013a). Review of the biogeography of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Portugal. *International Journal of Artemia Biology* **3**(1): 51-56.

Pinto, P.M., Bio, A., Hontoria, F., Almeida, V. & Vieira, cN., (2013b). Portuguese native *Artemia parthenogenetica* and *Artemia franciscana* survival under different abiotic conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **440**: 81–89.

Quynh, V.D. & Lam, N.N., (1987). Inoculation of *Artemia* in experimental ponds in central Vietnam: an ecological approach and a comparison of three geographical strains, em: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.), *Artemia* research and its applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa in Aquaculture, Wetteren, Belgium. **3**, pp. 253-269.

R Development Core Team, (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>.

Rodrigues, C.M., Bio, A.M., Amat, F.D., Monteiro, N.M. & Vieira, N.M., (2012). Surviving an invasion: characterization of one of the last refugia for *Artemia* diploid parthenogenetic strains. *Wetlands* **32**(6): 1079-1090.

Roman, J.M. & Rodriguez, A., (1986). Cultivo de *Artemia* en estanques de salinas de Cádiz (SO de España). *Scientia Marina: Investigacion Pesquera*, **50**(3), 407-419.

Ruebhart, D.R., Cock, I.E. & Shaw, G.R. (2008). Brine shrimp bioassay: Importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. *Environmental Toxicology*, **23** (4): 555-560.

Soniraj, N., (2004). Effect of salinity on the life span and reproductive characteristics of brine shrimps in the salt pans at Tuticorin. *The Marine Biological Association of India*, **46**(2): 133-140.

Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T. & Sorgeloos, P., (1998). Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostracea). *Journal of Biogeography*, **25**: 213-226.

Triantaphyllidis, G.V., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T.J., Perez, C.A.P. & Sorgeloos, P., (1995). International study on *Artemia*. XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia*, **302**: 215-227.

Van Stappen, G., (2002). Chapter IV. Zoogeography, em: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg J.S., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia* basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 171-224.

Vanhaecke, P., Siddall, E. & Sorgeloos, P., (1984). International study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **80**: 259-275.

Varó, I., Taylor, A.C. & Amat, F., (1993). Comparison of two methods for measuring the rates of oxygen consumption of small aquatic animals (*Artemia*). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Interactive Physiology*, **106**(3): 551-555.

Varó, I., Taylor, A.C. & Amat, F., (1998). The effects of temperature and oxygen tension (PO<sub>2</sub>) on the oxygen consumption rates of adults of different *Artemia* strains. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Interactive Physiology*, **120**(2): 385-390.

Varó, I., Taylor, A.C., Navarro, J.C. & Amat, F., (1991). Effects of temperature and oxygen tension on oxygen consumption rates of nauplii of different *Artemia* strains. *Marine Ecology Progress*, **76**: 25-31.

Vieira, M., (1989). Contribuição para o conhecimento da biologia da *Artemia* sp. proveniente das salinas de Aveiro. Sua importância em aquacultura e na dinâmica daquele ecossistema. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Departamento de Zoologia e Antropologia.

Villamizar, N., García-Mateos, G. & Sánchez-Vázquez, F., (2011). Behavioral responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and *Artemia* sp. exposed to constant light or darkness vs. light/dark cycles of white, red or blue wavelengths. *Aquaculture* **317** (1–4): 197–202.

Wear, R.G. & Haslett, S.J., (1986). Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* Kellogg from Lake Grassmere, New Zealand. I. Growth and mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **98**: 153-166.

Wear, R.G., Haslett, S.J. & Alexander, N.L., (1986). Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* Kellogg from Lake Grassmere, New Zealand. II. Maturation, fecundity and generation times. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **98**: 167-183.

#### Referências bibliográficas eletrónicas:

Ecosal Atlantis

<http://ecosal-Atlantis.ua.pt/>. (Acedido em Agosto, 2013)





## ANEXOS



## ANEXOS

### ANEXO I - RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE ESTATÍSTICA EM R

#### *Artemia parthenogenetica* de Aveiro

| Período pré-reprodutivo |          |    |                        |                |                      |                      |
|-------------------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
|                         | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
| Salinidade              | 5,719    | 1  | 0,01678                |                | 70                   |                      |
|                         |          |    |                        | 110            | 0,019                |                      |
| Temperatura             | 12,1159  | 1  | 0,0004999              |                | 24                   |                      |
|                         |          |    |                        | 29             | 0,00052              |                      |
| Fotoperíodo             | 46,5089  | 2  | $7,95 \times 10^{-11}$ |                | 0                    | 12                   |
|                         |          |    |                        | 12             | $8,5 \times 10^{-9}$ | -                    |
|                         |          |    |                        | 24             | 0,36                 | $1,2 \times 10^{-8}$ |
| Alimento                | 0,612    | 1  | 0,434                  |                | 150                  |                      |
|                         |          |    |                        | 300            | 0,44                 |                      |
| Período reprodutivo     |          |    |                        |                |                      |                      |
|                         | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
| Salinidade              | 4,967    | 1  | 0,02584                |                | 70                   |                      |
|                         |          |    |                        | 110            | 0,029                |                      |
| Temperatura             | 29,6532  | 1  | $5,167 \times 10^{-8}$ |                | 24                   |                      |
|                         |          |    |                        | 29             | $5,5 \times 10^{-8}$ |                      |
| Fotoperíodo             | 31,5114  | 2  | $1,437 \times 10^{-7}$ |                | 0                    | 12                   |
|                         |          |    |                        | 12             | $2,3 \times 10^{-5}$ | -                    |
|                         |          |    |                        | 24             | 0,053                | $2,1 \times 10^{-6}$ |
| Alimento                | 34,1855  | 1  | $5,01 \times 10^{-9}$  |                | 150                  |                      |
|                         |          |    |                        | 300            | $5,4 \times 10^{-9}$ |                      |

### Período pós-reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |       |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|-------|
| Salinidade  | 5,2566   | 1  | 0,02186                |                | 70                   |       |
|             |          |    |                        | 110            | 0,025                |       |
| Temperatura | 14,3518  | 1  | 1,516x10 <sup>-4</sup> |                | 24                   |       |
|             |          |    |                        | 29             | 1,6x10 <sup>-4</sup> |       |
| Fotoperíodo | 4,8065   | 2  | 0,09042                |                | 0                    | 12    |
|             |          |    |                        | 12             | 0,991                | -     |
|             |          |    |                        | 24             | 0,47                 | 0,038 |
| Alimento    | 1,5281   | 1  | 0,2164                 |                | 150                  |       |
|             |          |    |                        | 300            | 0,22                 |       |

### Tempo total de vida

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 5,6006   | 1  | 0,01795                |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                        | 110            | 0,021                |                      |
| Temperatura | 29,1229  | 1  | 6,793x10 <sup>-8</sup> |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                        | 29             | 7,2x10 <sup>-8</sup> |                      |
| Fotoperíodo | 40,4824  | 2  | 1,619x10 <sup>-9</sup> |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                        | 12             | 4,9x10 <sup>-7</sup> | -                    |
|             |          |    |                        | 24             | 0,075                | 6,1x10 <sup>-8</sup> |
| Alimento    | 34,2926  | 1  | 4,742x10 <sup>-9</sup> |                | 150                  |                      |
|             |          |    |                        | 300            | 5,1x10 <sup>-9</sup> |                      |

### Ninhadas por fêmea

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 6,0636   | 1  | 0,0138                 |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                        | 110            | 0,016                |                      |
| Temperatura | 28,4687  | 1  | 9,523x10 <sup>-8</sup> |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                        | 29             | 1,0x10 <sup>-1</sup> |                      |
| Fotoperíodo | 36,37    | 2  | 1,266x10 <sup>-8</sup> |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                        | 12             | 3,6x10 <sup>-6</sup> | -                    |
|             |          |    |                        | 24             | 0,1                  | 1,3x10 <sup>-7</sup> |
| Alimento    | 35,3258  | 1  | 2,789x10 <sup>-9</sup> |                | 150                  |                      |
|             |          |    |                        | 300            | 3,0x10 <sup>-9</sup> |                      |

### Tempo entre ninhadas

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 0,1906   | 1  | 0,6625                 |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                        | 110            | 0,72                 |                      |
| Temperatura | 23,0741  | 1  | 1,559x10 <sup>-6</sup> |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                        | 29             | 1,7x10 <sup>-6</sup> |                      |
| Fotoperíodo | 16,3004  | 2  | 2,887x10 <sup>-4</sup> |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                        | 12             | 0,06298              | -                    |
|             |          |    |                        | 24             | 0,06298              | 2,5x10 <sup>-4</sup> |
| Alimento    | 33,4775  | 1  | 7,209x10 <sup>-9</sup> |                | 150                  |                      |
|             |          |    |                        | 300            | 7,7x10 <sup>-9</sup> |                      |

### Descendência por fêmeas

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                        |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|------------------------|----------------------|
| Salinidade  | 5,3077   | 1  | 0,02123                 |                | 70                     |                      |
|             |          |    |                         | 110            | 0,0067                 |                      |
| Temperatura | 34,572   | 1  | 4,108x10 <sup>-9</sup>  |                | 24                     |                      |
|             |          |    |                         | 29             | 4,4x10 <sup>-9</sup>   |                      |
| Fotoperíodo | 46,4107  | 2  | 8,357x10 <sup>-11</sup> |                | 0                      | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | 12,5x10 <sup>-12</sup> | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | 0,1                    | 1,3x10 <sup>-8</sup> |

|          |         |   |                        |     |                      |
|----------|---------|---|------------------------|-----|----------------------|
| Alimento | 33,7701 | 1 | $6,202 \times 10^{-9}$ |     | 150                  |
|          |         |   |                        | 300 | $6,6 \times 10^{-9}$ |

### Descendência por ninhadas

|            | $\chi^2$ | df | p-value | Kruskal-Wallis |      |
|------------|----------|----|---------|----------------|------|
| Salinidade | 1,8843   | 1  | 0,1698  |                | 70   |
|            |          |    |         | 110            | 0,19 |

|             |        |   |                        |    |                      |
|-------------|--------|---|------------------------|----|----------------------|
| Temperatura | 29,792 | 1 | $5,368 \times 10^{-8}$ |    | 24                   |
|             |        |   |                        | 29 | $5,8 \times 10^{-8}$ |

|             |         |   |                        |    |                      |                      |
|-------------|---------|---|------------------------|----|----------------------|----------------------|
| Fotoperíodo | 34,0656 | 2 | $4,006 \times 10^{-8}$ |    | 0                    | 12                   |
|             |         |   |                        | 12 | $1,2 \times 10^{-6}$ | -                    |
|             |         |   |                        | 24 | 0,25                 | $1,9 \times 10^{-6}$ |

|          |         |   |                        |     |                      |
|----------|---------|---|------------------------|-----|----------------------|
| Alimento | 33,2634 | 1 | $8,048 \times 10^{-9}$ |     | 150                  |
|          |         |   |                        | 300 | $8,6 \times 10^{-9}$ |

### Ovoviviparidade

|            | $\chi^2$ | df | p-value | Kruskal-Wallis |      |
|------------|----------|----|---------|----------------|------|
| Salinidade | 1,6957   | 1  | 0,1929  |                | 70   |
|            |          |    |         | 110            | 0,24 |

|             |         |   |                       |    |                    |
|-------------|---------|---|-----------------------|----|--------------------|
| Temperatura | 21,9285 | 1 | $2,83 \times 10^{-6}$ |    | 24                 |
|             |         |   |                       | 29 | $3 \times 10^{-6}$ |

|             |         |   |                        |    |                      |         |
|-------------|---------|---|------------------------|----|----------------------|---------|
| Fotoperíodo | 46,0578 | 2 | $9,97 \times 10^{-11}$ |    | 0                    | 12      |
|             |         |   |                        | 12 | $1,0 \times 10^{-8}$ | -       |
|             |         |   |                        | 24 | $6,2 \times 10^{-7}$ | 0,00059 |

### Náuplios vivos

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |         |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|---------|
| Salinidade  | 1,4448   | 1  | 0,2294                  |                | 70                   |         |
|             |          |    |                         | 110            | 0,28                 |         |
| Temperatura | 22,228   | 1  | 2,421x10 <sup>-6</sup>  |                | 24                   |         |
|             |          |    |                         | 29             | 2,6x10 <sup>-6</sup> |         |
| Fotoperíodo | 48,9458  | 2  | 2,353x10 <sup>-11</sup> |                | 0                    | 12      |
|             |          |    |                         | 12             | 2,6x10 <sup>-9</sup> | -       |
|             |          |    |                         | 24             | 9,4x10 <sup>-8</sup> | 0,00039 |
| Alimento    | 32,9871  | 1  | 9,277x10 <sup>-9</sup>  |                | 150                  |         |
|             |          |    |                         | 300            | 1x10 <sup>-8</sup>   |         |

### Náuplios mortos

|             | $\chi^2$ | df | p-value   | Kruskal-Wallis |         |         |
|-------------|----------|----|-----------|----------------|---------|---------|
| Salinidade  | 0,209    | 1  | 0,6475    |                | 70      |         |
|             |          |    |           | 110            | 0,68    |         |
| Temperatura | 2,1652   | 1  | 0,1412    |                | 24      |         |
|             |          |    |           | 29             | 0,14    |         |
| Fotoperíodo | 16,0073  | 2  | 0,0003342 |                | 0       | 12      |
|             |          |    |           | 12             | 0,00027 | -       |
|             |          |    |           | 24             | 0,01931 | 0,08237 |
| Alimento    | 8,7117   | 1  | 0,003162  |                | 150     |         |
|             |          |    |           | 300            | 0,0033  |         |

**Abortos**

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |         |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|---------|
| Salinidade  | 1,8335   | 1  | 0,1757                 |                | 70                   |         |
|             |          |    |                        | 110            | 0,19                 |         |
| Temperatura | 9,3291   | 1  | 0,002255               |                | 24                   |         |
|             |          |    |                        | 29             | 0,0023               |         |
| Fotoperíodo | 27,3483  | 2  | 1,152x10 <sup>-6</sup> |                | 0                    | 12      |
|             |          |    |                        | 12             | 5,3x10 <sup>-7</sup> | -       |
|             |          |    |                        | 24             | 0,00018              | 0,27063 |
| Alimento    | 23,6417  | 1  | 1,16x10 <sup>-6</sup>  |                | 150                  |         |
|             |          |    |                        | 300            | 1,2x10 <sup>-6</sup> |         |

**Quistos**

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 5,3097   | 1  | 0,02121                 |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                         | 110            | 6,4x10 <sup>-9</sup> |                      |
| Temperatura | 33,8245  | 1  | 6,031x10 <sup>-9</sup>  |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | 0,0023               |                      |
| Fotoperíodo | 42,3741  | 2  | 6,289x10 <sup>-10</sup> |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | 0,014                | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | 1,1x10 <sup>-6</sup> | 3,2x10 <sup>-8</sup> |
| Alimento    | 29,4602  | 1  | 5,708x10 <sup>-8</sup>  |                | 150                  |                      |
|             |          |    |                         | 300            | 6,1x10 <sup>-8</sup> |                      |

**r**

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                       |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| Temperatura | 35,3725  | 1  | 2,723x10 <sup>-9</sup>  |                | 24                    |                      |
|             |          |    |                         | 29             | 2,9x10 <sup>-9</sup>  |                      |
| Fotoperíodo | 64,4157  | 2  | 1,029x10 <sup>-14</sup> |                | 0                     | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | 1,3x10 <sup>-9</sup>  | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | 1,3x10 <sup>-9</sup>  | 3,1x10 <sup>-9</sup> |
| Alimento    | 37,5913  | 1  | 8,723x10 <sup>-10</sup> |                | 150                   |                      |
|             |          |    |                         | 300            | 9,3x10 <sup>-10</sup> |                      |

## T

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|
| Temperatura | 35,3725  | 1  | $2,723 \times 10^{-9}$ |                | 24                   |
|             |          |    |                        | 29             | $2,9 \times 10^{-9}$ |

|             |         |   |                         |    |                      |                      |
|-------------|---------|---|-------------------------|----|----------------------|----------------------|
| Fotoperíodo | 64,4157 | 2 | $1,029 \times 10^{-14}$ |    | 0                    | 12                   |
|             |         |   |                         | 12 | $1,3 \times 10^{-9}$ | -                    |
|             |         |   |                         | 24 | $1,3 \times 10^{-9}$ | $3,1 \times 10^{-9}$ |

|          |         |   |                         |     |                       |
|----------|---------|---|-------------------------|-----|-----------------------|
| Alimento | 37,5913 | 1 | $8,723 \times 10^{-10}$ |     | 150                   |
|          |         |   |                         | 300 | $9,3 \times 10^{-10}$ |

## R0

|             | $\chi^2$ | df | p-value               | Kruskal-Wallis |                      |
|-------------|----------|----|-----------------------|----------------|----------------------|
| Temperatura | 35,3747  | 1  | $2,72 \times 10^{-9}$ |                | 24                   |
|             |          |    |                       | 29             | $2,9 \times 10^{-9}$ |

|             |         |   |                        |    |                      |                      |
|-------------|---------|---|------------------------|----|----------------------|----------------------|
| Fotoperíodo | 64,4169 | 2 | $1,02 \times 10^{-14}$ |    | 0                    | 12                   |
|             |         |   |                        | 12 | $1,3 \times 10^{-9}$ | -                    |
|             |         |   |                        | 24 | $1,3 \times 10^{-9}$ | $3,0 \times 10^{-9}$ |

|          |         |   |                         |     |                       |
|----------|---------|---|-------------------------|-----|-----------------------|
| Alimento | 37,5935 | 1 | $8,714 \times 10^{-10}$ |     | 150                   |
|          |         |   |                         | 300 | $9,3 \times 10^{-10}$ |

### *Artemia franciscana*

#### Período pré-reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                    |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| Salinidade  | 16,2324  | 1  | $5,603 \times 10^{-5}$ |                | 70                   |                    |
|             |          |    |                        | 110            | $5,9 \times 10^{-5}$ |                    |
| Temperatura | 1,5836   | 1  | 0,2082                 |                | 24                   |                    |
|             |          |    |                        | 29             | 0,21                 |                    |
| Fotoperíodo | 27,9662  | 2  | $8,457 \times 10^{-7}$ |                | 0                    | 12                 |
|             |          |    |                        | 12             | $2,1 \times 10^{-6}$ | -                  |
|             |          |    |                        | 24             | 0,15061              | 0,0002             |
| Alimento    | 47,7164  | 2  | $4,35 \times 10^{-11}$ |                | 37,5                 | 150                |
|             |          |    |                        | 150            | $9 \times 10^{-7}$   | -                  |
|             |          |    |                        | 300            | $9 \times 10^{-7}$   | $9 \times 10^{-7}$ |

#### Período reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 16,7295  | 1  | $4,311 \times 10^{-5}$ |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                        | 110            | $4,5 \times 10^{-5}$ |                      |
| Temperatura | 13,8696  | 1  | 0,0001959              |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                        | 29             | 0,0002               |                      |
| Fotoperíodo | 22,2237  | 2  | $1,493 \times 10^{-5}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                        | 12             | 0,51743              | -                    |
|             |          |    |                        | 24             | 0,00021              | $9,7 \times 10^{-5}$ |
| Alimento    | 14,0185  | 2  | 0,0009035              |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                        | 150            | 0,0068               | -                    |
|             |          |    |                        | 300            | 0,0034               | 0,0832               |

### Período pós-reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |         |         |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|---------|---------|
| Salinidade  | 6,158    | 1  | 0,01308                |                | 70      |         |
|             |          |    |                        | 110            | 0,013   |         |
| Temperatura | 0,961    | 1  | 0,3269                 |                | 24      |         |
|             |          |    |                        | 29             | 0,33    |         |
| Fotoperíodo | 0,3553   | 2  | 0,8372                 |                | 0       | 12      |
|             |          |    |                        | 12             | 1       | -       |
|             |          |    |                        | 24             | 1       | 1       |
| Alimento    | 20,5706  | 2  | 3,413x10 <sup>-5</sup> |                | 37,5    | 150     |
|             |          |    |                        | 150            | 0,00017 | -       |
|             |          |    |                        | 300            | 0,00015 | 0,81087 |

### Tempo total de vida

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |         |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|---------|
| Salinidade  | 21,4622  | 1  | 3,609x10 <sup>-6</sup> |                | 70                   |         |
|             |          |    |                        | 110            | 3,8x10 <sup>-6</sup> |         |
| Temperatura | 9,451    | 1  | 0,00211                |                | 24                   |         |
|             |          |    |                        | 29             | 0,0022               |         |
| Fotoperíodo | 19,2465  | 2  | 6,617x10 <sup>-5</sup> |                | 0                    | 12      |
|             |          |    |                        | 12             | 0,05462              | -       |
|             |          |    |                        | 24             | 0,00013              | 0,00688 |
| Alimento    | 19,7649  | 2  | 5,106x10 <sup>-5</sup> |                | 37,5                 | 150     |
|             |          |    |                        | 150            | 0,00042              | -       |
|             |          |    |                        | 300            | 8,9x10 <sup>-5</sup> | 0,54207 |

### Ninhadas por fêmea

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |         |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|---------|
| Salinidade  | 15,9909  | 1  | $6,365 \times 10^{-5}$ |                | 70                   |         |
|             |          |    |                        | 110            | $6,7 \times 10^{-5}$ |         |
| Temperatura | 10,8826  | 1  | 0,0009707              |                | 24                   |         |
|             |          |    |                        | 29             | 0,001                |         |
| Fotoperíodo | 22,0563  | 2  | $1,624 \times 10^{-5}$ |                | 0                    | 12      |
|             |          |    |                        | 12             | 0,27506              | -       |
|             |          |    |                        | 24             | 0,0002               | 0,0002  |
| Alimento    | 19,7819  | 2  | $5,063 \times 10^{-5}$ |                | 37,5                 | 150     |
|             |          |    |                        | 150            | 0,00114              | -       |
|             |          |    |                        | 300            | 0,00036              | 0,02974 |

### Tempo entre ninhadas

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |        |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|--------|
| Salinidade  | 7,7983   | 1  | 0,005229               |                | 70                   |        |
|             |          |    |                        | 110            | 0,0054               |        |
| Temperatura | 16,2707  | 1  | $5,491 \times 10^{-5}$ |                | 24                   |        |
|             |          |    |                        | 29             | $5,8 \times 10^{-5}$ |        |
| Fotoperíodo | 10,777   | 2  | 0,004569               |                | 0                    | 12     |
|             |          |    |                        | 12             | 0,2398               | -      |
|             |          |    |                        | 24             | 0,0604               | 0,0059 |
| Alimento    | 1,1925   | 2  | 0,5509                 |                | 37,5                 | 150    |
|             |          |    |                        | 150            | 0,87                 | -      |
|             |          |    |                        | 300            | 0,87                 | 0,87   |

### Descendência por fêmeas

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 11,5942  | 1  | 0,0006616               |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                         | 110            | 0,00046              |                      |
| Temperatura | 15,9698  | 1  | 6,436x10 <sup>-5</sup>  |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | 2,6x10 <sup>-5</sup> |                      |
| Fotoperíodo | 21,4157  | 2  | 2,237x10 <sup>-5</sup>  |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | 0,74218              | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | 0,00038              | 9,5x10 <sup>-5</sup> |
| Alimento    | 42,4796  | 2  | 5,966x10 <sup>-10</sup> |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                         | 150            | 1,4x10 <sup>-6</sup> | -                    |
|             |          |    |                         | 300            | 1,4x10 <sup>-6</sup> | 1,8x10 <sup>-5</sup> |

### Descendência por ninhadas

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 0,8374   | 1  | 0,3601                 |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                        | 110            | 0,37                 |                      |
| Temperatura | 18,0284  | 1  | 2,176x10 <sup>-5</sup> |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                        | 29             | 6,2x10 <sup>-6</sup> |                      |
| Fotoperíodo | 6,8106   | 2  | 0,0332                 |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                        | 12             | 0,317                | -                    |
|             |          |    |                        | 24             | 0,328                | 0,026                |
| Alimento    | 46,1228  | 2  | 9,65x10 <sup>-11</sup> |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                        | 150            | 9,9x10 <sup>-7</sup> | -                    |
|             |          |    |                        | 300            | 9,9x10 <sup>-7</sup> | 1,6x10 <sup>-7</sup> |

### Ovoviviparidade

|             | $\chi^2$ | df | p-value  | Kruskal-Wallis |        |      |
|-------------|----------|----|----------|----------------|--------|------|
| Salinidade  | 10,6068  | 1  | 0,001127 |                | 70     |      |
|             |          |    |          | 110            | 0,0012 |      |
| Temperatura | 0,0146   | 1  | 0,9039   |                | 24     |      |
|             |          |    |          | 29             | 0,91   |      |
| Fotoperíodo | 13,6021  | 2  | 0,001113 |                | 0      | 12   |
|             |          |    |          | 12             | 0,0024 | -    |
|             |          |    |          | 24             | 0,2412 | 0,01 |
| Alimento    | 3,6149   | 2  | 0,1641   |                | 37,5   | 150  |
|             |          |    |          | 150            | 0,56   | -    |
|             |          |    |          | 300            | 0,56   | 0,17 |

### Náuplios vivos

|             | $\chi^2$ | df | p-value  | Kruskal-Wallis |       |       |
|-------------|----------|----|----------|----------------|-------|-------|
| Salinidade  | 7,0816   | 1  | 0,007788 |                | 70    |       |
|             |          |    |          | 110            | 0,008 |       |
| Temperatura | 0,0214   | 1  | 0,8837   |                | 24    |       |
|             |          |    |          | 29             | 0,9   |       |
| Fotoperíodo | 7,1559   | 2  | 0,02793  |                | 0     | 12    |
|             |          |    |          | 12             | 0,053 | -     |
|             |          |    |          | 24             | 0,617 | 0,055 |
| Alimento    | 7,2485   | 2  | 0,02667  |                | 37,5  | 150   |
|             |          |    |          | 150            | 0,231 | -     |
|             |          |    |          | 300            | 0,062 | 0,119 |

### Náuplios mortos

|             | $\chi^2$ | df | p-value | Kruskal-Wallis |       |       |
|-------------|----------|----|---------|----------------|-------|-------|
| Salinidade  | 3,2134   | 1  | 0,07304 |                | 70    |       |
|             |          |    |         | 110            | 0,075 |       |
| Temperatura | 1,0816   | 1  | 0,2983  |                | 24    |       |
|             |          |    |         | 29             | 0,31  |       |
| Fotoperíodo | 6,4603   | 2  | 0,03955 |                | 0     | 12    |
|             |          |    |         | 12             | 0,058 | -     |
|             |          |    |         | 24             | 0,424 | 0,094 |
| Alimento    | 5,9057   | 2  | 0,05219 |                | 37,5  | 150   |
|             |          |    |         | 150            | 0,29  | -     |
|             |          |    |         | 300            | 0,13  | 0,22  |

### Abortos

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |        |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|--------|
| Salinidade  | 22,2762  | 1  | $2,361 \times 10^{-6}$ |                | 70                   |        |
|             |          |    |                        | 110            | $2,5 \times 10^{-6}$ |        |
| Temperatura | 1,8765   | 1  | 0,1707                 |                | 24                   |        |
|             |          |    |                        | 29             | 0,18                 |        |
| Fotoperíodo | 28,5955  | 2  | $6,174 \times 10^{-7}$ |                | 0                    | 12     |
|             |          |    |                        | 12             | $4,5 \times 10^{-7}$ | -      |
|             |          |    |                        | 24             | 0,0154               | 0,0018 |
| Alimento    | 12,0251  | 2  | 0,002448               |                | 37,5                 | 150    |
|             |          |    |                        | 150            | 0,0057               | -      |
|             |          |    |                        | 300            | 0,0249               | 0,3685 |

### Quistos

|             | $\chi^2$ | df | p-value | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|---------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 0,7      | 1  | 0,7445  |                | 70                   |                      |
|             |          |    |         | 110            | 0,39                 |                      |
| Temperatura | 1,8765   | 1  | 13,6914 |                | 24                   |                      |
|             |          |    |         | 29             | 0,00023              |                      |
| Fotoperíodo | 28,5955  | 2  | 31,554  |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |         | 12             | 0,02                 | -                    |
|             |          |    |         | 24             | $5,6 \times 10^{-5}$ | $1,2 \times 10^{-6}$ |
| Alimento    | 12,0251  | 2  | 24,4801 |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |         | 150            | $1,6 \times 10^{-5}$ | -                    |
|             |          |    |         | 300            | 0,00036              | 0,01437              |

### r

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 35,984   | 1  | $1,989 \times 10^{-9}$  |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                         | 110            | $2,1 \times 10^{-9}$ |                      |
| Temperatura | 31,8552  | 1  | $1,661 \times 10^{-8}$  |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | $1,8 \times 10^{-8}$ |                      |
| Fotoperíodo | 51,9645  | 2  | $5,201 \times 10^{-12}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | 0,00037              | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | $2,1 \times 10^{-8}$ | $6,4 \times 10^{-9}$ |
| Alimento    | 57,5384  | 2  | $3,204 \times 10^{-13}$ |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                         | 150            | $3,5 \times 10^{-8}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 300            | $3,7 \times 10^{-8}$ | $2,7 \times 10^{-9}$ |

**T**

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 4,082    | 1  | 0,04334                 |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                         | 110            | 0,044                |                      |
| Temperatura | 29,6205  | 1  | $5,255 \times 10^{-8}$  |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | $5,6 \times 10^{-8}$ |                      |
| Fotoperíodo | 58,1301  | 2  | $2,383 \times 10^{-13}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | $2,1 \times 10^{-8}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | $2,1 \times 10^{-8}$ | $3,6 \times 10^{-8}$ |
| Alimento    | 57,5384  | 2  | $3,204 \times 10^{-13}$ |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                         | 150            | $3,5 \times 10^{-8}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 300            | $3,7 \times 10^{-8}$ | $2,7 \times 10^{-9}$ |

**R0**

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 35,986   | 1  | $1,987 \times 10^{-9}$  |                | 70                   |                      |
|             |          |    |                         | 110            | $2,1 \times 10^{-9}$ |                      |
| Temperatura | 30,1101  | 1  | $4,082 \times 10^{-8}$  |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | $4,3 \times 10^{-8}$ |                      |
| Fotoperíodo | 60,7813  | 2  | $6,332 \times 10^{-14}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | $1,4 \times 10^{-8}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | $1,4 \times 10^{-8}$ | $6,4 \times 10^{-9}$ |
| Alimento    | 57,5384  | 2  | $3,204 \times 10^{-13}$ |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                         | 150            | $3,5 \times 10^{-8}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 300            | $3,7 \times 10^{-8}$ | $2,7 \times 10^{-9}$ |

### *Artemia parthenogenetica* de Rio Maior

#### Período pré-reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 13,1615  | 2  | 0,001387                |                | 70                   | 110                  |
|             |          |    |                         | 110            | $5,9 \times 10^{-5}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 150            | 0,0057               | 0,8323               |
| Temperatura | 10,0827  | 1  | 0,001497                |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | 0,0015               |                      |
| Fotoperíodo | 48,7962  | 2  | $2,535 \times 10^{-11}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | $6,4 \times 10^{-8}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | $4,4 \times 10^{-7}$ | $3,0 \times 10^{-6}$ |
| Alimento    | 10,482   | 2  | 0,005295                |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                         | 150            | 0,039                | -                    |
|             |          |    |                         | 300            | 0,039                | 0,025                |

#### Período reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value                | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 12,4961  | 2  | 0,001934               |                | 70                   | 110                  |
|             |          |    |                        | 110            | 0,47655              | -                    |
|             |          |    |                        | 150            | 0,00028              | 0,47655              |
| Temperatura | 30,9424  | 1  | $2,658 \times 10^{-8}$ |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                        | 29             | $2,8 \times 10^{-8}$ |                      |
| Fotoperíodo | 40,1435  | 2  | $1,918 \times 10^{-9}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                        | 12             | $2,7 \times 10^{-7}$ | -                    |
|             |          |    |                        | 24             | 0,52                 | $1,1 \times 10^{-7}$ |
| Alimento    | 29,7268  | 2  | $3,507 \times 10^{-7}$ |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                        | 150            | $1,8 \times 10^{-5}$ | -                    |
|             |          |    |                        | 300            | $1,1 \times 10^{-7}$ | 0,73                 |

### Período pós-reprodutivo

|             | $\chi^2$ | df | p-value | Kruskal-Wallis |       |       |
|-------------|----------|----|---------|----------------|-------|-------|
| Salinidade  | 2,1241   | 2  | 0,3458  |                | 70    | 110   |
|             |          |    |         | 110            | 0,46  | -     |
|             |          |    |         | 150            | 0,82  | 0,82  |
| Temperatura | 5,549    | 1  | 0,01849 |                | 24    |       |
|             |          |    |         | 29             | 0,019 |       |
| Fotoperíodo | 1,7253   | 2  | 0,422   |                | 0     | 12    |
|             |          |    |         | 12             | 0,89  | -     |
|             |          |    |         | 24             | 0,46  | 0,89  |
| Alimento    | 4,9659   | 2  | 0,0893  |                | 37,5  | 150   |
|             |          |    |         | 150            | 0,396 | -     |
|             |          |    |         | 300            | 0,074 | 0,396 |

### Tempo total de vida

|             | $\chi^2$ | df | p-value                 | Kruskal-Wallis |                      |                      |
|-------------|----------|----|-------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Salinidade  | 8,163    | 2  | 0,01688                 |                | 70                   | 110                  |
|             |          |    |                         | 110            | 0,7249               | -                    |
|             |          |    |                         | 150            | 0,0064               | 0,3167               |
| Temperatura | 32,7076  | 1  | $1,071 \times 10^{-8}$  |                | 24                   |                      |
|             |          |    |                         | 29             | $1,1 \times 10^{-8}$ |                      |
| Fotoperíodo | 43,0008  | 2  | $4,597 \times 10^{-10}$ |                | 0                    | 12                   |
|             |          |    |                         | 12             | $3,6 \times 10^{-5}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 24             | $3,6 \times 10^{-5}$ | $4,0 \times 10^{-8}$ |
| Alimento    | 34,5652  | 2  | $3,121 \times 10^{-8}$  |                | 37,5                 | 150                  |
|             |          |    |                         | 150            | $1,7 \times 10^{-7}$ | -                    |
|             |          |    |                         | 300            | $9,0 \times 10^{-7}$ | 0,73                 |

### Ninhadas por fêmea

|            | $\chi^2$ | df | p-value  |
|------------|----------|----|----------|
| Salinidade | 9,0707   | 2  | 0,,01072 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70     | 110    |
|-----|--------|--------|
| 110 | 0,9593 | -      |
| 150 | 0,0045 | 0,2088 |

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Temperatura | 21,2345 | 1 | $4,064 \times 10^{-6}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Fotoperíodo | 38,2998 | 2 | $4,823 \times 10^{-9}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|    | 0                    | 12                   |
|----|----------------------|----------------------|
| 12 | $4,1 \times 10^{-7}$ | -                    |
| 24 | 0,75                 | $4,1 \times 10^{-7}$ |

|          |         |   |                        |
|----------|---------|---|------------------------|
| Alimento | 25,9794 | 2 | $2,284 \times 10^{-6}$ |
|----------|---------|---|------------------------|

|     | 37,5                 | 150   |
|-----|----------------------|-------|
| 150 | $5,7 \times 10^{-5}$ | -     |
| 300 | $3,3 \times 10^{-6}$ | 0,066 |

### Tempo entre ninhadas

|            | $\chi^2$ | df | p-value |
|------------|----------|----|---------|
| Salinidade | 6,5343   | 2  | 0,03812 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70   | 110  |
|-----|------|------|
| 110 | 0,16 | -    |
| 150 | 0,16 | 0,16 |

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Temperatura | 17,6243 | 1 | $2,691 \times 10^{-5}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|             |         |   |          |
|-------------|---------|---|----------|
| Fotoperíodo | 13,5638 | 2 | 0,001134 |
|-------------|---------|---|----------|

|    | 0      | 12     |
|----|--------|--------|
| 12 | 0,0025 | -      |
| 24 | 0,1446 | 0,0177 |

|          |         |   |                        |
|----------|---------|---|------------------------|
| Alimento | 19,0397 | 2 | $7,338 \times 10^{-5}$ |
|----------|---------|---|------------------------|

|     | 37,5                 | 150     |
|-----|----------------------|---------|
| 150 | 0,00058              | -       |
| 300 | $7,5 \times 10^{-5}$ | 0,43654 |

### Descendência por fêmeas

|            | $\chi^2$ | df | p-value   |
|------------|----------|----|-----------|
| Salinidade | 17,7423  | 2  | 0,0001404 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70                   | 110   |
|-----|----------------------|-------|
| 110 | 0,763                | -     |
| 150 | $7,8 \times 10^{-5}$ | 0,015 |

|             |        |   |                        |
|-------------|--------|---|------------------------|
| Temperatura | 24,004 | 1 | $9,613 \times 10^{-7}$ |
|-------------|--------|---|------------------------|

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Fotoperíodo | 27,0006 | 2 | $1,371 \times 10^{-6}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|    | 0                    | 12                   |
|----|----------------------|----------------------|
| 12 | $2,2 \times 10^{-5}$ | -                    |
| 24 | 0,72                 | $2,2 \times 10^{-5}$ |

|          |      |   |                        |
|----------|------|---|------------------------|
| Alimento | 28,2 | 2 | $7,524 \times 10^{-7}$ |
|----------|------|---|------------------------|

|     | 37,5                 | 150  |
|-----|----------------------|------|
| 150 | $4,3 \times 10^{-6}$ | -    |
| 300 | $4,3 \times 10^{-6}$ | 0,71 |

### Descendência por ninhadas

|            | $\chi^2$ | df | p-value                |
|------------|----------|----|------------------------|
| Salinidade | 25,8395  | 2  | $2,449 \times 10^{-6}$ |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70                   | 110                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 110 | 0,75                 | -                    |
| 150 | $1,6 \times 10^{-5}$ | $3,1 \times 10^{-6}$ |

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Temperatura | 20,4113 | 1 | $6,246 \times 10^{-6}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|             |        |   |        |
|-------------|--------|---|--------|
| Fotoperíodo | 4,3177 | 2 | 0,1155 |
|-------------|--------|---|--------|

|    | 0    | 12   |
|----|------|------|
| 12 | 0,12 | -    |
| 24 | 0,39 | 0,49 |

|          |         |   |                        |
|----------|---------|---|------------------------|
| Alimento | 30,8605 | 2 | $1,989 \times 10^{-7}$ |
|----------|---------|---|------------------------|

|     | 37,5                 | 150   |
|-----|----------------------|-------|
| 150 | $5,2 \times 10^{-6}$ | -     |
| 300 | $4,3 \times 10^{-6}$ | 0,029 |

### Ovoviviparidade

|            | $\chi^2$ | df | p-value  |
|------------|----------|----|----------|
| Salinidade | 9,218    | 2  | 0,009962 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70    | 110   |
|-----|-------|-------|
| 110 | 0,039 | -     |
| 150 | 0,025 | 0,735 |

|             |         |   |           |
|-------------|---------|---|-----------|
| Temperatura | 14,8276 | 1 | 0,0001178 |
|-------------|---------|---|-----------|

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Fotoperíodo | 31,6959 | 2 | $1,310 \times 10^{-7}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|    | 0      | 12                   |
|----|--------|----------------------|
| 12 | 0,0018 | -                    |
| 24 | 0,004  | $3,2 \times 10^{-7}$ |

|          |         |   |                        |
|----------|---------|---|------------------------|
| Alimento | 20,7176 | 2 | $3,171 \times 10^{-5}$ |
|----------|---------|---|------------------------|

|     | 37,5    | 150   |
|-----|---------|-------|
| 150 | 0,00018 | -     |
| 300 | 0,00018 | 0,029 |

### Náuplios vivos

|            | $\chi^2$ | df | p-value |
|------------|----------|----|---------|
| Salinidade | 9,0166   | 2  | 0,01102 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70    | 110   |
|-----|-------|-------|
| 110 | 0,05  | -     |
| 150 | 0,036 | 0,144 |

|             |        |   |          |
|-------------|--------|---|----------|
| Temperatura | 7,5975 | 1 | 0,005845 |
|-------------|--------|---|----------|

|             |         |   |           |
|-------------|---------|---|-----------|
| Fotoperíodo | 17,7314 | 2 | 0,0001412 |
|-------------|---------|---|-----------|

|    | 0       | 12      |
|----|---------|---------|
| 12 | 0,03513 | -       |
| 24 | 0,04471 | 0,00013 |

|          |        |   |         |
|----------|--------|---|---------|
| Alimento | 6,7363 | 2 | 0,03445 |
|----------|--------|---|---------|

|     | 37,5  | 150  |
|-----|-------|------|
| 150 | 0,04  | -    |
| 300 | 0,043 | 0,94 |

### Náuplios mortos

|            | $\chi^2$ | df | p-value |
|------------|----------|----|---------|
| Salinidade | 4,9853   | 2  | 0,08269 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70   | 110  |
|-----|------|------|
| 110 | 0,13 | -    |
| 150 | 0,6  | 0,13 |

|             |        |   |        |
|-------------|--------|---|--------|
| Temperatura | 0,3914 | 1 | 0,5316 |
|-------------|--------|---|--------|

|             |        |   |        |
|-------------|--------|---|--------|
| Fotoperíodo | 4,4307 | 2 | 0,1091 |
|-------------|--------|---|--------|

|    | 0   | 12  |
|----|-----|-----|
| 12 | 0,5 | -   |
| 24 | 0,5 | 0,1 |

|          |         |   |          |
|----------|---------|---|----------|
| Alimento | 10,2191 | 2 | 0,006039 |
|----------|---------|---|----------|

|     | 37,5   | 150    |
|-----|--------|--------|
| 150 | 0,0311 | -      |
| 300 | 0,0075 | 0,1556 |

### Abortos

|            | $\chi^2$ | df | p-value  |
|------------|----------|----|----------|
| Salinidade | 9,3758   | 2  | 0,009206 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70     | 110   |
|-----|--------|-------|
| 110 | 0,2398 | -     |
| 150 | 0,0074 | 0,325 |

|             |        |   |         |
|-------------|--------|---|---------|
| Temperatura | 3,6105 | 1 | 0,05742 |
|-------------|--------|---|---------|

|             |        |   |        |
|-------------|--------|---|--------|
| Fotoperíodo | 1,9162 | 2 | 0,3836 |
|-------------|--------|---|--------|

|    | 0    | 12   |
|----|------|------|
| 12 | 0,62 | -    |
| 24 | 0,62 | 0,62 |

|          |        |   |         |
|----------|--------|---|---------|
| Alimento | 5,1459 | 2 | 0,07631 |
|----------|--------|---|---------|

|     | 37,5 | 150  |
|-----|------|------|
| 150 | 0,11 | -    |
| 300 | 0,23 | 0,23 |

### Quistos

|            | $\chi^2$ | df | p-value   |
|------------|----------|----|-----------|
| Salinidade | 15,0314  | 2  | 0,0005445 |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70      | 110     |
|-----|---------|---------|
| 110 | 0,1903  | -       |
| 150 | 0,00064 | 0,01725 |

|             |        |   |                        |
|-------------|--------|---|------------------------|
| Temperatura | 19,973 | 1 | $7,854 \times 10^{-6}$ |
|-------------|--------|---|------------------------|

|             |         |   |          |
|-------------|---------|---|----------|
| Fotoperíodo | 10,5812 | 2 | 0,005039 |
|-------------|---------|---|----------|

|    | 0     | 12    |
|----|-------|-------|
| 12 | 0,014 | -     |
| 24 | 0,011 | 0,934 |

|          |         |   |                        |
|----------|---------|---|------------------------|
| Alimento | 25,6661 | 2 | $2,671 \times 10^{-6}$ |
|----------|---------|---|------------------------|

|     | 37,5                 | 150  |
|-----|----------------------|------|
| 150 | $3,0 \times 10^{-5}$ | -    |
| 300 | $6,9 \times 10^{-6}$ | 0,16 |

### r

|            | $\chi^2$ | df | p-value                 |
|------------|----------|----|-------------------------|
| Salinidade | 48,0049  | 2  | $3,766 \times 10^{-11}$ |

#### Kruskal-Wallis

|     | 70                   | 110                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 110 | $8,0 \times 10^{-7}$ | -                    |
| 150 | $1,3 \times 10^{-7}$ | $1,9 \times 10^{-6}$ |

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Temperatura | 32,1928 | 1 | $1,396 \times 10^{-8}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|             |         |   |                         |
|-------------|---------|---|-------------------------|
| Fotoperíodo | 63,9468 | 2 | $1,301 \times 10^{-14}$ |
|-------------|---------|---|-------------------------|

|    | 0                    | 12                   |
|----|----------------------|----------------------|
| 12 | $4,1 \times 10^{-9}$ | -                    |
| 24 | $4,1 \times 10^{-9}$ | $4,1 \times 10^{-9}$ |

|          |         |   |                         |
|----------|---------|---|-------------------------|
| Alimento | 56,4684 | 2 | $5,471 \times 10^{-13}$ |
|----------|---------|---|-------------------------|

|     | 37,5                 | 150                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 150 | $1,4 \times 10^{-7}$ | -                    |
| 300 | $1,4 \times 10^{-7}$ | $9,1 \times 10^{-9}$ |

**T**

|            | $\chi^2$ | df | p-value                 |
|------------|----------|----|-------------------------|
| Salinidade | 41,6271  | 2  | $9,137 \times 10^{-10}$ |

## Kruskal-Wallis

|     | 70                   | 110                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 110 | 0,00053              | -                    |
| 150 | $1,3 \times 10^{-7}$ | $3,7 \times 10^{-6}$ |

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Temperatura | 32,1928 | 1 | $1,396 \times 10^{-8}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|             |         |   |                         |
|-------------|---------|---|-------------------------|
| Fotoperíodo | 63,9468 | 2 | $1,301 \times 10^{-14}$ |
|-------------|---------|---|-------------------------|

|    | 0                    | 12                   |
|----|----------------------|----------------------|
| 12 | $4,1 \times 10^{-9}$ | -                    |
| 24 | $4,1 \times 10^{-9}$ | $4,1 \times 10^{-9}$ |

|          |         |   |                         |
|----------|---------|---|-------------------------|
| Alimento | 56,4684 | 2 | $5,471 \times 10^{-13}$ |
|----------|---------|---|-------------------------|

|     | 37,5                 | 150                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 150 | $1,4 \times 10^{-7}$ | -                    |
| 300 | $1,4 \times 10^{-7}$ | $9,1 \times 10^{-9}$ |

**R0**

|            | $\chi^2$ | df | p-value                 |
|------------|----------|----|-------------------------|
| Salinidade | 48,0098  | 2  | $3,757 \times 10^{-11}$ |

## Kruskal-Wallis

|     | 70                   | 110                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 110 | $7,9 \times 10^{-7}$ | -                    |
| 150 | $1,3 \times 10^{-7}$ | $1,9 \times 10^{-6}$ |

|             |         |   |                        |
|-------------|---------|---|------------------------|
| Temperatura | 32,1997 | 1 | $1,391 \times 10^{-8}$ |
|-------------|---------|---|------------------------|

|             |         |   |                         |
|-------------|---------|---|-------------------------|
| Fotoperíodo | 63,9489 | 2 | $1,299 \times 10^{-14}$ |
|-------------|---------|---|-------------------------|

|    | 0                    | 12                   |
|----|----------------------|----------------------|
| 12 | $4,0 \times 10^{-9}$ | -                    |
| 24 | $4,0 \times 10^{-9}$ | $4,0 \times 10^{-9}$ |

|          |         |   |                         |
|----------|---------|---|-------------------------|
| Alimento | 56,4782 | 2 | $5,444 \times 10^{-13}$ |
|----------|---------|---|-------------------------|

|     | 37,5                 | 150                  |
|-----|----------------------|----------------------|
| 150 | $1,4 \times 10^{-7}$ | -                    |
| 300 | $1,4 \times 10^{-7}$ | $9,1 \times 10^{-9}$ |