



**POLITÉCNICO  
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR  
DE TURISMO E  
TECNOLOGIA DO MAR

**Ciclo Reprodutivo da *Ascídia Styela plicata* em Cultivo de  
Mexilhão na Lagoa de Albufeira, Portugal**

**Priscila Vilela Borges**

2021

**Ciclo Reprodutivo da Ascídia *Styela plicata* em Cultivo de  
Mexilhão na Lagoa de Albufeira, Portugal**

**Priscila Vilela Borges**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Ana Margarida Violante  
Pombo e da Doutora Maria Ana Dionísio

## Agradecimentos

Às minhas filhas, Julia e Nina, por todo o amor e confiança em mim, por demonstrarem diariamente o valor de toda a minha dedicação.

Ao meu esposo Caetano pela dedicação à nossa família e ao amor que cultivamos, que torna possível olharmos juntos na mesma direção.

Aos meus colegas de mestrado pelo acolhimento que senti num país diferente do meu e em especial à Catarina Duarte pela amizade que tornou a caminhada muito mais suave durante o primeiro ano deste mestrado.

A todos os professores do ESTM-Politécnico de Leiria pela excelência no ensino e dedicação aos seus alunos.

À bolsista Andreia Raposo pelo seu profissionalismo e excelente treinamento nas técnicas de histologia empregadas neste trabalho.

Às minhas orientadoras Ana Pombo e Maria Ana Dionísio pela orientação, paciência e confiança depositadas em mim e para além disso, pela dedicação demonstrada pelas ciências.

À professora Susana Mendes pela contribuição para os tratamentos estatísticos realizados neste trabalho.

A todos os membros da equipa MARE-ProtecInvad pela coleta dos dados referentes à Lagoa de Albufeira em especial à professora Maria Ana Dionísio pela coleta, acondicionamento e medições dos animais e pelas fotos fornecidas.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a conclusão deste mestrado, obrigada!

## Resumo

A aquacultura de moluscos bivalves tem um importante papel na alimentação humana e a segurança alimentar está a ser afetada pela bioincrustação que, geralmente, é considerada uma ameaça séria para as atividades costeiras humanas. A *Styela plicata* é uma ascídia bioincrustante com potencial invasor, amplamente distribuída, que está associada a diversos danos causados nas atividades de aquacultura. Para fornecer informações sobre a biologia reprodutiva de *S. plicata* na Lagoa de Albufeira, a atividade reprodutiva desta espécie foi avaliada através da histologia gonadal e de um índice gonadossomático, no período de julho de 2019 a agosto de 2020, com o intuito de contribuir para o possível controlo das ascídias nas aquaculturas de *Mytilus edulis* presentes naquela localidade. Nenhum padrão sazonal claro foi observado, os gametas maduros estiveram presentes durante todo o ano. A desova pode ocorrer de forma contínua, embora mais acentuada no final do verão e início do outono. Um período reprodutivo prolongado pode conferir uma vantagem competitiva para *S. plicata*, o que garante a permanência nas áreas já introduzidas e oferece a oportunidade para a ampliação de sua área de ocorrência.

## Abstract

The shellfish aquaculture plays an important role in human nutrition and food security. The biofouling is considered a serious threat to the human coastal activities, and it has been one of the main problems for mussel culture. The invasive ascidian *Styela plicata* is a biofouling widely distributed which is associated with damages caused in aquaculture activities. To provide information about the reproductive biology of *S. plicata* in Lagoa de Albufeira, the reproductive activity of this species was evaluated through gonadal histology and a gonadosomatic index, from July 2019 to August 2020. This study aims to contribute to a possible control of the biofouling ascidians in the *Mytilus edulis* aquacultures in Lagoa de Albufeira. No clear seasonal pattern was observed, and mature gametes were present all year long. Spawning was potentially continuous, although it seemed more pronounced in late summer and early autumn. A prolonged reproductive period is likely to confer a competitive advantage. A prolonged reproductive period can confer a competitive advantage for *S. plicata*, which allows the species to remain in the inhabited areas and offers the opportunity to expand its area of occurrence.

## Índice Geral

1.	Introdução.....	1
1.1.	Aquacultura e a Segurança Alimentar .....	1
1.2.	O Cultivo de Moluscos Bivalves e os seus Desafios .....	2
1.3.	A Capacidade Adaptativa das Ascídias NIS .....	5
1.4.	Os Efeitos Nocivos das Ascídias na Aquacultura.....	7
1.5.	A Aquacultura em Portugal .....	8
1.6.	As Características da Aquacultura de Mexilhões .....	10
2.	<i>Styela plicata</i> .....	12
3.	Objetivo do Estudo .....	20
4.	Materiais e Métodos .....	21
4.1.	Caracterização da Área de Estudo .....	21
4.2.	Caracterização e Dados Biométricos dos Indivíduos Coletados .....	23
4.3.	Método Utilizado para as Análises Histológicas e Índice Gonadossomático..	24
4.4.	Método para a Análise de Dados .....	27
5.	Resultados.....	28
6.	Discussão .....	48
7.	Conclusão .....	55
8.	Referências Bibliográficas.....	56
9.	Anexos .....	67

## Índice de Figuras

Figura 1. Produção mundial da aquacultura de animais aquáticos e algas, em milhões de toneladas (peso fresco), entre os anos de 1990 a 2018. Fonte: FAO, 2020.....	2
Figura 2. Mexilhão azul <i>Mytilus edulis</i> aberto. Fonte: sciencephoto.com .....	3
Figura 3. <i>Styela plicata</i> . Fonte: iNaturalist.....	12
Figura 4. Mapa de distribuição da espécie <i>Styela plicata</i> . Fonte: aquamaps.org.....	13
Figura 5. Diagrama dos órgãos internos do género <i>Styela</i> , a apresentar: saco branquial, trato digestivo que consiste em esôfago, estômago e intestino; órgãos reprodutivos na parede corporal (de ambos os lados); e coração, em que, en, constitui o endóstilo (órgão encontrada em cordados invertebrados que auxilia a filtração; bf, dobras branquiais; dl, lâmina dorsal; rb, banda retrofaríngea; ht, coração; es, esôfago; st, estômago; in, intestino; ov, ovário; t, testículo. Fonte: seapeachbio.blogspot.com.....	14
Figura 6. Ovário do género <i>Styela</i> . AE, epitélio atrial; GE, epitélio germinativo; OT, tubo ovariano. Modificado de Tucker (1942).....	15
Figura 7. Desenho esquemático ilustrando o processo de vitelogenese da espécie <i>Styela plicata</i> . Modificado de Saad (2008). .....	16
Figura 8. Microscopia eletrónica de varrimento do ovo de <i>Styela plicata</i> . Pode-se observar as grandes células foliculares de aproximadamente 18 µm de altura. Fonte: Villa & Patricolo (2010). .....	17
Figura 9. Larva em forma de girino de uma ascídia. Modificado de Caicci <i>et al.</i> , 2010. ....	17
Figura 10. Crescimento de <i>Styela plicata</i> . Uma geração de verão (junho a agosto) e de inverno (novembro a abril). Comprimento médio do corpo ± desvio padrão é dado para cada medição, plotado em escala semi-logarítmica. Fonte: Yamaguchi (1975). .....	18
Figura 11. Ciclo reprodutivo de ascídia. Fonte: gbri.org.au (modificado).....	19
Figura 12. Mapa da Área da Lagoa de Albufeira. (A) Localização da Lagoa de Albufeira (38°30'42.44"N 9°10'23.66"W) (* em vermelho). (B) Localização da área amostral (* em vermelho). Fonte: Google Earth 2020 (modificado). .....	21
Figura 13. Jangada em que foi realizada a coleta. As cordas dispostas verticalmente com os mexilhões cultivados. Foto: Maria Ana Dionísio. ....	22
Figura 14. Corda de cultivo de mexilhões. As setas indicam os espécimes de <i>Styela plicata</i> aderidos às conchas dos mexilhões. Foto: Maria Ana Dionísio. ....	23
Figura 15. Espécime de <i>Styela plicata</i> dissecada para a exposição das gónadas (GN)..	25
Figura 16. Agregado de <i>Styela plicata</i> e outros epibiontes em substrato de cultivos de mexilhões na Lagoa de Albufeira. Janeiro de 2020.....	28
Figura 17. Comprimento médio (mm) ± desvio padrão de <i>Styela plicata</i> no período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa da Albufeira. As letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,001). .....	29
Figura 18. Peso médio (g) ± desvio padrão de <i>Styela plicata</i> no período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa da Albufeira. As letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,001). .....	30

Figura 19. Indivíduo dissecado de <i>Styela plicata</i> , após remoção parcial do saco branquial. GN, gónadas; SB, saco branquial; IN, intestino; ES, estômago. Indivíduo coletado em julho de 2019. ....	31
Figura 20. Histologia gonadal de <i>Styela plicata</i> a mostrar as gónadas femininas e masculinas presentes no mesmo indivíduo. Oo: oócitos; FM: folículos masculinos. Indivíduo coletado em março de 2020. ....	32
Figura 21. Oócito de <i>Styela plicata</i> em estágio I - pré-vitelogénese. Oócito de 39,28 µm de diâmetro. O citoplasma homogénio e fortemente basofílico. Núcleo e nucléolo. Indivíduo coletado em agosto de 2019. ....	33
Figura 22. Oócito de <i>Styela plicata</i> em Estádio II - vitelogénese. Oócito medindo 132,40 µm de diâmetro. Indivíduo coletado em agosto de 2019. ....	34
Figura 23. Oócito de <i>Styela plicata</i> em Estádio III. Oócito de 177,511µm de diâmetro. Presença das células testes e duas camadas de células foliculares, uma interna e outra externa. Indivíduo coletado em agosto de 2019. ....	35
Figura 24. Índice gonadosomático médio de <i>Styela plicata</i> e a temperatura da água para o período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa de Albufeira, Portugal. n=15, exceto para: julho 2019, n=13; setembro 2019, n=13; fevereiro 2020, n=13; abril 2020, n=13; maio, n=13; junho 2020, n=14. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (p<0,001) no GI. As temperaturas dos meses de abril e maio de 2020 não puderam ser aferidas por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemia do SARS-CoV-2. ....	36
Figura 25. Diâmetro médio e desvio padrão dos oócitos de <i>Styela plicata</i> e a temperatura da água para o período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa de Albufeira, Portugal. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (p>0,001) no tamanho médio dos oócitos. As temperaturas dos meses de abril e maio de 2020 não puderam ser aferidas por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemias do SARS-CoV-2. ....	38
Figura 26. Diâmetro médio dos oócitos de <i>Styela plicata</i> e a salinidade da água para o período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa de Albufeira, Portugal. A salinidade para os meses de abril e maio de 2020 não puderam ser aferidas por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemias do SARS-CoV-2. ....	39
Figura 27. Frequência de cada estágio de desenvolvimento dos oócitos de <i>Styela plicata</i> . Estádio I (pré-vitelogénese – oócitos entre 0-50 µm de diâmetro; Estádio II (vitelogénese) – oócitos entre 50-150 µm de diâmetro; Estádio III (maturo) – oócitos maiores que 150 µm. ....	40
Figura 28. Folículo masculino de <i>Styela plicata</i> em estágio de desenvolvimento imaturo (Estádio I) preenchido por espermatogónias. Indivíduo coletado em Agosto de 2019. .	41
Figura 29. Folículos masculinos de <i>Styela plicata</i> em Estádio II (maturo). PE: epitélio germinal; Etz: espermatozoides maduros no lúmen. Indivíduo coletado em agosto de 2019. ....	42
Figura 30. Folículos masculinos de <i>Styela plicata</i> após a desova mostrando o espaço vazio do lúmen após a libertação dos espermatozóides. L: lúmen. Indivíduo coletado em setembro de 2019. ....	43
Figura 31. Folículo masculino maturo de <i>Styela plicata</i> . Etz: espermatozoides; Etg: espermatogónias. Indivíduo coletado em agosto de 2020. ....	44



Figura 32. Frequência de cada estágio de desenvolvimento dos folículos masculinos de <i>Styela plicata</i> . Estádio I (imaturo); Estádio II (maturo) e Estádio III (desovado).....	45
Figura 33. Indivíduo de <i>Styela plicata</i> medindo 27,97 mm de comprimento a apresentar oócitos em estágio I (pré-vitelogénese) e estágio II (vitelogénese).....	46
Figura 34. Estádio de desenvolvimento dos oócitos em indivíduos de <i>Styela plicata</i> que apresentaram comprimento menor que 40 mm. Total de 104 indivíduos menores que 40 mm, destes, 92 indivíduos possuíam gónadas masculinas e femininas desenvolvidas (1 indivíduo apresentou oócitos em estágio de previtelogénese e 91 indivíduos apresentaram oócitos em estágio de vitelogénese). .....	47

## Índice da Tabela

Tabela 1. Principais produtores globais em aquacultura de animais aquáticos, produção em peso fresco por mil toneladas e de bivalves na produção total de animais aquáticos pela aquacultura. Fonte: FAO, 2020.....	3
---	---

## **1. Introdução**

### **1.1. Aquacultura e a Segurança Alimentar**

Um importante fator global de preocupação é a garantia de alimentos para a crescente população humana, especialmente as fontes de proteínas. Enquanto caminhamos para um mundo habitado por 10 bilhões de pessoas, desde 2015 o número de pessoas desnutridas tem aumentado (FAO, 2020). O aumento populacional tem gerado forte pressão sob os recursos naturais levando à depleção dos stocks biológicos marinhos a uma taxa superior à capacidade de recuperação do sistema (Bailey, 2016; Perissi *et al.*, 2017). Diante este quadro, é fundamental que sejam criadas soluções inovadoras para aumentar a produção e ampliar o acesso aos alimentos, melhorando assim, a nutrição da população. A aquacultura já demonstrou o seu papel crucial na segurança alimentar e para além disso, a aquacultura tem uma importante relevância na sustentabilidade dos recursos marinhos (Alleway *et al.*, 2019; FAO, 2020).

A aquacultura é o cultivo organizado de organismos aquáticos, envolvendo intervenções no processo de produção para otimizar a produtividade em áreas costeiras, interiores e offshore, para fins comerciais, recreativos ou públicos. De acordo com as últimas estatísticas mundiais, compiladas pela FAO, a produção mundial da aquacultura atingiu um recorde histórico de 114,5 milhões de toneladas em peso vivo em 2018 (Figura 1), com valor de venda total estimado em 216,45 bilhões de euros (FAO, 2020). A aquacultura é provavelmente o setor de produção de alimentos que apresenta o maior crescimento em termos globais: 5,3% ao ano em média no período de 2001-2018 (Alleway *et al.*, 2019; FAO, 2020).

Em 2018, os principais setores de produção da aquacultura foram: os peixes, com 54,3 milhões de toneladas produzidas (47 milhões de toneladas provenientes da aquacultura de águas interiores e 7,3 milhões de toneladas da aquacultura marinha e costeira); os moluscos, principalmente bivalves (17,7 milhões de toneladas) e os crustáceos (9,4 milhões de toneladas) (FAO, 2020).

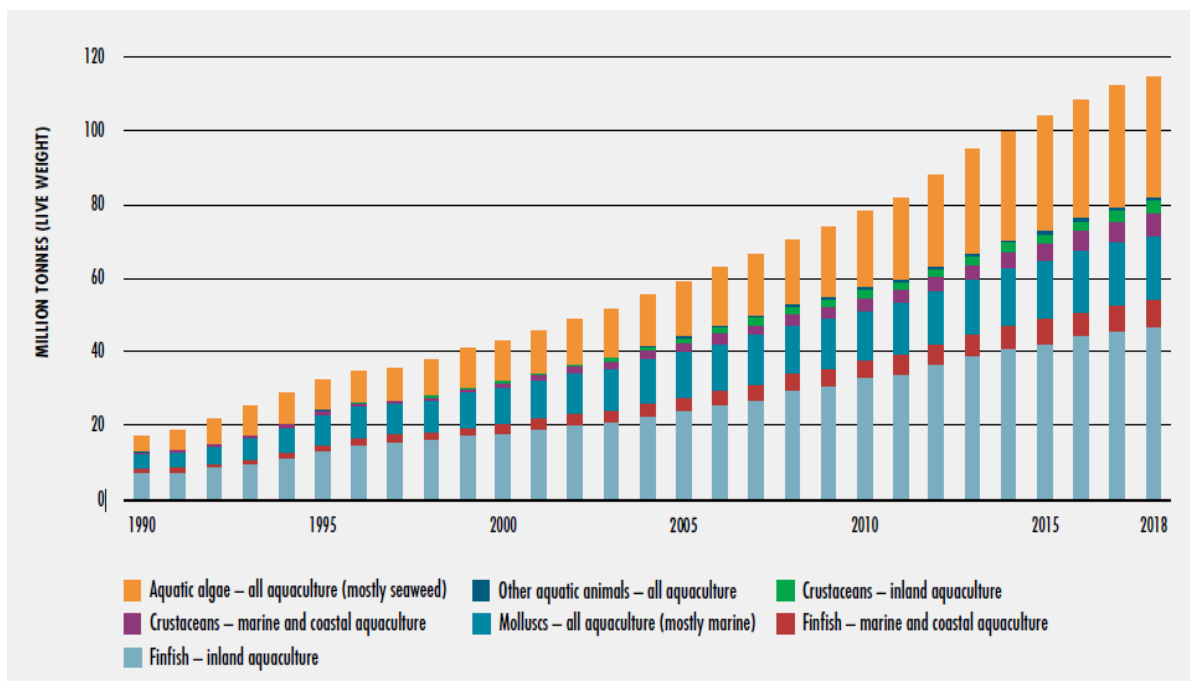


Figura 1. Produção mundial da aquacultura de animais aquáticos e algas, em milhões de toneladas (peso fresco), entre os anos de 1990 a 2018. Fonte: FAO, 2020.

A aquacultura marinha é um ramo de atividade da aquacultura praticado em água salgada e, em 2018, representou cerca de 42,5% da aquacultura global. Seus principais produtos são: as plantas aquáticas; os moluscos; os peixes marinhos, principalmente salmonídeos; e os camarões. Os moluscos representam 42,7% do total da aquacultura global, constituindo os bivalves a maior parte dos moluscos cultivados, tais como as ostras, as ameijoas, os mexilhões e as vieiras (FAO, 2020).

## 1.2. O Cultivo de Moluscos Bivalves e os seus Desafios

O cultivo de moluscos bivalves contribui significativamente para o crescimento sustentável do abastecimento global de alimentos aquáticos e está bem desenvolvido em diversos países do mundo (Tabela 1). Este cultivo apresenta uma importante relevância na economia mundial e foi avaliado em 28,41 bilhões de euros, em 2018 (Smaal *et al.*, 2018; FAO, 2020).

Tabela 1. Principais produtores globais em aquacultura de animais aquáticos, produção em peso fresco por mil toneladas e de bivalves na produção total de animais aquáticos pela aquacultura. Fonte: FAO, 2020.

	Total production	Bivalves production	Share of bivalves
	(thousand tonnes, live weight)		(percentage)
China	47 559.1	13 358.3	28.1
Chile	1 266.1	376.9	29.8
Japan	642.9	350.4	54.5
Republic of Korea	568.4	391.1	68.8
United States of America	468.2	181.1	38.7
Spain	347.8	287.0	82.5
Taiwan Province of China	283.2	75.8	26.8
Canada	191.3	43.2	22.6
France	185.2	144.8	78.2
Italy	143.3	93.2	65.0
New Zealand	104.5	88.2	84.3

A miticultura é o cultivo de mexilhões, principalmente espécies do género *Mytilus* (Figura 2) (Paleo, 2017). Na Europa, os mexilhões (*Mytilus* spp., incluindo *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*) são as espécies de bivalves mais produzidas (Paleo, 2017; FAO, 2020).



Figura 2. Mexilhão azul *Mytilus edulis* aberto. Fonte: sciencephoto.com

A miticultura e o cultivo de bivalves em específico têm enfrentado desafios, tais como: a degradação dos ambientes costeiros (Carranza *et al.*, 2020); a intrusão de doenças nas culturas (Renault, 1996; Balseiro *et al.*, 2007) e o aparecimento e estabelecimento de espécies não indígenas (NIS) no ambiente de cultivo (Fitridge *et al.*, 2012; Bannister *et al.*, 2019).

As NIS têm a capacidade de se adaptar ao novo ambiente, reproduzir e aumentar significativamente a sua área de distribuição podendo se tornar invasoras (McNeely, 2001). Existem registos de que estas introduções estão a ocorrer a um ritmo acelerado, devido à globalização económica das últimas décadas (Neves *et al.*, 2019). No sistema marinho, existem vários vetores que podem transportar as NIS da sua área de distribuição nativa para outros locais, sendo o transporte marinho identificado como o principal vetor de introdução, através da água de lastro e incrustações dos cascos dos navios (Chainho *et al.*, 2015; Minton *et al.*, 2015). Outros vetores de introdução associados com as atividades humanas são, a aquacultura, o comércio de isco vivo e a aquariofilia (Carlton *et al.*, 2015). Mais recentemente, a navegação recreativa foi também identificada como outro importante vetor das NIS (Ferrario *et al.*, 2017).

A proliferação e a dispersão das NIS aquáticas são uma preocupação crescente para a atividade económica e para a conservação da biodiversidade aquática, com impactos relevantes nos custos associados às atividades económicas, sejam eles diretos ou indiretos, exigindo políticas e estratégias de manejo eficazes (Fitridge *et al.*, 2012; Bannister *et al.*, 2019). Na aquacultura, as NIS aquáticas incrustantes, aquelas que vivem associadas a um substrato, constituem uma das principais barreiras para uma produção eficiente e sustentável (Callier *et al.*, 2018).

A infraestrutura de produção aquícola consiste numa complexa variedade de componentes submersos, tais como jaulas, redes, flutuadores e cordas que podem servir como substrato para o estabelecimento de uma ampla diversidade de organismos incrustantes, o que pode gerar severos problemas para as operações da cultura, provocando impactos económicos negativos significativos no setor (Fitridge *et al.*, 2012; Bannister *et al.*, 2019). Os custos globais diretos do controlo de invasões são substanciais, com estimativas conservadoras entre 5% a 10% dos custos de produção atribuídos somente à bioincrustação (Lane & Willemsen, 2004). Na miticultura, as NIS incrustantes podem ter um impacto relevante, por alterarem diversas variáveis relacionadas com o bem estar dos animais cultivados como, por exemplo, a interferência mecânica na função da concha e a competição por alimento e espaço (Fitridge *et al.*, 2012).

Algumas NIS representam um impacto especialmente significativo para a aquacultura, entre os quais os representantes do Subfilo Tunicata, dentro do qual, a Classe Ascidiacea é a maior representante em número de espécies (Lambert, 2005).

As ascídias exercem grande influência na dinâmica de cultivos de aquacultura, pois podem incrustar-se numa gama muito variada de substratos sólidos. Além de usar a

infraestrutura de produção aquícola como substrato, utilizam os próprios organismos cultivados para se fixarem (Yamaguchi, 1975; Lambert, 2005) tornando-se fortes concorrentes espaciais das culturas aquícolas, capazes de alcançar uma densidade ou biomassa muito alta num curto período de tempo (Minchin & Duggan, 1988; Minchin & Duggan, 1988; Fletcher *et al.*, 2013).

Por exemplo, a ascídia *Styela plicata* (Lesueur, 1823) é capaz de se estabelecer numa gama muito variada de substratos, invadindo o habitat de sésseis nativos excluindo-os dos substratos (Barros *et al.*, 2009). A ascída *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767) é considerado um dos organismos incrustantes mais preocupantes e problemáticos para o cultivo de mexilhões em termos globais, tendo generalizado a sua presença em cultivos nas regiões temperadas e tropicais, afetando negativamente a produtividade das culturas (Fitridge *et al.*, 2012; Bannister *et al.*, 2019). A mesma situação ocorre com a ascídia *Styela clava* (Herdman, 1881), capaz de incrustar substratos naturais e artificiais e atingir densidades de 500-1000 indivíduos/m<sup>2</sup> (Holmes, 1969; Minchin & Duggan, 1988), causando danos ambientais e impactos económicos sobre a biodiversidade e a aquacultura (Osman *et al.*, 1989; Lutzen 1999).

O conhecimento das características biológicas e, especialmente, do ciclo reprodutivo de uma NIS é crucial para avaliar o seu potencial invasor e desenvolver ferramentas eficazes de gestão, como a erradicação, a contenção e a prevenção através dos programas preventivos das NIS (Ordóñez *et al.*, 2015; Pineda *et al.*, 2013), visando a proteção dos ecossistemas naturais e/ou das aquaculturas afetadas.

### **1.3. A Capacidade Adaptativa das Ascídias NIS**

As ascídias (Filo Chordata) compreendem aproximadamente 3 000 espécies encontradas em todos os habitats marinhos, desde as costas rochosas a fundos lamacentos de planícies abissais. São organismos sésseis filtradores, que exibem crescimento solitário ou colonial e são membros de muitas comunidades bentónicas (Lambert, 2005).

Em condições naturais, a dispersão das ascídias no meio marinho não excede poucos metros de distância do seu local de eclosão (Lambert, 2005). Embora algumas espécies apresentem estádios larvares com duração longa (*e.g.* 1-5 dias para *C. intestinalis*), o que pode favorecer a dispersão com as correntes marinhas, é mais provável que a dispersão natural influencie apenas a propagação local (Zhan *et al.*, 2015). No entanto, o tráfego oceânico e marítimo tem facilitado a dispersão de diversas espécies,

incluindo algumas espécies de ascídias como, por exemplo, os organismos transportados pela água de lastro dos navios ou através de incrustações nos cascos de embarcações (Yamaguchi, 1975; Lambert, 2001; Lambert, 2005; Pineda *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2019).

As ascídias são tolerantes a ambientes alterados e/ou poluídos e também a amplas flutuações ambientais da temperatura e da salinidade (Sims, 1984; Naranjo *et al.*, 1996; Thiagarajan & Qian, 2003; Lambert, 2005; Pineda *et al.*, 2012), conferindo às mesmas sucesso na colonização de ambientes, como portos e áreas industriais, onde o excesso de matéria orgânica em suspensão e a proliferação de bactérias são fontes alimentares (Naranjo *et al.*, 1996); e onde a temperatura e a salinidade podem variar consideravelmente ao longo do tempo (Lambert, 2005; Pineda *et al.*, 2012). Por exemplo, *S. plicata* pode ser considerada uma espécie indicadora de áreas que estiveram sujeitas a intenso stress, durante longos períodos de tempo (Naranjo *et al.*, 1996). Em estudos realizados no sul da Espanha, por Naranjo *et al.* (1996), essa espécie foi encontrada em altas densidades em zonas com substratos altamente transformados, água estagnada e excesso de sedimentação e de matéria em suspensão. Em estudos efectuados nos Países Baixos, os exemplares de *S. clava* foram capazes de sobreviver à temperatura da água de 2°C (Lambert & Lambert, 2003). A *C. intestinalis*, uma espécie com alto potencial invasor (Zhan *et al.*, 2015), pode sobreviver às variações na temperatura da água entre os 35°C (Dybern, 1965) e -1°C (Carver *et al.*, 2003; Therriault & Herborg, 2008) e as espécies do género *Didemnum* podem tolerar temperaturas da água que variam de < 1 a > 24°C, com mudanças diárias de até 11°C, como mostraram os estudos realizados por Valentine *et al.* (2007), em zonas entre marés na Inglaterra.

No que diz respeito à salinidade, a maioria das espécies de ascídias sobrevivem a salinidades entre 25 e 40, enquanto algumas espécies sobrevivem abaixo de 25 ou acima 44 (Lambert, 2005). A *C. intestinalis* pode sobreviver a salinidades que variam de 12 a 40 e chega a suportar exposição de curto prazo à salinidade < 11 (Therriault & Herborg, 2008), assim como, adultos de *S. clava* podem resistir temporariamente a salinidade de 8 (Lutzen, 1999), embora estejam ausentes em áreas onde a salinidade era consistentemente inferior a 20 (Davis & Davis; 2004).

Outras importantes características presentes em algumas espécies de ascídias que explicam o seu sucesso como espécies NIS são o seu início precoce de reprodução, a alta fecundidade e o crescimento rápido (Yamaguchi, 1975). Por exemplo, na Estação Biológica Marinha de Misaki, na baía de Tóquio, Japão, a *C. intestinalis* atingiu a



maturidade sexual em cerca de um mês no verão e dois meses no inverno, enquanto a *S. plicata* demorou cerca de dois meses no verão para atingir o tamanho reprodutivo (Yamaguchi, 1975). Em temperaturas adequadas, a *C. intestinalis* e a *S. plicata* podem produzir gâmetas continuamente (Carver *et al.*, 2003; Pineda *et al.* 2013): cada indivíduo maturo de *C. intestinalis* pode gerar e libertar aproximadamente 500 ovos por dia, durante o período de desova (Carver *et al.*, 2003).

Outra característica importante para o estabelecimento num novo ambiente é a rápida colonização, por exemplo, em estudos realizados por Pineda *et al.* (2012), em Espanha, mesmo quando mudanças severas de temperatura ou de salinidade eliminaram *S. plicata*, esta foi capaz de voltar a colonizar completamente as estruturas estudadas no período de um mês.

As espessas túnicas presentes em algumas espécies de ascídias também podem favorecer o sucesso como NIS, pois às conferem resistência à dessecação (Lambert, 2005; Lutzen & Sorensen, 1993). Exemplares da ascídia *S. clava*, de diversos tamanhos, sobreviveram até três dias fora da água a uma temperatura de 10°C em ensaios realizados por Lutzen & Sorensen (1993). A túnica também confere proteção contra predadores, não havendo relatos de predação para a espécie *S. clava* na Europa (Lutzen, 1999).

#### **1.4. Os Efeitos Nocivos das Ascídias na Aquicultura**

O estabelecimento de comunidades de ascídias invasoras na aquicultura de mexilhões tem gerado problemas para os aquacultores (Adams, *et al.*, 2011; Fitridge *et al.*, 2012). A infraestrutura de produção de mexilhões em jangadas, por exemplo, utiliza componentes submersos, como flutuadores e cordas, que servem de substrato para as ascídias (Fitridge *et al.*, 2012). As ascídias incrustantes de culturas de mexilhões competem por recursos alimentares, por oxigênio e aumentam a suscetibilidade a predadores, diminuindo a taxa de crescimento e o valor comercial dos mexilhões (Adams, *et al.*, 2011; Fitridge *et al.*, 2012).

As ascídias incrustantes de culturas de mexilhões causam danos relacionados, principalmente com: (1) interferência mecânica da função da concha devido à colonização das conchas, particularmente ao redor do lábio, afetando a capacidade de alimentação e aumentando a suscetibilidade a predadores; (2) competição biológica por recursos como alimentos e espaço, afetando o crescimento e a saúde dos animais; (3) modificação ambiental devida à colonização da infraestrutura da cultura, levando à

redução do fluxo de água, acumulação de resíduos, diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido e redução da disponibilidade de alimento; (4) aumento do peso da biomassa sobre os equipamentos de cultivo (por exemplo, cordas e flutuadores), resultando em maiores custos de produção associados a demandas extras de manutenção, além do risco de perda de stock e de equipamento (Adams, *et al.*, 2011; Fitridge *et al.*, 2012).

Os mexilhões e as ascídias têm potencial para uma concorrência substancial por recursos alimentares, pois são ambas espécies filtradoras. Os tunicados têm, claramente, um efeito negativo na produtividade do mexilhão (Daigle & Herbinger, 2009). Por exemplo, em cultivos do mexilhão *Perna perna* colonizados por incrustantes, os indivíduos demoraram mais tempo para atingir o tamanho comercial em relação ao grupo de controlo (Marques *et al.*, 1998; Sá *et al.*, 2007). Em aquaculturas do mexilhão *M. edulis*, no Canadá, o aumento da densidade da espécie de ascídia *C. intestinalis* provocou diminuição do tamanho do mexilhão e foi registado que cerca de 50% da mortalidade de mexilhões estava relacionada a incrustações intensas ( $\sim 2\text{kg/m}^2$ ) (Daigle & Herbinger, 2009).

Os efeitos das ascídias em cultivos de mexilhões são conhecidos há mais de três décadas (Perera *et al.*, 1990). Um estudo realizado ao longo de 10 anos em cultivos de mexilhões e ostras no sul do Brasil identificou 17 espécies de tunicados associados às culturas, sendo somente uma delas nativa. Entre os tunicados identificados, *S. plicata* e *Didemnum perlucidum* foram os mais abundantes, estando presentes nos cultivos de ostras e de mexilhões. O estudo alerta para a diversidade de espécies NIS introduzidas, e propõe uma monitorização rigorosa das populações em rápida expansão, evitando assim o aparecimento de novas espécies invasoras, tanto nas culturas como no ambiente natural (Rocha *et al.*, 2009).

### **1.5. A Aquacultura em Portugal**

Portugal está localizado na parte mais ocidental da Europa, na costa oeste, ao longo das três principais regiões biogeográficas do Oceano Atlântico, incluindo os arquipélagos dos Açores e da Madeira. Portugal tem uma costa de 1 214 km (representando 1,8% dos 66.000 km de costa da UE) (FAO, 2017). A localização geográfica da costa continental portuguesa, inserida na transição de duas importantes subprovíncias oceanográficas do Norte Atlântico - a subtropical e a subtropical/subpolar - promove a existência de uma grande diversidade de habitats, sendo por isso considerada uma zona rica em termos

biológicos. Além disso, a zona costeira tem uma grande variedade geomorfológica e diversos estuários e rias, com características favoráveis à prática da aquacultura (DGRM, 2019).

A produção da aquacultura em Portugal no ano de 2018 foi de 13 992 toneladas, traduzindo-se num aumento de 11,5% face a 2017. As vendas geraram uma receita de 96,8 milhões de euros, superior em 18,5% relativamente a 2017 (INE, 2019). Enquanto houve um decréscimo de 18% na produção de peixes em águas de transição e marinhas entre 2017 e 2018, observou-se um aumento em 32,1% na produção de moluscos, que representou 67,2% da produção aquícola total. As amêijoas permaneceram como a espécie mais relevante (3 970 toneladas) tendo aumentado 2,1%, seguidas das ostras, cujo volume quase triplicou (+191,2%), atingindo as 3 451 toneladas e dos mexilhões que, com uma produção de 1 746 toneladas, tiveram um incremento de 1,4% (INE, 2019).

No final de 2018 existiam 1 515 estabelecimentos licenciados em aquacultura, com cerca de 88% das unidades correspondendo a viveiros para produção de moluscos bivalves, 9,3% correspondendo a tanques para a produção de peixes e 2,0% correspondendo a estruturas flutuantes (maioritariamente destinadas à produção de moluscos bivalves) (INE, 2019). A produção da aquacultura de Portugal prioriza o regime de exploração extensivo, registando 70,1% do total da produção aquícola em 2018 (INE, 2019).

Embora Portugal apresente abundância de recursos hídricos, as taxas de crescimento do sector da aquacultura estão limitadas pelas condições técnicas e/ou naturais de utilização dos recursos existentes, pelos fortes ventos e correntes oceânicas que atingem a costa e também por fatores financeiros (REA, 2019). O Plano Estratégico para a Aquacultura Portuguesa (2014-2020) prevê um conjunto de metas que inclui um aumento da capacidade produtiva nacional de 25 000 toneladas até 2023, com apoio do Fundo Europeu dos Assuntos Marítimos e das Pescas (FEAMP) (REA, 2019).

Poucos trabalhos sobre as espécies NIS na costa portuguesa estão publicados, o que torna muito mais difícil compreender os processos biológicos e ecológicos específicos destes organismos a fim de realizar uma boa gestão da sua presença nas empresas de aquacultura (Chainho *et al.*, 2015). O presente trabalho pretende contribuir para reduzir esta lacuna.

## 1.6. As Características da Aquacultura de Mexilhões

Os bivalves marinhos como as ostras, as amêijoas e os mexilhões são cultivados há milhares de anos (Smaal *et al.*, 2018). Em Portugal, a exploração de bivalves é uma atividade milenar, com importância social, económica e cultural (Oliveira *et al.*, 2013).

O cultivo de mexilhões (miticultura) é uma prática considerada sustentável (Duarte *et al.*, 2009), pois em ambientes propícios, como os existentes na aquacultura extensiva, não há a necessidade do fornecimento de alimentos, que é abundante no meio natural, além disso, não há a necessidade do uso de medicamentos, tais como antibióticos ou vacinas, reduzindo os custos associados, assim como os impactos ambientais gerados (Duarte *et al.*, 2009; Smaal *et al.*, 2018).

A miticultura corresponde a aproximadamente 9% da produção global de moluscos (FAO, 2020). Em Portugal, as capturas ainda representam o maior rendimento no setor (Oliveira *et al.*, 2013; Avdelas *et al.*, 2020). Os mexilhões capturados e cultivados destinam-se ao mercado nacional e também à exportação (Oliveira *et al.*, 2013). A produção oscilou entre 2008 e 2016, mas tendeu a aumentar, chegando a um máximo de quase 1 000 toneladas em 2016, o valor das vendas seguiu o padrão, atingindo 1,75 milhão de euros em 2016, sendo de produção de mexilhão proveniente de 17 unidades operativas (Avdelas *et al.*, 2020).

As técnicas de cultivo de mexilhão mais usadas na União Europeia são: a cultura de jangada e a cultura em *Longline*, que são culturas suspensas; e a cultura de fundo e a cultura de *Bouchot*, que são culturas associadas ao substrato (Paleo, 2017; Avdelas *et al.*, 2020).

Para a comercialização de mexilhões frescos, ou de outros bivalves destinados ao consumo humano, a realização do processo de depuração é uma exigência legal (Martinez-Albores *et al.*, 2020). Em Portugal, as zonas de produção de moluscos bivalves frescos são classificadas em três categorias diferentes em função do nível de contaminação fecal do local. A autoridade competente pode classificar como pertencendo à classe A, as zonas onde os moluscos bivalves vivos podem ser colhidos para consumo humano directo. Zonas pertencentes à classe B, os bivalves podem ser colocados no mercado para consumo humano, unicamente após tratamento num centro de depuração e zonas da classe C, os animais devem ser transpostos a outra zona, por um período prolongado de tempo (não inferior a 2 meses), antes de serem destinados ao consumo humano (DGAV, 2021).

A exploração de mexilhões tem um potencial considerável de expansão em Portugal, especialmente se forem melhoradas a comunicação entre as partes interessadas, produtores e comerciantes; a organização do setor e a agregação de valor ao produto, criando novas oportunidades de mercado (Oliveira *et al.*, 2013).

## 2. *Styela plicata*

*Styela plicata* (Lesueur, 1823) é uma espécie de ascídia solitária de corpo ovoide, sem pedúnculo e envolto numa túnica opaca, resistente e coriácea. Possui duas aberturas, os sífões orais e atriais, posicionados anteriormente; as pontas dos sífões são circundadas em listas claras e escuras, alternadas (Howey, 1998) (Figura 3).



Figura 3. *Styela plicata*. Fonte: iNaturalist

A *S. plicata* é uma espécie cosmopolita presente em todo o globo, pode ser encontrada em habitats marinhos pouco profundos caracterizados por águas tropicais e temperadas (Figura 4). Estudos efetuados por Barros *et al.* (2009) analisaram geneticamente sete populações de *S. plicata*, em quatro regiões geograficamente distintas (duas populações no Oceano Pacífico e as restantes nos Oceanos Atlântico Norte e Atlântico Sul) e sugerem que a *S. plicata* seja nativa da região noroeste do Pacífico.

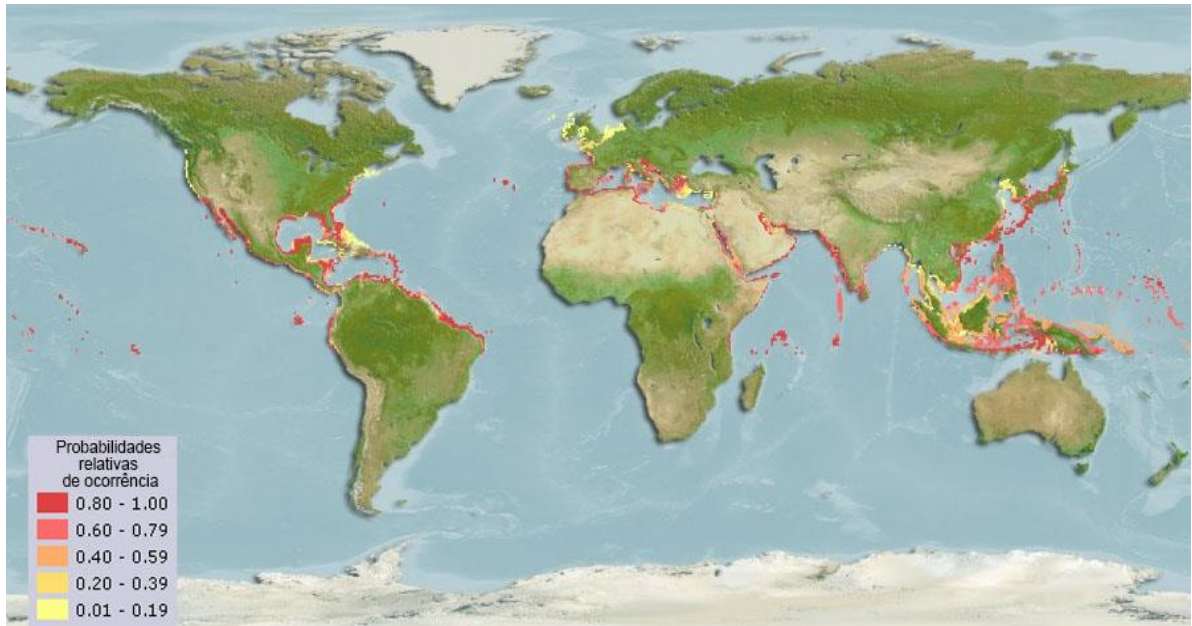


Figura 4. Mapa de distribuição da espécie *Styela plicata*. Fonte: aquamaps.org

A *S. plicata* é uma espécie abundante em marinas e portos e está também registada a sua presença em cultivos de moluscos bivalves (Pineda *et al.*, 2012). Uma série de características permitiu a *S. plicata* prosperar nesses ambientes e competir com outros invertebrados bentónicos (Pineda *et al.*, 2011), por exemplo, pode se adaptar fisiologicamente a ambientes amplamente flutuantes, particularmente a mudanças da temperatura e da salinidade (Yamaguchi, 1975; Thiyagarajan & Qian, 2003); pode tolerar águas altamente poluídas (Naranjo *et al.*, 1996) e cresce rapidamente até atingir a maturidade sexual (Sabbadin, A., 1957; Yamaguchi, 1975; Sciscioli *et al.*, 1978).

A anatomia geral de uma espécie do género *Styela* pode ser observada na Figura 5.

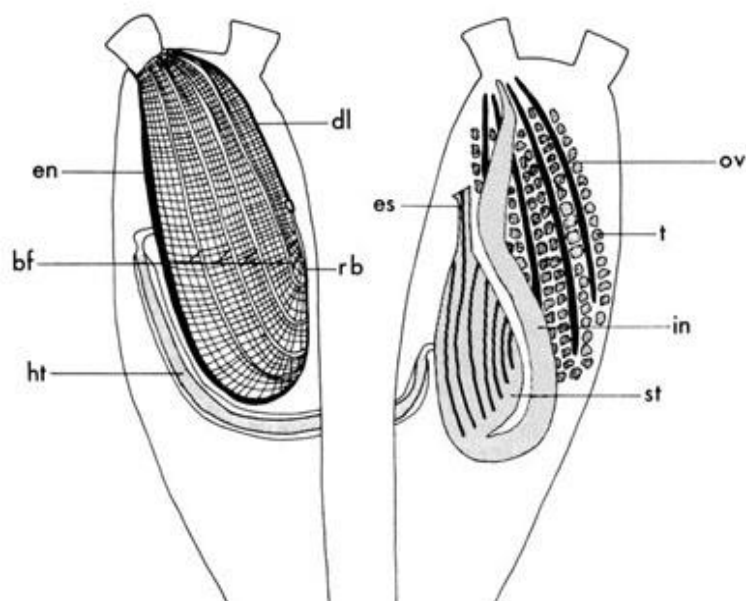


Figura 5. Diagrama dos órgãos internos do gênero *Styela*, a apresentar: saco branquial, trato digestivo que consiste em esôfago, estômago e intestino; órgãos reprodutivos na parede corporal (de ambos os lados); e coração, em que, en, constitui o endóstilo (órgão encontrada em cordados invertebrados que auxilia a filtração; bf, dobras branquiais; dl, lâmina dorsal; rb, banda retrofaríngea; ht, coração; es, esôfago; st, estômago; in, intestino; ov, ovário; t, testículo. Fonte: seapeachbio.blogspot.com

A *S. plicata* alimenta-se por filtração, na qual o sifão oral leva água para a cesta faríngea, onde as partículas de alimentos (fitoplâncton, zooplâncton e materiais orgânicos) são filtradas; os resíduos são excretados pelo sifão atrial (Lambert, 2005).

É uma espécie hermafrodita protândrica e autoestéril, de reprodução sexuada (Villa & Patricolo, 2000; Lambert, 2005). É pertencente à ordem Pleurogona (subordem, Stolidobranchiata) em que as gónadas estão localizadas entre o manto e o saco branquial, de ambos os lados do corpo, especialmente do lado direito. As gónadas femininas e masculinas estão presentes como várias unidades alongadas de tamanho considerável, cada uma com seus próprios dutos (Tucker, 1942), não havendo diferenciação física visível macroscopicamente das gónadas femininas e masculinas, pois estão agrupadas na mesma estrutura (Kawamura *et al.*, 2011).

O ovário é constituído por tubos ovarianos ramificados e espessados, formando o epitélio germinativo que dará origem às células germinativas femininas, os oócitos imaturos, que ao longo do tempo irão desenvolver-se. No género *Styela*, o tubo ovariano assume a forma de T-invertida (Tucker, 1942; Kawamura *et al.*, 2011) (Figura 6).



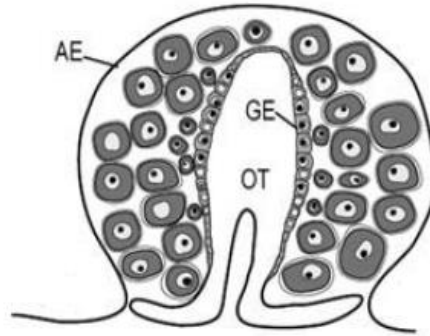


Figura 6. Ovário do género *Styela*. AE, epitélio atrial; GE, epitélio germinativo; OT, tubo ovariano. Modificado de Tucker (1942).

Em todas as espécies de ascídias, o testículo ramifica-se em vários lobos, os folículos testiculares. Cada folículo testicular estende-se em túbulos eferentes estreitos que se unem para formar a abertura do espermiducto na cavidade atrial (Kawamura *et al.*, 2011).

A reprodução da *S. plicata* é um processo que envolve uma série de mudanças nas células somáticas e germinativas que se manifestam pelo desenvolvimento das gónadas. A maturação do ovário é submetida a ciclos alternados com as estações do ano; as fases terminais da maturação ovariana terminam com desova e fecundação (Ibrahim, 2018). Em cada ciclo, os ovários produzem oócitos que sofrem um processo essencial vital denominado vitelogénese, a fim de que esses oócitos se transformem em óvulos maduros (Saad, 2008).

A vitelogénese, ou seja, o processo de evolução das células sexuais, compreende duas fases: a pré-vitelogénese e a vitelogénese em si (Ibrahim, 2018). A vitelogénese é dependente do epitélio germinativo e envolve uma variedade de fatores físicos e bioquímicos complexos, com um aumento considerável no material vitelogénico e desenvolvimento dos envelopes foliculares (Sciscioli *et al.*, 1978; Saad, 2008). A origem dos três envelopes celulares dos óvulos (folículo externo, folículos internos e células de teste) ainda é debatido (Kawamura *et al.*, 2011). A fase que se segue à vitelogénese é chamada de pós-vitelogénese e é alcançada quando o epitélio folicular se desfaz, a granulação desaparece e o citoplasma torna-se mais homogéneo (Villa & Patricolo, 2000; Saad, 2008).

A Figura 7 mostra um desenho esquemático do processo de vitelogénese da *S. plicata*.

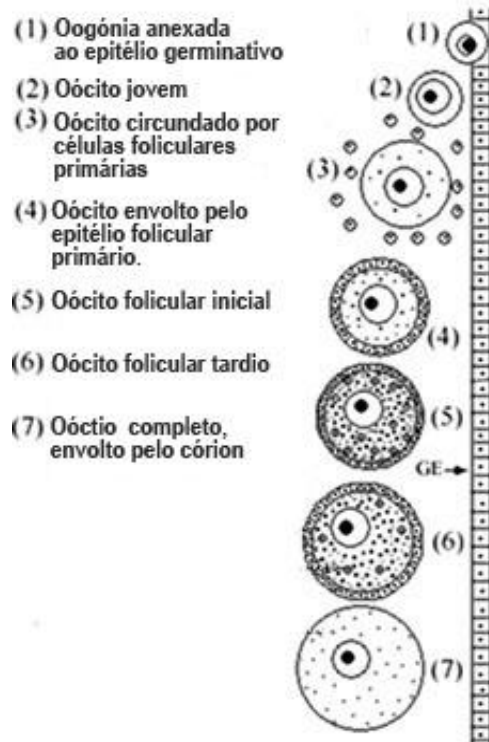


Figura 7. Desenho esquemático ilustrando o processo de vitelogênese da espécie *Styela plicata*. Modificado de Saad (2008).

Os folículos testiculares apresentam ciclo biológico de duração mais longa, pois os elementos germinativos em vários estádios de maturação são encontrados também nos meses mais frios (Sciscioli *et al.*, 1978).

A fertilização em *S. plicata* é externa, a desova ocorre a noite (Yamaguchi, 1975; Lambert, 1976), sendo os óvulos e espermatozoides libertados do sifão atrial para a coluna de água (Lambert, 2005). Os limites de temperatura para desova no laboratório foram de 11 a 28°C (West & Lambert, 1976). Nos óvulos libertados do ovário, o epitélio folicular externo está ausente (estádio pós-vitelogénico) e a camada externa dos invólucros consiste nas células foliculares internas (Villa & Patricolo, 2010). Após a fertilização, o ovo de *S. plicata* tem cerca de 230 µm de diâmetro e está rodeado pelas grandes células foliculares (Figura 8) (Villa & Patricolo, 2010).

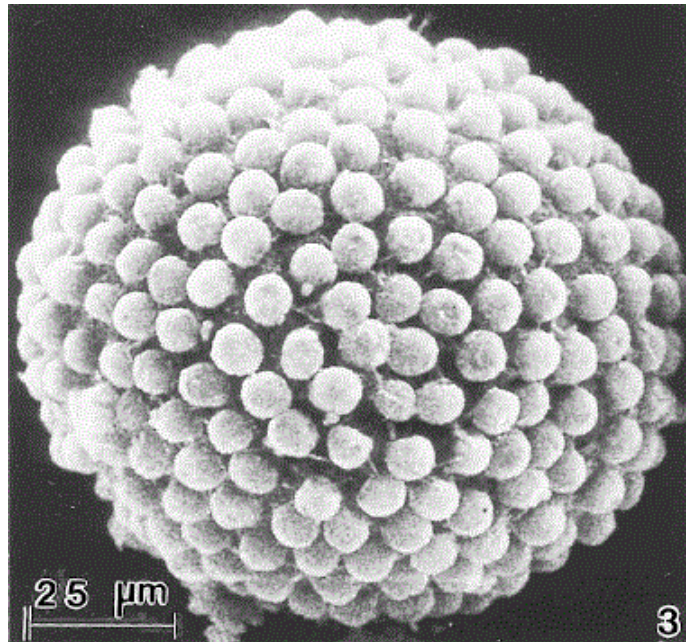


Figura 8. Microscopia eletrônica de varrimento do ovo de *Styela plicata*. Pode-se observar as grandes células foliculares de aproximadamente 18  $\mu\text{m}$  de altura. Fonte: Villa & Patricolo (2010).

Em laboratório, os ovos fecundados desenvolveram-se durante à noite e as larvas, de aproximadamente 1,3 mm de comprimento total, eclodiram durante a manhã seguinte, após 60 minutos de exposição ao sol (Yamaguchi, 1975). A larva apresenta forma de girino (Figura 9) e é classificada como lecitotrófica, ou seja, após a eclosão alimenta-se das reservas presentes no vitelo (Lambert, 2005). A notocorda primitiva presente na larva de *S. plicata* desaparece no indivíduo adulto (Lambert, 2005).

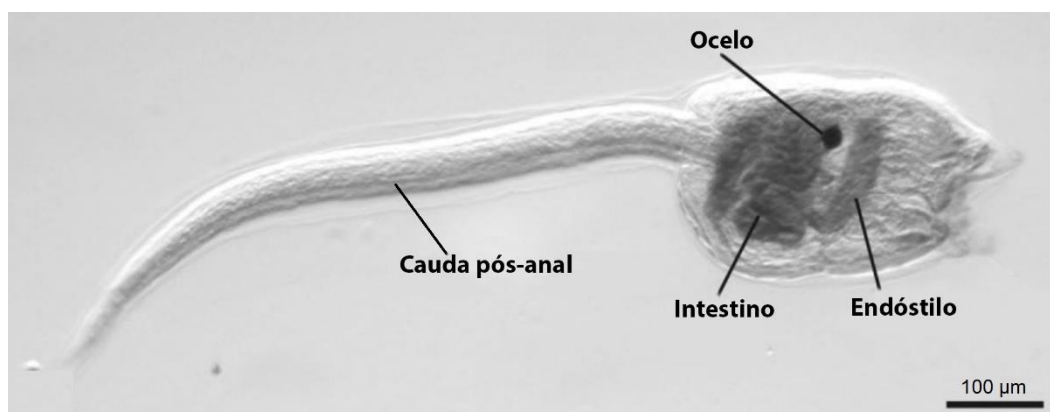


Figura 9. Larva em forma de girino de uma ascídia. Modificado de Caicci *et al.*, 2010.

O tempo larvar é curto, após adquirirem a competência larvar, as larvas perdem as capacidades natatórias e assentam um dia após a eclosão (Yamaguchi, 1975) e em poucas horas a larva sofre metamorfose, uma modificação profunda de seu plano corporal, passando de um organismo com capacidade natatória a um adulto sésil (Karaïskou *et al.*, 2015). No verão (temperaturas entre 18° e 24°C), a ascídea juvenil, com a forma idêntica à dos adultos, é formada 4 dias após o assentamento (Yamaguchi, 1975; Svane e Young, 1989).

Segundo Yamaguchi (1975), a *S. plicata* atinge a maturidade sexual por volta dos 40 mm de comprimento de corpo. Indivíduos cultivados em ambiente natural, na Baía de Tóquio, demoraram 2 meses no verão e 5 meses no inverno para atingirem o tamanho reprodutivo (Figura 10).

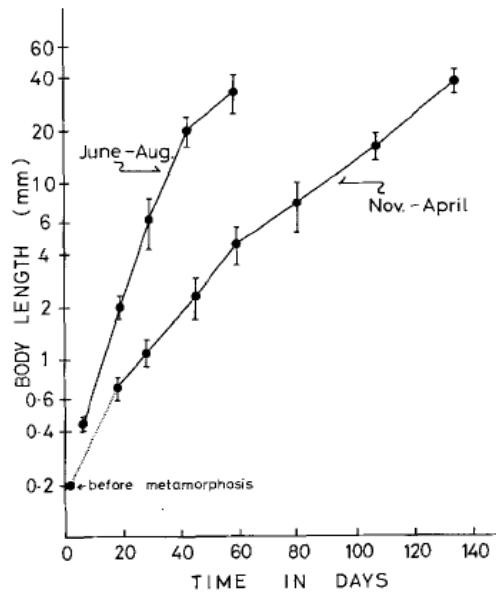


Figura 10. Crescimento de *Styela plicata*. Uma geração de verão (junho a agosto) e de inverno (novembro a abril). Comprimento médio do corpo  $\pm$  desvio padrão é dado para cada medição, plotado em escala semi-logarítmica. Fonte: Yamaguchi (1975).

A Figura 11 mostra um desenho esquemático dos estádios do ciclo reprodutivo de uma ascídia.

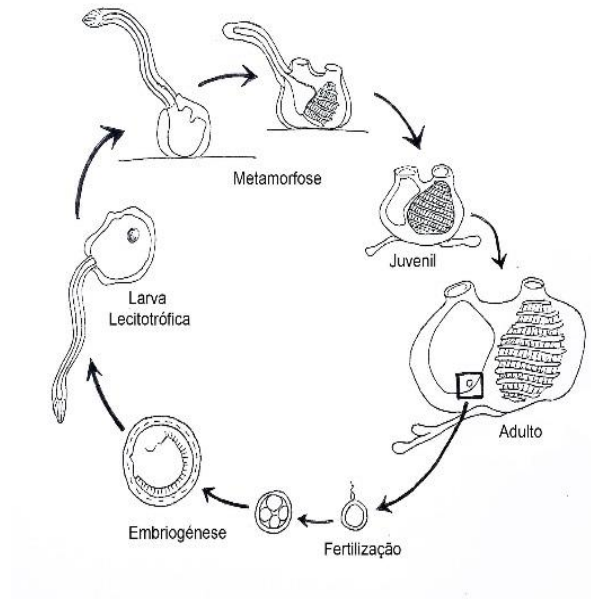


Figura 11. Ciclo reprodutivo de ascídia. Fonte: gbri.org.au (modificado)

### 3. Objetivo do Estudo

O objetivo do presente estudo é determinar o ciclo reprodutivo da ascídia *Styela plicata* presente numa unidade de cultivo em jangada de mexilhão (*Mytillus edulis*) na Lagoa de Albufeira. Este estudo da biologia reprodutiva desta espécie, que tem um potencial invasor, é primordial para o apoio no desenvolvimento de estratégias de conservação do ambiente de cultivo.

Neste projecto, pretende-se efetuar o estudo da biologia reprodutiva da ascídia *S. plicata* presente na Lagoa de Albufeira, contribuindo assim para um melhor entendimento sobre como as variáveis ambientais como a temperatura e a salinidade influenciam o seu desenvolvimento e estabelecimento. A caracterização biológica do ciclo reprodutivo de uma espécie ou população permite-nos apurar quais os meses do ano em que cada fase do ciclo gametogénico ocorre em maior frequência. Sendo assim possível fazer a determinação do ciclo reprodutivo da espécie.

Para atingir o objetivo de caracterização biológica do ciclo reprodutivo da ascídia *S. plicata*, este estudo concentrou-se na determinação de parâmetros biométricos dos indivíduos (peso e comprimento), na avaliação do índice gonadossomático (GI) e na análise histológica para a identificação dos estádios de desenvolvimento gametogénico das gónadas e medição do diâmetro dos oócitos em indivíduos de *S. plicata* coletados numa jangada de cultivo de mexilhões na Lagoa de Albufeira, ao longo de 14 meses.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Caracterização da Área de Estudo

A Lagoa de Albufeira (38°30'42.44"N 9°10'23.66"W) está localizada a 20 km ao sul de Lisboa, numa costa mesotidal moderadamente exposta e tem uma orientação NE-SW em relação à costa (Pereira Coutinho *et al.*, 2012) (Figura 12A). É um corpo de água classificado como água de transição por apresentar um caráter parcialmente salgado em resultado da proximidade das águas costeiras do Oceano Atlântico, mas com influência significativa da contribuição por um curso de água doce (DGRM, 2019). É composta por dois corpos de água contíguos, a Lagoa Grande e a Lagoa Pequena, separados por um canal estreito, sinuoso e pouco profundo (Figura 12B).



Figura 12. Mapa da Área da Lagoa de Albufeira. (A) Localização da Lagoa de Albufeira (38°30'42.44"N 9°10'23.66"W) (\* em vermelho). (B) Localização da área amostral (\* em vermelho). Fonte: Google Earth 2020 (modificado).

A lagoa tem área de 1,3 km<sup>2</sup>, profundidade média entre 4 e 5 m e profundidade máxima de 13 m na zona inferior e central da lagoa (Pereira Coutinho *et al.*, 2012). Apresenta geometria alongada, com um comprimento máximo de 3,5 km e uma largura máxima de 625 m (DGRM, 2019). A salinidade da água é de aproximadamente 35 e a temperatura média 21°C (o presente trabalho).

A evolução geomorfológica da Lagoa de Albufeira é marcada pela sedimentação e assoreamento da entrada da lagoa, que fecha intermitentemente a ligação com o mar. Para promover a renovação e a manutenção da qualidade da água da lagoa, é realizada a

abertura artificial da barra da lagoa uma vez ao ano, geralmente durante a primavera (DGRM, 2019).

Na Lagoa de Albufeira são desenvolvidas diversas atividades de relevante importância económica, como: aquacultura; pesca profissional e lúdica (exceto a desportiva); prática de mergulho; desportos náuticos (*windsurf*, *kitesurf*, *padle*, caiaque, canoagem, remo, vela); e turismo de natureza (particularmente a observação de aves na Lagoa Pequena) (DGRM, 2019). No final dos anos 70, uma cultura intensiva de mexilhões (*Mytilus edulis*) foi introduzida na zona inferior, central e mais profunda da lagoa (DGRM, 2019).

As amostragens biológicas foram realizadas mensalmente numa das jangadas de cultivo de mexilhão localizada no centro da Lagoa de Albufeira nas coordenadas 38°30'42.44"N 9°10'23.66"W (Figura 12B). A jangada utilizada para a coleta dos exemplares é uma jangada activa na produção de *M. edulis*, estando presentes na jangada várias cordas de cultivo com cerca de 10m de comprimento cada, como observado na Figura 13.

Os parâmetros físicos de temperatura (°C) e salinidade foram medidos mensalmente junto às jangadas, a várias profundidades, com o auxílio de uma sonda multiparamétrica (YSI EXO 3, YSI, EUA).



Figura 13. Jangada em que foi realizada a coleta. As cordas dispostas verticalmente com os mexilhões cultivados. Foto: Maria Ana Dionísio.



As cordas foram puxadas para fora da água e os exemplares que estavam aderidos às conchas dos mexilhões foram coletados (Figura 14).



Figura 14. Corda de cultivo de mexilhões. As setas indicam os espécimes de *Styela plicata* aderidos às conchas dos mexilhões. Foto: Maria Ana Dionísio.

#### 4.2. Caracterização e Dados Biométricos dos Indivíduos Coletados

Os espécimes (n=30 *S. plicata*) foram coletados à mão mensalmente, entre julho de 2019 e agosto de 2020, de forma aleatória, sendo sempre selecionados os maiores exemplares disponíveis.

Após a coleta, foram realizadas as medições de comprimento (mm) da túnica com o auxílio de uma craveira de precisão. Após a medição do exemplar, foram retirados os organismos epibiontes presos à túnica e o máximo possível da água contida no espécime. De seguida, procedeu-se a pesagem (g) com o auxílio de uma balança analítica (AE ADAM PGL 3002, Milton Keynes, Inglaterra). Este processo foi repetido para cada um dos 30 exemplares recolhidos por mês.

No mês de abril de 2020, devido a problemas técnicos decorrentes da pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, as medidas de comprimento e peso foram feitas em indivíduos preservados em álcool 70%. Para realizar a conversão, utilizaram-se os padrões/proporções com base nas medidas de comprimento dos indivíduos frescos coletados nos meses de maio e junho de 2020.

### 4.3. Método Utilizado para as Análises Histológicas e Índice Gonadossomático

Após compilados os dados biométricos, cada indivíduo foi acondicionado em frascos de polietileno e fixados em formaldeído tamponado a 4% com água da Lagoa de Albufeira durante 48 horas, e em seguida foram transferidos para álcool 70%. As amostras foram levadas para o laboratório de histologia da ESTM-Politécnico de Leiria onde se iniciaram os processos para a obtenção dos dados histológicos.

O Índice Gonadossomático (GI) foi realizado para 15 espécimes de *S. plicata* por mês. Com o auxílio de um bisturi, a túnica foi cortada ventralmente, para a dissecação do manto e do saco branquial e exposição das gónadas (Pineda *et al.*, 2013) (Figura 15). O peso total dos espécimes foi obtido com o auxílio de uma balança analítica (AE ADAM PGL 3002, Milton Keynes, Inglaterra) e de seguida, com o auxílio de um bisturi e pinça, as gónadas foram separadas e pesadas. O GI foi obtido dividindo o peso da gónada pelo peso total do corpo (Giese, 1958).

$$GI = \frac{\textit{peso gónada}}{\textit{peso total}}$$

Como *S. plicata* é hermafrodita, o GI, portanto, combina o peso dos ovários e testículos. Nos indivíduos em que as gónadas não puderam ser adequadamente dissecadas, como por exemplo, gónadas muito reduzidas ou gónadas que não puderam ser completamente separadas dos outros tecidos, os indivíduos foram excluídos dos cálculos do GI.

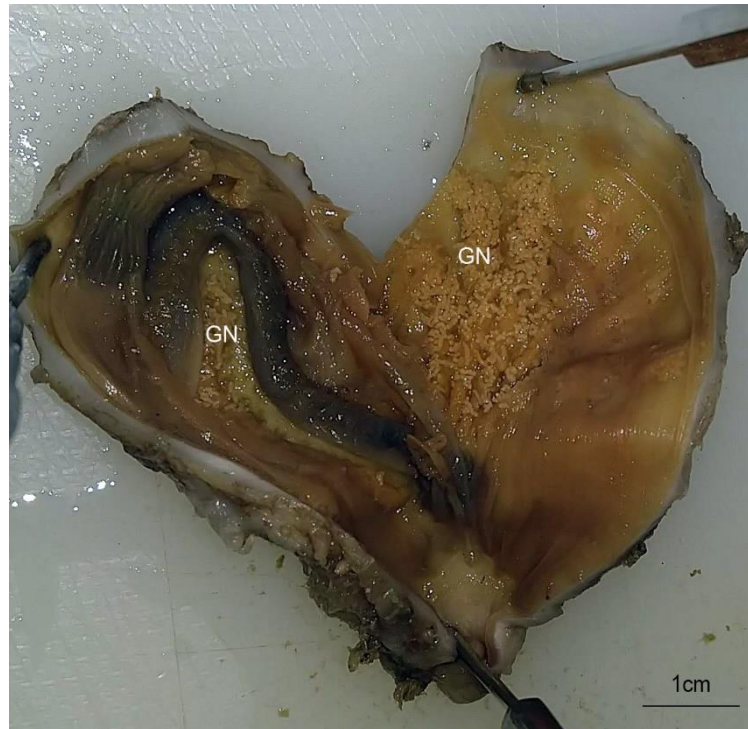


Figura 15. Espécime de *Styela plicata* dissecada para a exposição das gónadas (GN).

As análises histológicas foram realizadas em 30 espécimes de *S. plicata* por mês. De cada espécime foi retirada uma amostra de aproximadamente 1 cm de gónada (Pineda *et al*, 2013), que posteriormente foi levada ao processador de tecidos (Leica TP1020, Alemanha), onde se realizou o processo de desidratação dos tecidos. Após a desidratação, os tecidos foram clarificados em xilol e de seguida impregnados com parafina (Anexo I). No final do processamento dos tecidos, as amostras foram incluídas em parafina, e deixadas à temperatura ambiente por no mínimo 24h. De seguida foram realizados cortes de 7 micra em cada amostra, utilizando um micrótomo (Sakura Accu – cut SRM 200, Japão). Os cortes obtidos foram colocados a flutuar num banho-maria, de modo a promover a distensão e de seguida colocados sobre a lâmina. As lâminas foram preservadas numa estufa a 37°C (Binder, Tuttlingen, Alemanha) durante o mínimo de 24h, até serem submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (Anexo II).

Após a coloração, as lâminas e lamelas foram montadas com o auxílio de uma pinça e Coverquick 2000 Path® (São Francisco, EUA) e deixadas à temperatura ambiente durante 72h. Assim, obtiveram-se as preparações definitivas das gónadas que foram observadas ao microscópio ótico (Leica DM 2000 LED, Alemanha) e fotografadas (Leica MC170 HD, Alemanha) para medição do diâmetro dos oócitos de cada indivíduo (*Software* LAS V4.4, Alemanha).

Foi medido o diâmetro de 30 oócitos por indivíduo (n=30) por mês. Foram escolhidos os oócitos seccionados através do nucléolo de modo a se certificar que se abrangia o maior diâmetro possível do oócito e uniformizar a técnica de medição dos oócitos. Os oócitos foram classificados de acordo com os seus diferentes estádios de desenvolvimento em três classes, determinadas pelo tamanho e características histológicas, de acordo com Sciscioli *et al.* (1978) e Pineda *et al.* (2013), permitindo identificar o estágio de maturação dos indivíduos:

- Estádio I (pré-vitelogénico) – oócitos menores que 50  $\mu\text{m}$ , fortemente basófilos, com um núcleo grande a ocupar a maior parte do citoplasma;
- Estádio II (vitelogénico) – oócitos entre 50-150  $\mu\text{m}$ , as primeiras células foliculares tornam-se visíveis e o folículo primário inicia o processo que dará origem às duas camadas de células, uma externa, composta de células achatadas, e uma interna, acompanhando algumas células teste (células auxiliares presentes nas gónadas);
- Estádio III (maturo) – oócitos maiores que 150  $\mu\text{m}$ , o citoplasma continua a acumular material nutritivo e a aumentar em volume, acompanhando as células teste e as duas camadas de células foliculares (internas e externas).

Após a classificação dos oócitos por estádios de desenvolvimento, foi calculada a frequência de tamanho dos oócitos para cada classe por cada mês, de acordo com Pineda *et al.* (2013).

Para os testículos, foi estabelecido um índice de maturidade categórico, seguindo os mesmos autores, Sciscioli *et al.* (1978) e Pineda *et al.* (2013), de acordo com o desenvolvimento do folículo masculino:

- Estádio I (imaturo) – folículos masculinos preenchidos somente por espermatogoneas;
- Estádio II (maturo) – folículos masculinos repletos de numerosos espermatozoides maduros no lúmen;
- Estádio III (desovado) – folículos masculinos com espaços vazios no lúmen.

#### 4.4. Método para a Análise de Dados

Para a análise dos dados, foram estabelecidos a média e o desvio padrão para o comprimento e peso dos indivíduos coletados, assim como a média e o desvio padrão para o diâmetro dos oócitos.

Os parâmetros físicos da água, temperatura e salinidade, foram relacionados nos gráficos com as médias dos oócitos. O GI foi relacionado com a temperatura e com as médias dos oócitos.

A apresentação gráfica dos resultados foi executada mediante a utilização do programa Microsoft Office Excel (versão 2002) e o tratamento estatístico dos dados foi realizado com auxílio do programa IBM SPSS (versão 28.0.0.0 (190)).

Para determinar se houve diferenças significativas entre os 14 meses de estudo para o comprimento e peso dos animais foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ( $H_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor}$ ; valor de significância  $p$ ), pois as amostras não cumpriram os pressupostos de distribuição normal e homogeneidade de variância dos dados (Zar, 2010). Quando se verificaram diferenças significativas entre grupos de dados, procedeu-se as comparações por Método Pairwise (Zar, 2010).

Na avaliação da biologia reprodutiva de *S. plicata*, comparou-se o GI e o diâmetro dos oócitos entre os 14 meses de amostragem com a execução de teste não paramétrico Kruskal-Wallis ( $H_{\text{graus de liberdade}} = \text{valor}$ ; valor de significância  $p$ ), pois as amostras não cumpriram os pressupostos de distribuição normal e homogeneidade de variância dos dados (Zar, 2010). Quando se verificaram diferenças significativas entre grupos de dados, procedeu-se as comparações por Método Pairwise para identificar quais os grupos eram significativamente distintos dos restantes (Zar, 2010).

Foram realizados testes de correlação (correlação de Pearson  $r = \text{valor}$ ) para determinar se houve correlação entre o GI e o tamanho médio dos oócitos e a temperatura da água; e o tamanho médio dos oócitos e a temperatura e a salinidade da água da Lagoa de Albufeira durante o período amostral. O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), também chamado de correlação linear ou  $r$  de Pearson, é um grau de relação entre duas variáveis quantitativas e exprime o grau de correlação através de valores situados entre -1 e 1 (Zar, 2010).

Sempre que aplicável, os valores foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio-padrão. Na análise estatística dos dados, utilizou-se o nível de significância  $\alpha = 0,05$  (Zar, 2010).

## 5. Resultados

Durante os 14 meses de estudo efectuado nas jangadas de produção de aquacultura de mexilhões na Lagoa de Albufeira, registrou-se a presença da *S. plicata*. Observou-se que esta espécie forma agregados de indivíduos aderidos às conchas dos mexilhões de produção e às túnicas uns dos outros. Foram também observadas outras espécies de epibiontes, tais como outros tunicados, *e.g.* *C. intestinalis*, em alguns casos sendo difícil visualizar os próprios mexilhões cultivados (Figura 16).



Figura 16. Agregado de *Styela plicata* e outros epibiontes em substrato de cultivos de mexilhões na Lagoa de Albufeira. Janeiro de 2020.

As ascídias *S. plicata* apresentaram diferenças estatísticas significativas ao longo dos 14 meses de amostragem no que se refere ao comprimento (Kruskal-Wallis  $H_{13}=158,319$ ;  $p<0,001$ ) e ao peso (Kruskal-Wallis  $H_{13} = 159,734$ ;  $p<0,001$ ). As médias e o desvio padrão do comprimento e do peso de *S. plicata* podem ser observadas nas Figuras 17 e 18, respetivamente, assim como as diferenças estatísticas significativas indicadas pelas letras diferentes ( $p<0,001$ ) (Figuras 17 e 18).

O indivíduo amostrado de *S. plicata* de maior comprimento apresentou 81,34 mm, registado no mês de setembro de 2019, enquanto o menor apresentou comprimento de 20,1 mm, registado no mês de março de 2020.

As comparações por Método Pairwise para a variável comprimento mostrou que os meses de julho, outubro, novembro e dezembro de 2019 e janeiro e agosto de 2020 foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,001$ ) e diferiram dos demais meses. Os meses de agosto de 2019, fevereiro, março, abril e maio de 2020 apresentaram valores de comprimento semelhantes, não havendo diferenças significativas entre si ( $p>0,001$ ), e setembro de 2019, junho e julho de 2020, são estatisticamente semelhantes ( $p>0,001$ ) diferindo dos demais meses (Figuras 17).

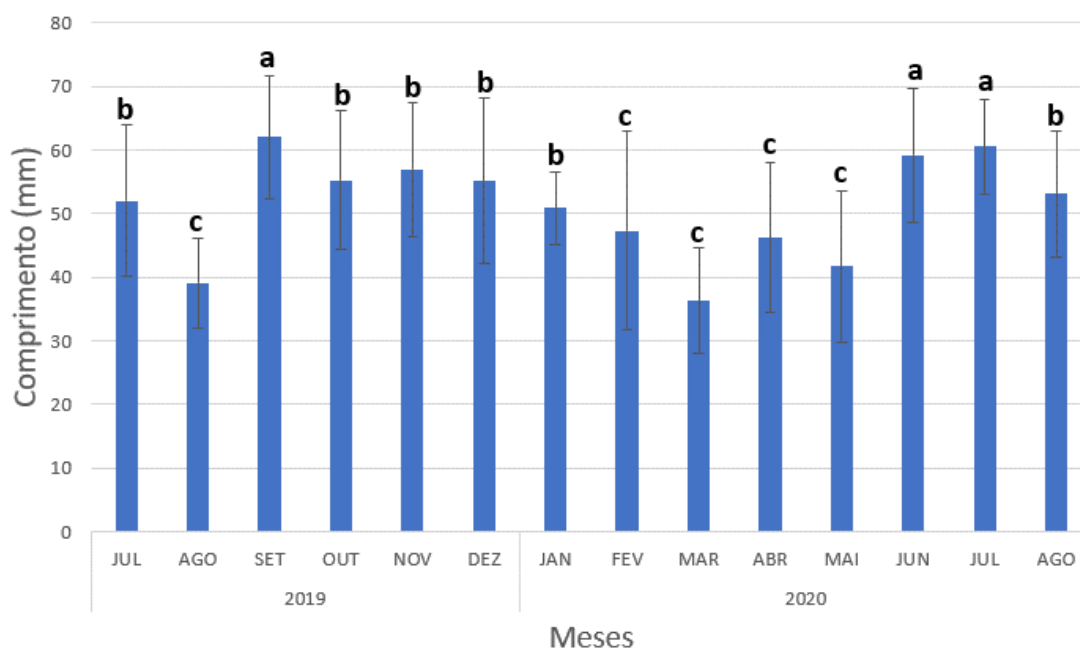


Figura 17. Comprimento médio (mm)  $\pm$  desvio padrão de *Styela plicata* no período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa da Albufeira. As letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p<0,001$ ).

O indivíduo de *S. plicata* de maior peso amostrado pesou 31,4 g, registrado no mês dezembro de 2019, e o de menor peso apresentou 10,98 g, registrado no mês de maio de 2020.

As comparações por Método Pairwise para a variável peso entre os meses do estudo mostrou que os meses julho, novembro, dezembro de 2019, janeiro, junho e julho de 2020 foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,001$ ) diferindo dos demais meses. Os meses de agosto de 2019, março, abril e maio de 2020 foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,001$ ), diferindo dos demais meses. Os meses de setembro, outubro de 2019, fevereiro, abril e agosto de 2020 foram semelhantes entre si ( $p>0,001$ ) (Figura 18).

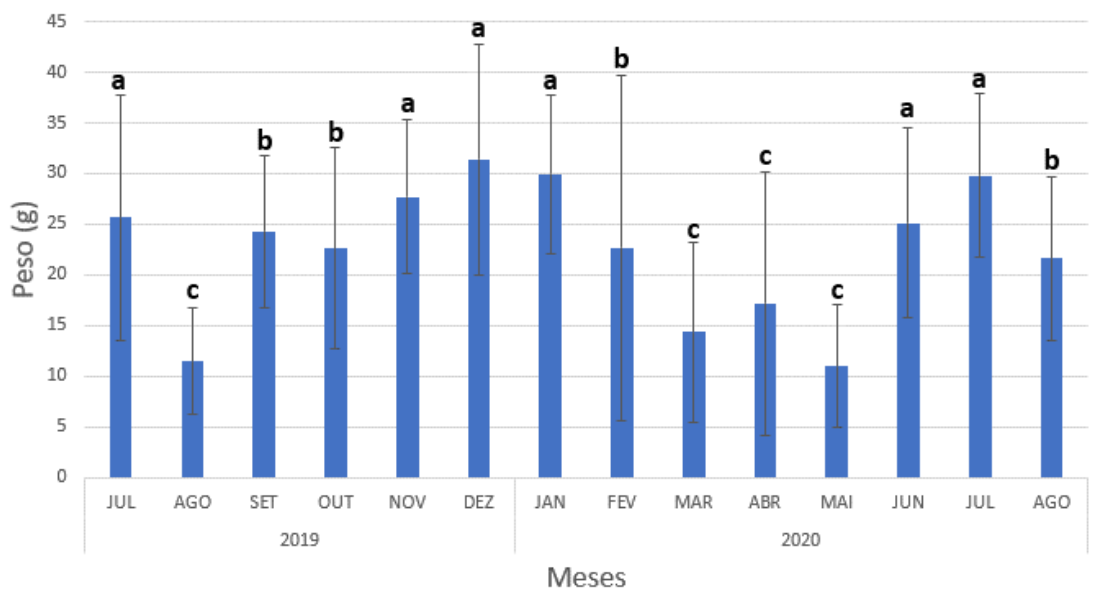


Figura 18. Peso médio (g)  $\pm$  desvio padrão de *Styela plicata* no período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa da Albufeira. As letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,001$ ).

As medidas de comprimento e peso no mês de abril de 2020 foram feitas em indivíduos preservados em álcool 70%. A percentagem de perda no comprimento foi de 17,2% e a percentagem de perda no peso foi de 54,4%.



A espécie *S. plicata* pertence à Ordem Pleorogona e apresenta as gónadas, femininas e masculinas, localizadas entre o manto e o saco branquial, de ambos os lados do corpo, especialmente do lado direito (Figura 19).

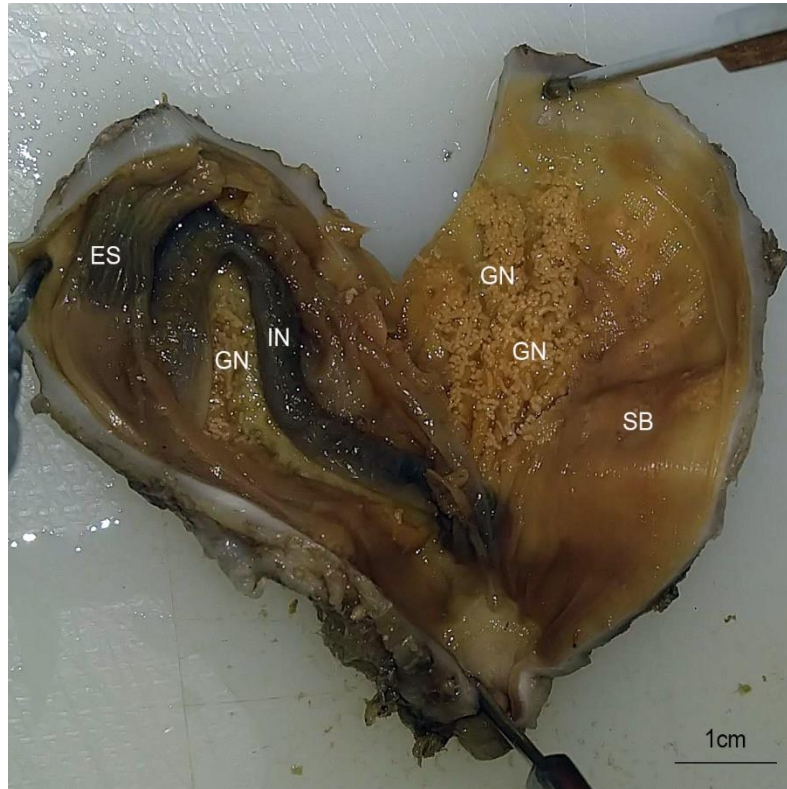


Figura 19. Indivíduo dissecado de *Styela plicata*, após remoção parcial do saco branquial. GN, gónadas; SB, saco branquial; IN, intestino; ES, estômago. Indivíduo coletado em julho de 2019.

O exame histológico das gónadas de *S. plicata* confirma a hipótese desta espécie ser hermafrodita, sem gónadas fisicamente separadas (Figura 20). O tecido ovariano localizava-se principalmente na porção apical, enquanto o tecido testicular estava na porção terminal; esta distribuição foi observada durante os 14 meses do estudo.



Figura 20. Histologia gonadal de *Styela plicata* a mostrar as gónadas femininas e masculinas presentes no mesmo indivíduo. Oo: oócitos; FM: folículos masculinos. Indivíduo coletado em março de 2020.

Os oócitos com tamanho inferior a 50  $\mu\text{m}$  foram classificados como imaturos (Estádio I - pré-vitelogénico), e o citoplasma apresentou-se de conteúdo homogéneo e fortemente basofílico (Figura 21).

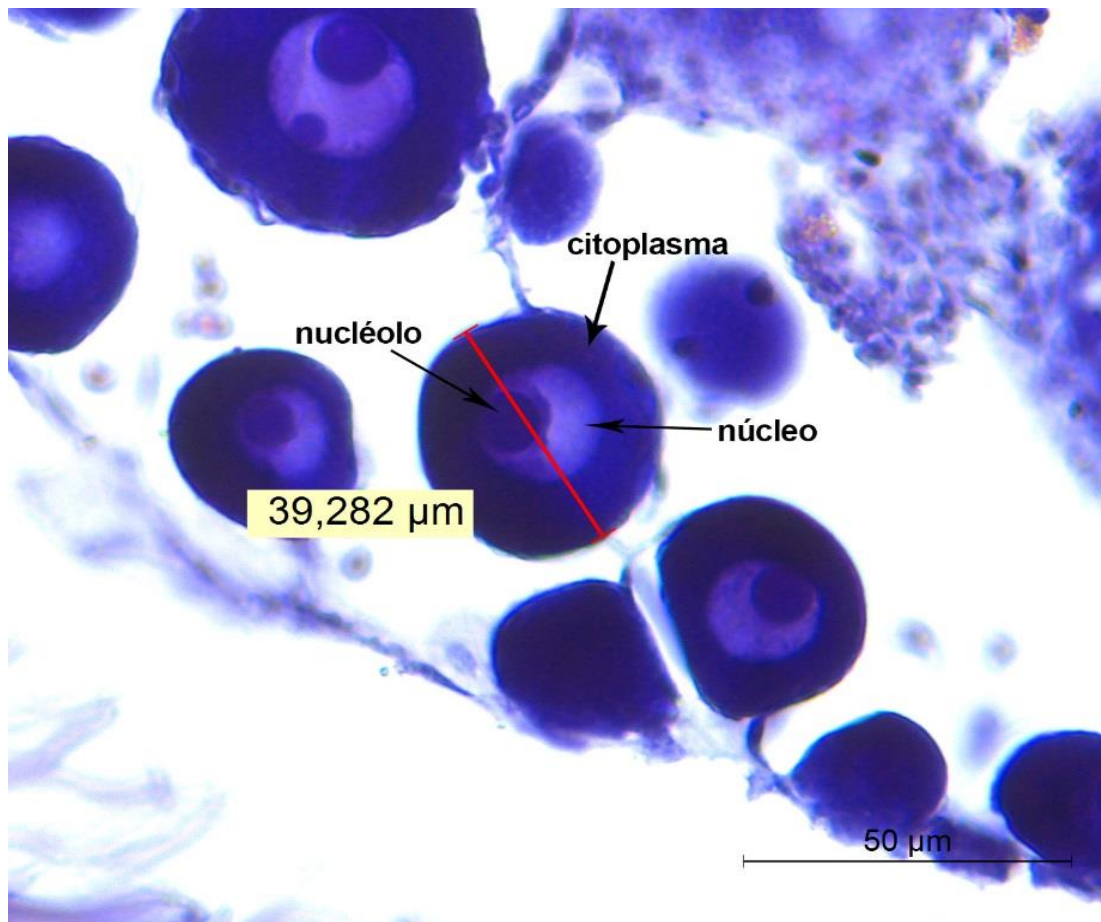


Figura 21. Oócito de *Styela plicata* em estágio I - pré-vitelogénese. Oócito de 39,28  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O citoplasma homogéneo e fortemente basofílico. Núcleo e nucléolo. Indivíduo coletado em agosto de 2019.

Os oócitos entre 50 e 150  $\mu\text{m}$  foram classificados em Estádio II (vitelogénese), estando as primeiras células foliculares visíveis e a iniciar o processo que daria origem às duas camadas de células foliculares (Figura 22).

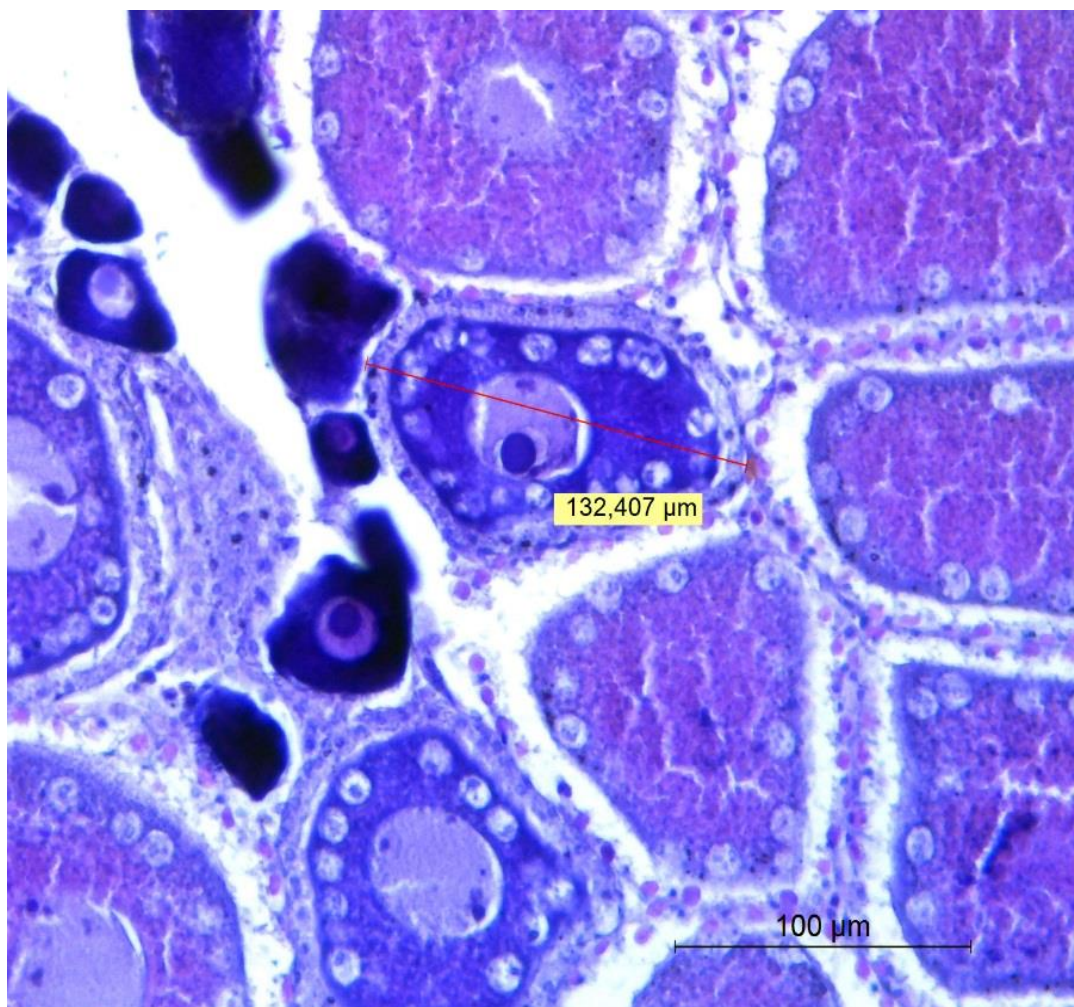


Figura 22. Oócito de *Styela plicata* em Estádio II - vitelogénese. Oócito medindo 132,40 μm de diâmetro. Indivíduo coletado em agosto de 2019.

Os oócitos de tamanho superior a 150 μm foram classificados em Estádio III (maturados), estando as duas camadas de células foliculares formadas e as células teste presentes (Figura 23). O tamanho máximo de oócito (256 μm) foi observado num indivíduo coletado em janeiro de 2019.

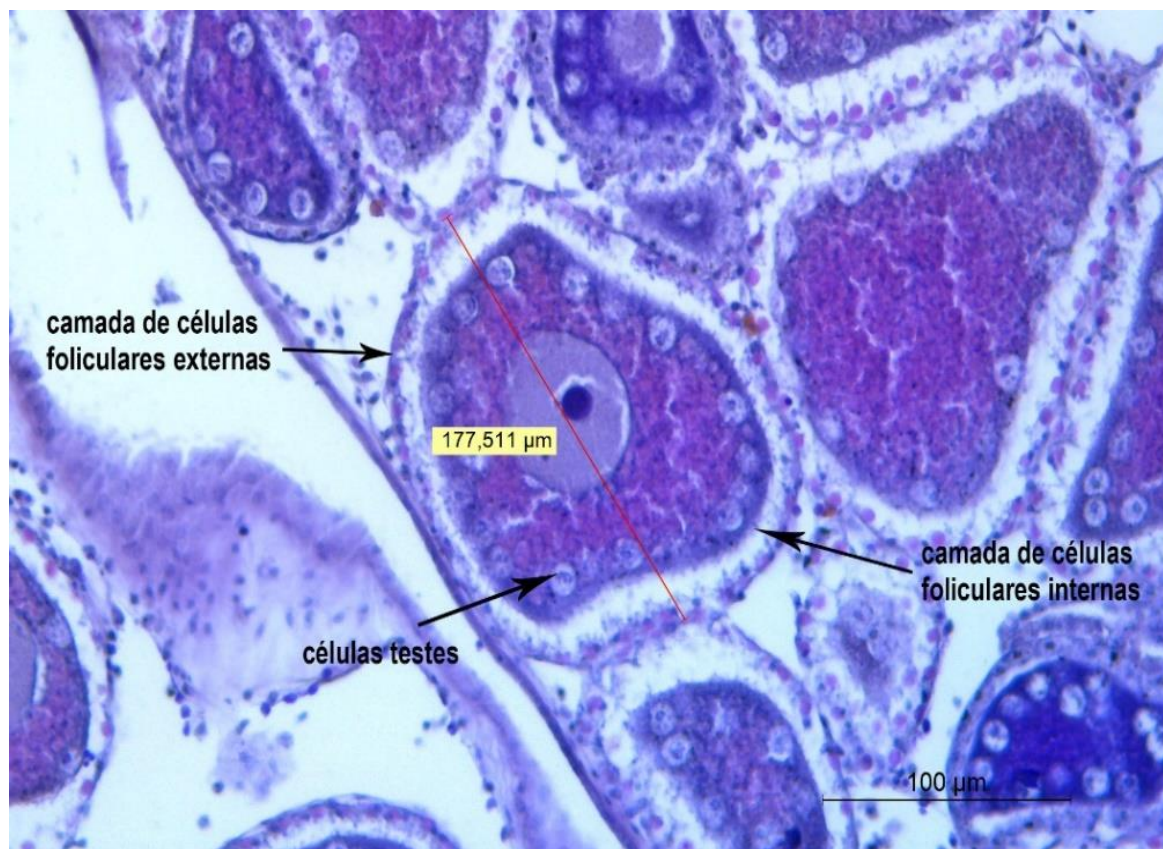


Figura 23. Oócito de *Styela plicata* em Estádio III. Oócito de 177,511 $\mu$ m de diâmetro. Presença das células testes e duas camadas de células foliculares, uma interna e outra externa. Indivíduo coletado em agosto de 2019.

A temperatura da água da lagoa apresentou diferenças sazonais, com o menor valor no inverno, no mês de janeiro, registrando 12,0°C, e a temperatura mais elevada no verão, no mês de julho de 2020, registrando 21,8°C (Figura 24).

O GI foi mais elevado no verão, quando também foram registradas as temperaturas mais elevadas (Figura 24). A Correlação de Pearson entre a temperatura e o GI apresentou r igual a 0,774 ( $p < 0,01$ ), um r positivo e alto indica uma forte relação linear positiva entre as duas variáveis.

Em julho de 2019 o GI foi de 3,74 e a temperatura foi de 21,2°C. A partir daí, o GI subiu, atingindo o seu valor máximo (5,35) em setembro de 2019. Após setembro, o GI e a temperatura apresentaram queda, atingindo valores de 1,5 e 14,6°C, respectivamente, em novembro de 2019, período do outono. Apesar da temperatura continuar a cair, o GI aumentou nos meses de dezembro de 2019 (GI=1,59) e janeiro de 2020 (GI=1,82), e depois voltou a diminuir, até atingir o menor valor registrado em março de 2020 (GI=0,67) (temperatura=15,6°C). Com o início da primavera, o GI começou a subir até atingir o

valor de 3,22 em julho de 2020 a 21,8°C, e voltou a apresentar queda em agosto de 2020 (GI=3,08 e temperatura=21,1°C) (Figura 24).

O GI de *S. plicata* apresentou diferenças estatísticas significativas ao longo dos 14 meses de amostragem (Kruskal-Wallis  $H_{13}=107,132$ ;  $p<0,001$ ) e as comparações por Método Pairwise mostraram que o GI de *S. plicata* nos meses de julho, agosto e setembro de 2019 e junho, julho e agosto de 2020 foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,001$ ) e diferiram dos demais meses amostrados, novembro e dezembro de 2019 e janeiro, fevereiro, março, abril e maio de 2020, sendo estes estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,001$ ). As letras diferentes indicam as diferenças significativas ( $p<0,001$ ) (Figura 24).

As temperaturas de abril e maio não puderam ser aferidas, por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemia do SARS-CoV-2.

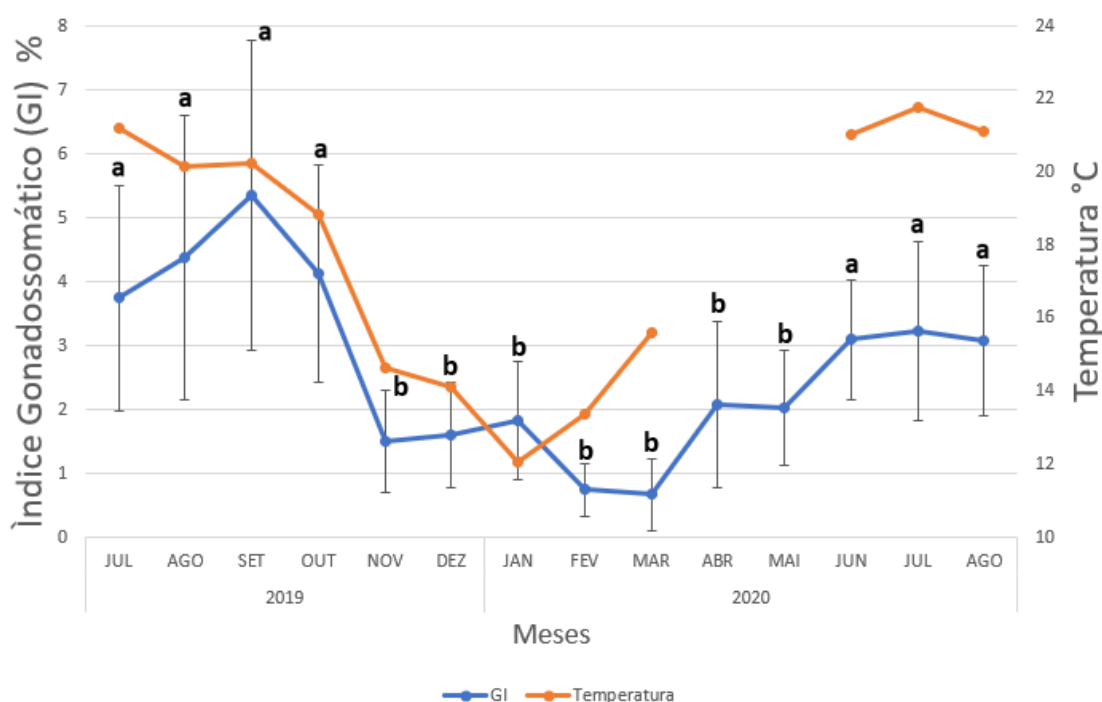


Figura 24. Índice gonadossomático médio de *Styela plicata* e a temperatura da água para o período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa de Albufeira, Portugal.  $n=15$ , exceto para: julho 2019,  $n=13$ ; setembro 2019,  $n=13$ ; fevereiro 2020,  $n=13$ ; abril 2020,  $n=13$ ; maio,  $n=13$ ; junho 2020,  $n=14$ . Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p<0,001$ ) no GI. As temperaturas dos meses de abril e maio de 2020 não puderam ser aferidas por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemia do SARS-CoV-2.

No que respeita à análise histológica dos oócitos de *S. plicata*, a média dos diâmetros dos oócitos foi maior nos meses de verão, quando também foram registadas as temperaturas mais elevadas (Figura 25). A Correlação de Pearson entre a temperatura e o diâmetro médio dos oócitos apresentou  $r$  igual a 0,743 ( $p < 0,01$ ), indicando uma forte relação linear positiva entre as duas variáveis. O maior valor médio de diâmetro de oócito registado ocorreu em julho de 2020 ( $122,5 \pm 12,3 \mu\text{m}$ ) e o menor em março de 2020 ( $74,3 \pm 13,9 \mu\text{m}$ ) (Figura 25).

Em julho de 2019, o diâmetro médio dos oócitos foi de  $121,1 \pm 14,5 \mu\text{m}$  e a temperatura marcou  $14,5^\circ\text{C}$ . Após esse período, a tendência foi de queda no diâmetro médio a acompanhar a queda da temperatura, que apesar de voltar a subir a partir de janeiro de 2020, o diâmetro médio dos oócitos continuou a cair até atingir o menor valor registado em março de 2020 ( $74,3 \pm 13,9 \mu\text{m}$ ). A partir de março de 2020, quando se inicia a primavera, o valor médio do diâmetro dos oócitos começou a subir, até atingir o valor máximo registado em julho de 2020 ( $122,5 \pm 12,3 \mu\text{m}$ ) e voltou a cair em agosto de 2020 (Figura 25).

Os diâmetros dos oócitos apresentaram diferenças estatísticas significativas ao longo dos 14 meses de amostragem (Kruskal-Wallis  $H_{11}=183,803$ ;  $p < 0,001$ ). As comparações por Método Pairwise mostraram que o diâmetro dos oócitos nos meses de julho, agosto, setembro de 2019, julho e agosto de 2020 foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,001$ ), marcando os maiores valores de diâmetro de oócitos. Os meses de outubro, novembro e dezembro de 2019 apresentaram valores semelhantes de diâmetro de oócitos não diferindo estatisticamente ( $p > 0,001$ ). Fevereiro, março e abril de 2020 marcaram os menores valores de diâmetro de oócitos e também foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,001$ ). Os meses de janeiro, maio e junho não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,001$ ). Esse resultado mostra que a partir de janeiro, o diâmetro dos oócitos caminhou para atingir o menor valor médio (em março de 2020) e os meses de maio e junho foram meses em que o diâmetro médio dos oócitos caminhou para atingir o maior valor médio (em julho de 2020). As letras diferentes indicam as diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) (Figura 25)

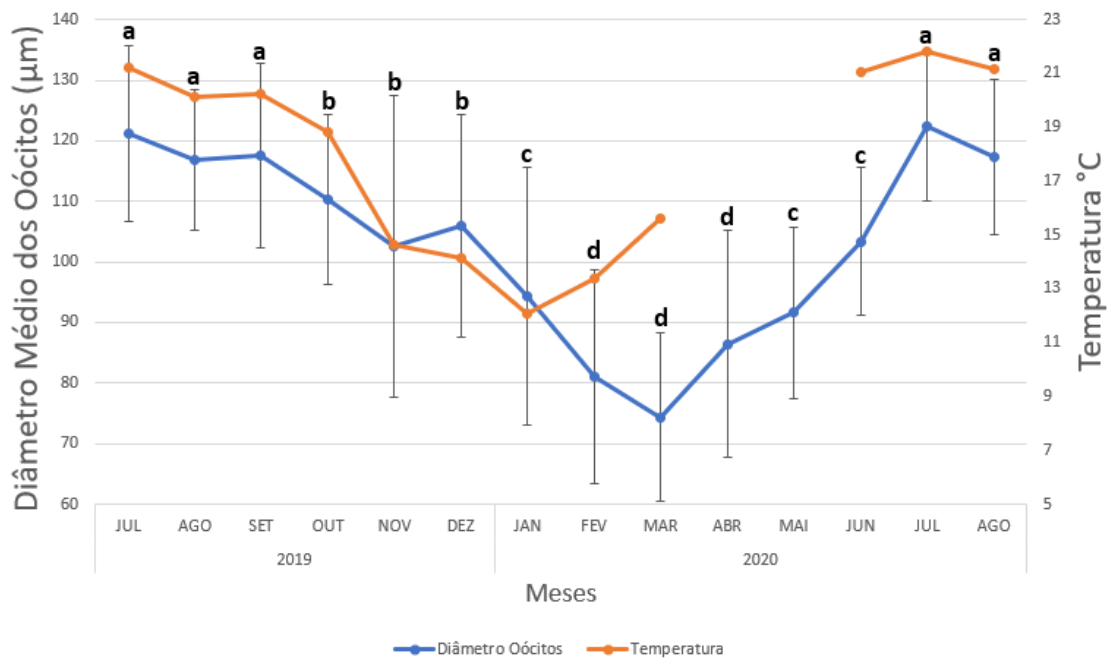


Figura 25. Diâmetro médio e desvio padrão dos oócitos de *Styela plicata* e a temperatura da água para o período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa de Albufeira, Portugal. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p > 0,001$ ) no tamanho médio dos oócitos. As temperaturas dos meses de abril e maio de 2020 não puderam ser aferidas por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemia do SARS-CoV-2.

A análise de Correlação de Pearson entre o GI e o diâmetro médio dos oócitos apresentou  $r$  igual a 0,810 ( $p < 0,001$ ), indicando uma forte relação linear positiva entre as duas variáveis.

A salinidade da água da Lagoa de Albufeira apresentou valores mais elevados nos meses de julho (35,3), agosto (36,1) e setembro (36,2) e queda a partir do mês de outubro (36,1) de 2019 chegando ao menor valor no mês de fevereiro (33,3) de 2020, mês em que a lagoa está fechada (Figura 26).

A Correlação de Pearson entre a salinidade e o diâmetro médio dos oócitos indicou uma forte relação linear positiva entre as duas variáveis, e apresentou  $r$  igual a 0,825 ( $p < 0,01$ ).



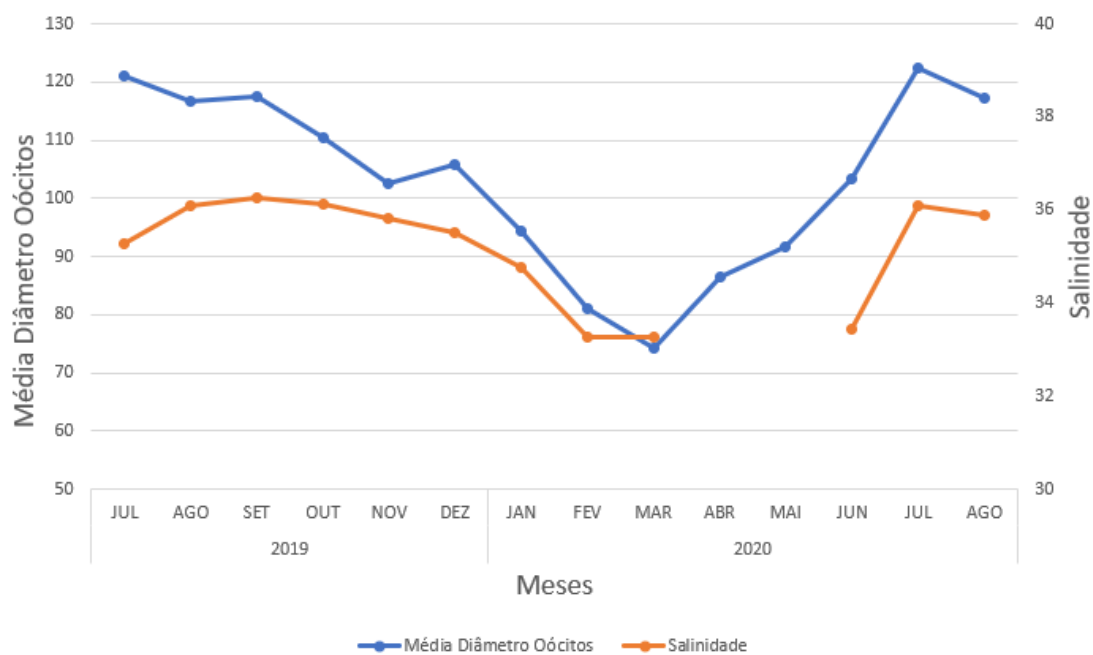


Figura 26. Diâmetro médio dos oócitos de *Styela plicata* e a salinidade da água para o período de julho de 2019 a agosto de 2020 na Lagoa de Albufeira, Portugal. A salinidade para os meses de abril e maio de 2020 não puderam ser aferidas por impedimento causado pelo confinamento imposto pela pandemias do SARS-CoV-2.

Os oócitos, de todos os estádios de desenvolvimento, estiveram presentes durante todo o ano. No entanto, indivíduos em Estádio I (oócitos em pré-vitelogénese) estiveram presentes em maior frequência no inverno, janeiro (21,5%) e fevereiro (27,6%); e no início da primavera, março (33,4%) e abril (26,2%).

Os indivíduos em Estádio de II (oócitos em vitelogénese), aumentaram sua ocorrência gradualmente de meados da primavera, maio (75,6%), até o final do verão, chegando ao pico em agosto de 2020, em que 82,9% dos oócitos se encontravam em vitelogénese.

Os indivíduos em Estádio III (oócitos maduros) foram observados em maior frequência durante o verão, com pico no mês de julho de 2020 (24,5%) e em menor frequência no início da primavera (7,3% em março) (Figura 27).

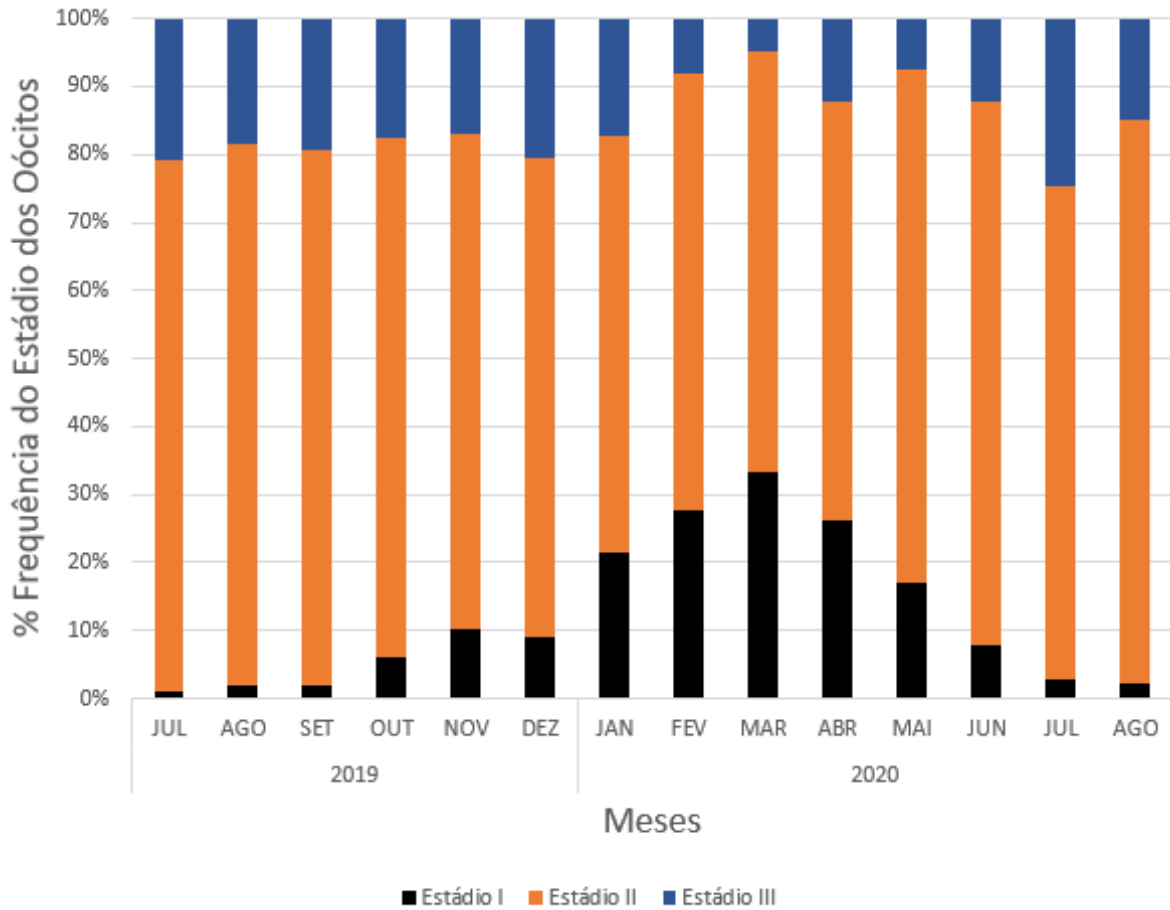


Figura 27. Frequência de cada estágio de desenvolvimento dos oócitos de *Styela plicata*. Estádio I (pré-vitelogênese – oócitos entre 0-50 µm de diâmetro; Estádio II (vitelogênese) – oócitos entre 50-150 µm de diâmetro; Estádio III (maturo) – oócitos maiores que 150 µm.

Os folículos masculinos foram caracterizados por Estádio I (imaturo), quando se apresentaram preenchidos por espermatogóneas e espermatozoides ausentes (Figura 28).

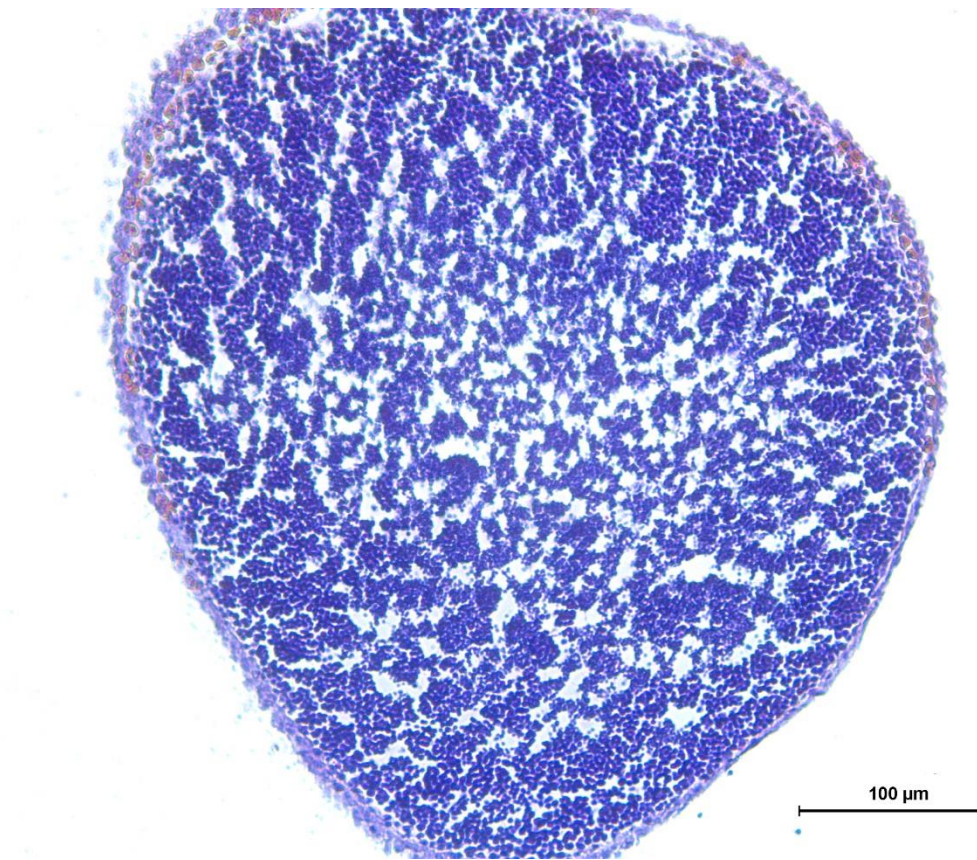


Figura 28. Folículo masculino de *Styela plicada* em estágio de desenvolvimento imaturo (Estádio I) preenchido por espermatogóneas. Indivíduo coletado em Agosto de 2019.

Os folículos masculinos foram caracterizados por Estádio II (maturo), quando apresentaram uma parede epitelial espessa e o lúmen ocupado pelo desenvolvimento de espermatozoides (Figura 29).

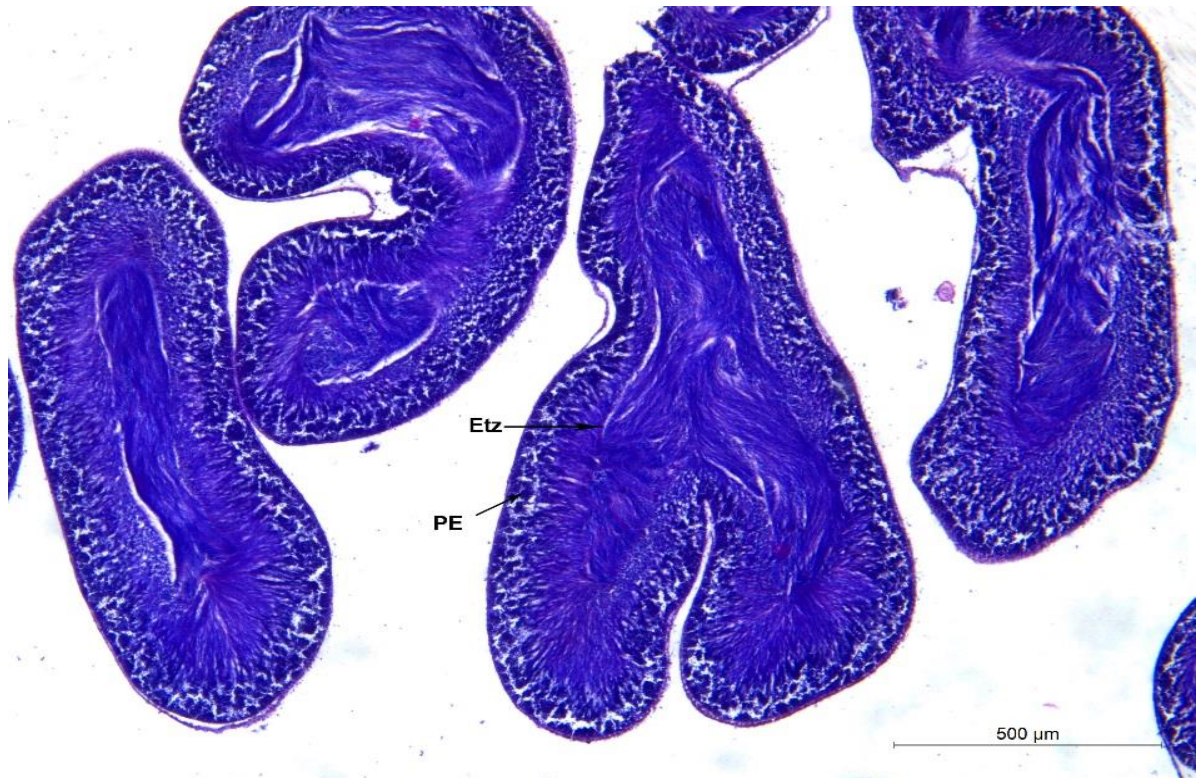


Figura 29. Folículos masculinos de *Styela plicata* em Estádio II (maturo). PE: epitélio germinal; Etz: espermatozoides maduros no lúmen. Indivíduo coletado em agosto de 2019.

Os folículos masculinos com espaços vazios no lúmen, foram caracterizados no Estádio III (desovado), quando ocorreu a desova dos espermatozóides (Figura 30).

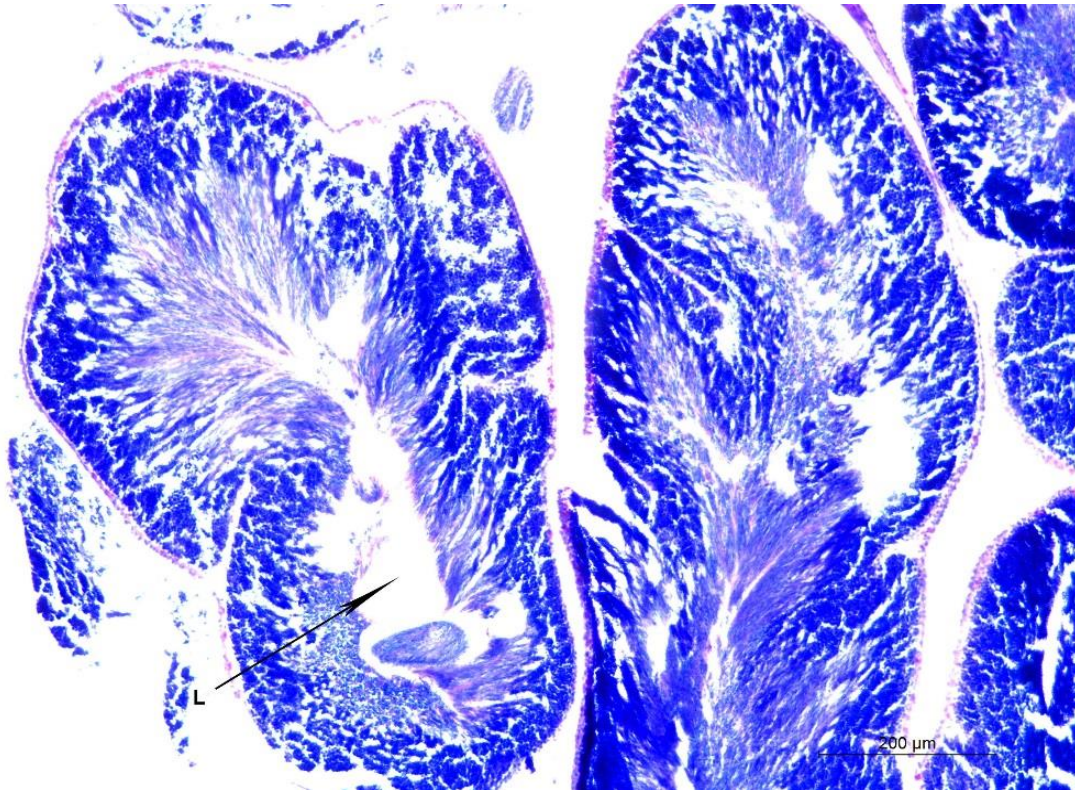


Figura 30. Folículos masculinos de *Styela plicata* após a desova mostrando o espaço vazio do lúmen após a liberação dos espermatozoides. L: lúmen. Indivíduo coletado em setembro de 2019.

Os folículos masculinos apresentaram atividade proliferativa contínua, sendo possível observar, procedendo da periferia em direção à porção central, uma espessa camada de espermatogônias e espermatozoides, que ocupam a luz da vesícula (Figura 31).

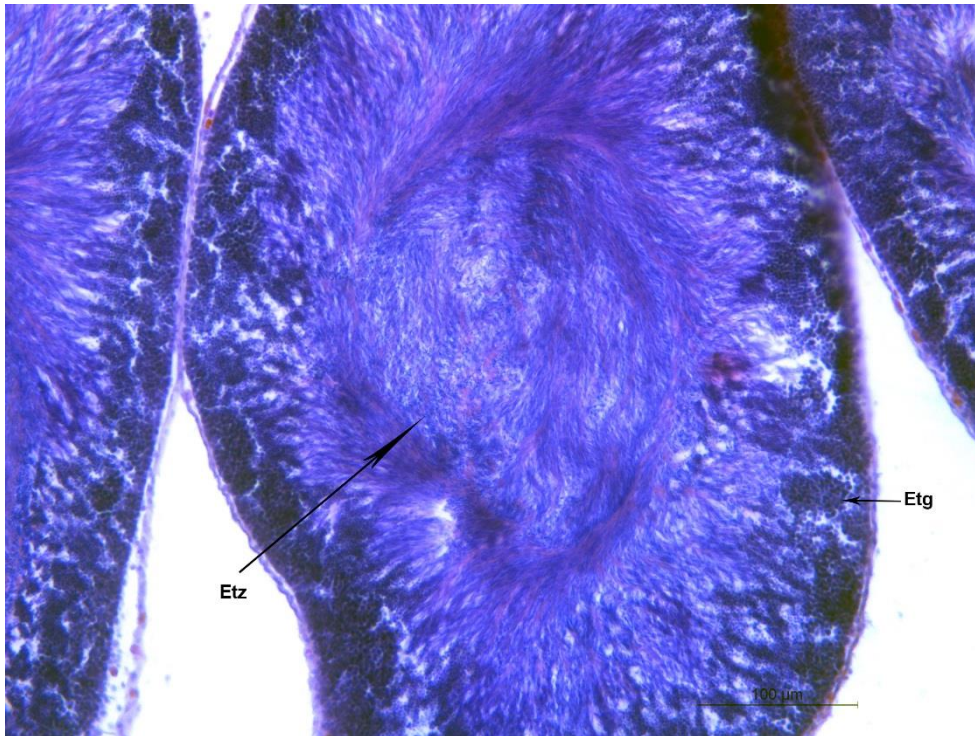


Figura 31. Folículo masculino maduro de *Styela plicata*. Etz: espermatozoides; Etg: espermatogónias. Indivíduo coletado em agosto de 2020.

Os folículos masculinos em Estádio I (imatuross) foram observados nos meses de julho (3,33%) e agosto de 2019 (5,88%), e nos meses de janeiro (6,66%), fevereiro (13,33%), março (10%), abril (3,33%) e maio (6,66%) de 2020. Ocorrendo em maior frequência no final do inverno (fevereiro 2020) e no início da primavera (março 2020) (Figura 32).

Os folículos masculinos em Estádio II (maturos) foram observados durante todo o ano, sendo encontrados em maior frequência no inverno, novembro e dezembro de 2019 (96,7% - para ambos os meses) e em menor frequência no início do outono, setembro de 2019 (66,7%) (Figura 32).

Os folículos masculinos em Estádio III (desovados) foram encontrados em todos os meses, exceto nos meses de janeiro e fevereiro de 2020, em que estavam maioritariamente em Estádio I (folículos imatuross). O mês de setembro apresentou a maior frequência de indivíduos desovados (33,3%) (Figura 32).

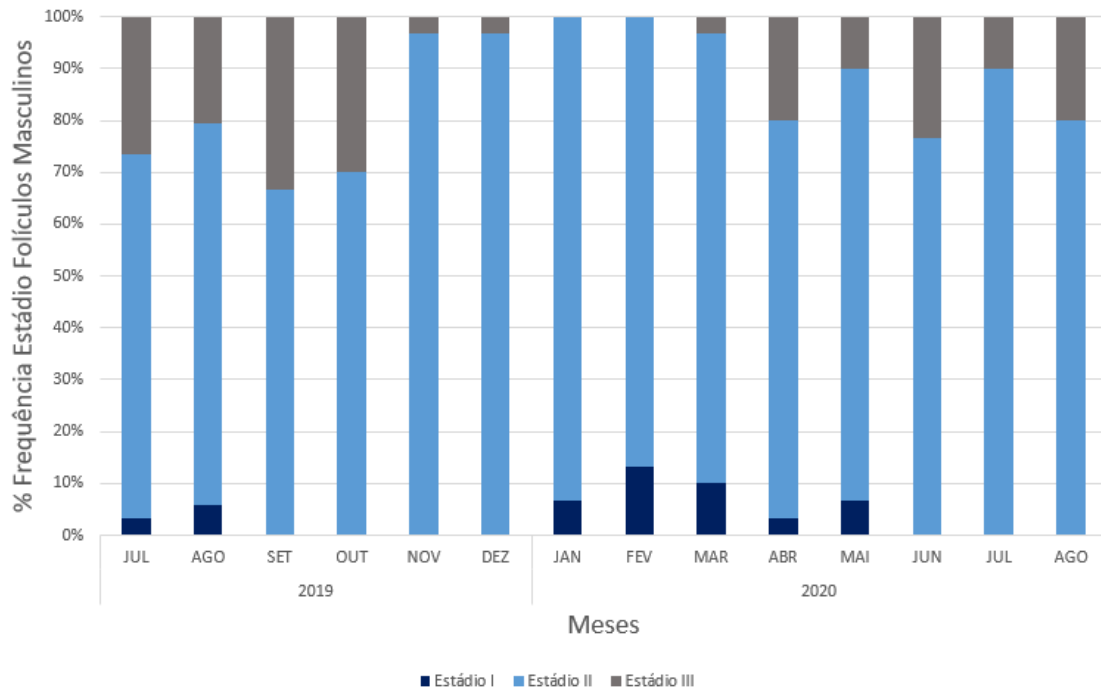


Figura 32. Frequência de cada estágio de desenvolvimento dos folículos masculinos de *Styela plicata*. Estádio I (imaturo); Estádio II (maturo) e Estádio III (desovado).

Foram contabilizados 104 indivíduos menores que 40 mm de comprimento durante o período amostral. Destes, 92 indivíduos possuíam gónadas masculinas e femininas desenvolvidas (Figura 33).

Estes indivíduos apresentavam oócitos classificados no Estádio I (pré-vitelogénese – 1 indivíduo) e no Estádio II (vitelogénese – 91 indivíduos). Não foram encontrados oócitos maduros (oócitos maiores que 150  $\mu\text{m}$ ) em indivíduos menores que 40 mm (Figura 34).

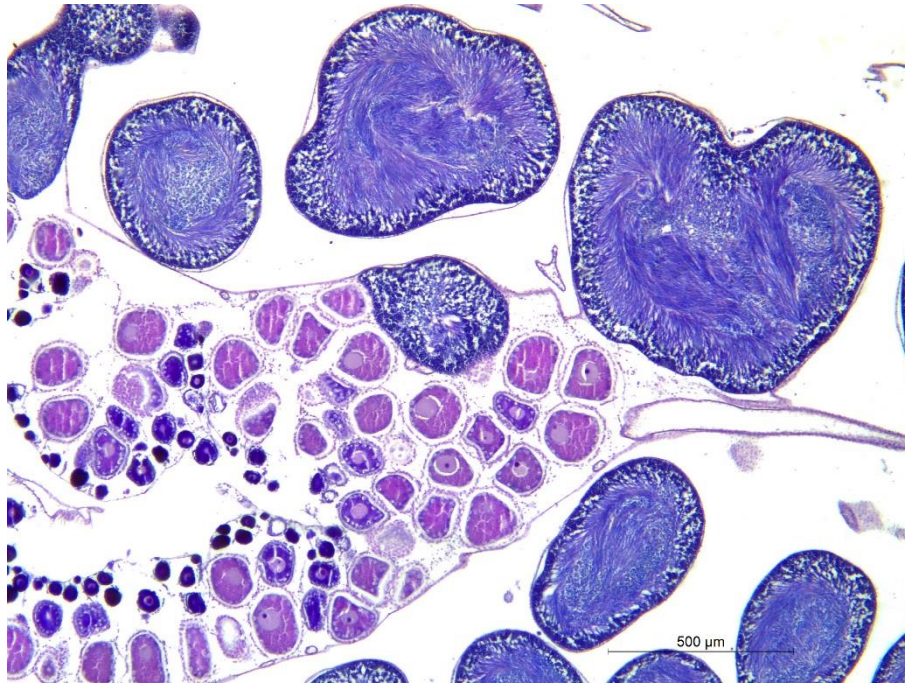


Figura 33. Indivíduo de *Styela plicata* medindo 27,97 mm de comprimento a apresentar oócitos em estágio I (pré-vitelogénese) e estágio II (vitelogénese).

O mês de março de 2020 apresentou 24 indivíduos menores que 40 mm, o maior número amostrado, destes, quatro indivíduos encontravam-se em estágio imaturo (ausência de gónadas); um indivíduo em estágio de pré-vitelogénese e 19 indivíduos em estágio de vitelogénese (Figura 34).

Nos meses de setembro de 2019 e julho 2020 não foram amostrados indivíduos menores que 40 mm (Figura 34).



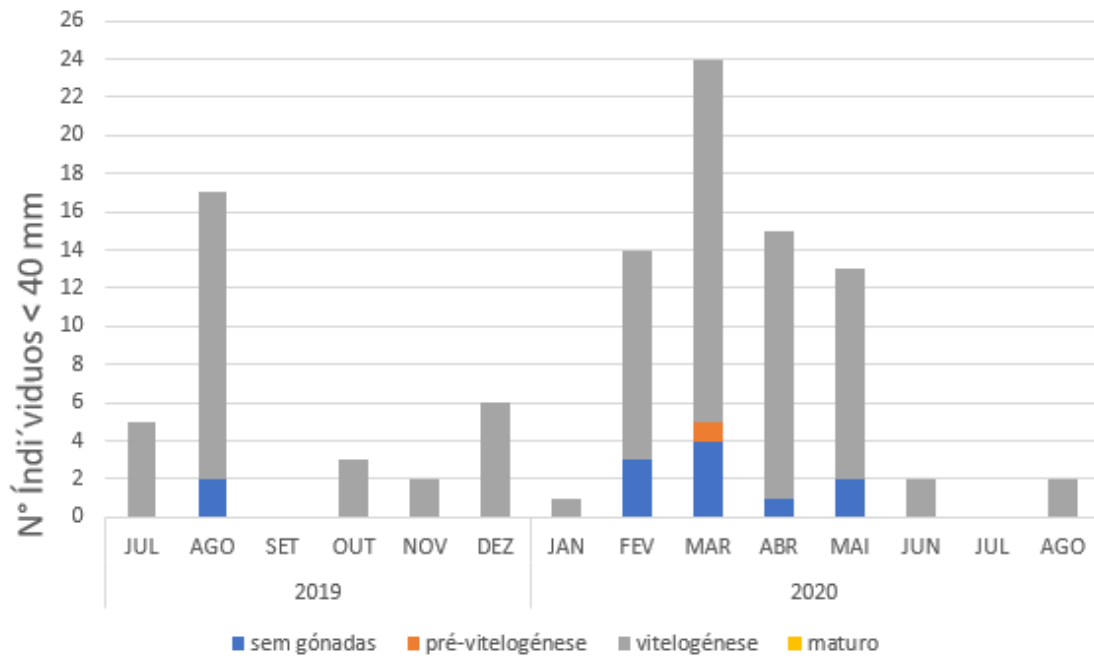


Figura 34. Estádio de desenvolvimento dos oócitos em indivíduos de *Styela plicata* que apresentaram comprimento menor que 40 mm. Total de 104 indivíduos menores que 40 mm, destes, 92 indivíduos possuíam gónadas masculinas e femininas desenvolvidas (1 indivíduo apresentou oócitos em estágio de previtelogénese e 91 indivíduos apresentaram oócitos em estágio de vitelogénese).

## 6. Discussão

A ascídia cosmopolita *Styela plicata* esteve presente durante todo o período amostral nas jangadas de cultivo do mexilhão *Mytillus edulis* na Lagoa de Albufeira. Os indivíduos coletados entre os meses de julho de 2019 a agosto de 2020 tiveram comprimento entre 20,1 mm e 81,34 mm e representam uma seleção dos maiores indivíduos encontrados. Esta seleção na amostragem procurou a análise dos indivíduos com mais do que 40 mm de comprimento, por ser o tamanho em que a espécie atinge a maturidade sexual (Yamaguchi, 1995). Desta forma, os indivíduos amostrados representam, na sua maioria, a população adulta de *S. plicata* da Lagoa de Albufeira.

A maior frequência de indivíduos abaixo de 40 mm ocorreu no mês de março de 2020, cuja média foi de 36,3 mm e apenas um indivíduo apresentou tamanho maior que 50 mm (56 mm) e o menor indivíduo apresentou 20,1 mm de comprimento. Esse resultado sugere que a fase de maior recrutamento, ou seja, a adição de novos indivíduos assentados à população, seja por nascimento e maturação ou por imigração, para a Lagoa de Albufeira, possa ter ocorrido no início do outono de 2019, já que nos períodos mais frios do ano são necessários aproximadamente 4 a 5 meses para que a espécie atinja o comprimento de 40 mm (Yamaguchi, 1975). No Mediterrâneo Ocidental, com base em observações dos indivíduos assentados em cordas recém-expostas, Pineda *et al.*, (2013) consideraram como recrutas aqueles indivíduos que tinham 15 mm de comprimento, que corresponde com a idade aproximada de um mês. Na Lagoa de Albufeira, os adultos (>40 mm) foram encontrados durante todo o ano assim como as classes de tamanhos maiores (>50 mm), a presença de juvenis e adultos durante todo o ano sugere o resultado da sobreposição de sucessivas gerações na população (Pineda *et al.*, 2013). Os padrões de assentamento de *S. plicata* foram determinados para populações no Japão (Yamaguchi, 1975), no Mediterrâneo Oriental (Sabbadin, 1957; Sciscioli *et al.*, 1978; Tursi e Matarrese, 1981) e no Mediterrâneo Ocidental (Pineda *et al.*, 2013). Esses estudos apontam para um assentamento prolongado durante o verão (junho-setembro, Sciscioli *et al.* 1978), um período de assentamento restrito no verão (agosto-setembro, Tursi & Matarrese 1981), um número variável de gerações por ano (Sabbadin 1957; Yamaguchi 1975) ou nenhum padrão sazonal claro, recrutas presentes o ano todo, embora especialmente abundantes após meados do verão e ausentes apenas no mês de maio (final da primavera) (Pineda *et al.*, 2013). Estas diferenças no padrão de recrutamento podem

ser devidas a vários fatores, incluindo temperatura, localização e a estrutura genética das populações investigadas (Yamaguchi, 1975; Pineda *et al.*, 2013).

Em relação às células germinativas da espécie, os oócitos e os folículos masculinos maduros estiveram presentes durante todo o ano, no entanto, o Índice Gonadossomático (GI) e o diâmetro médio dos oócitos atingiram valores máximos no verão (Figura 24 e 25, respetivamente). Um declínio no GI foi observado no final do verão e início do outono (setembro e outubro de 2019) (Figura 25), o que sugere o momento do principal evento de desova para *S. plicata* na Lagoa de Albufeira, coincidindo com o aparecimento e prevalência de gónadas com oócitos de tamanho adequado, prontos para a desova (19,3% dos oócitos maduros em setembro de 2019) (Figura 27). É a partir do início do outono em que é observada a diminuição do tamanho médio dos oócitos (setembro e outubro de 2019), o que sugere que o pico da desova já ocorreu (Wong *et al.*, 2011; Pineda *et al.*, 2013).

Somente o declínio no GI poderia não corresponder a eventos de desova (Pineda *et al.*, 2013), pois em algumas espécies de ascídias foi observada a inexistência de correlação entre GI e diâmetro do oócito (Bingham, 1997; Wong *et al.*, 2011) e a mobilização de reservas armazenadas nas gónadas em períodos de escassez pode ocorrer em ascídias (Bingham, 1997). No entanto, a coincidência de vários parâmetros (queda no GI, queda do diâmetro do oócito, queda em proporção de oócitos maduros e a correlação positiva entre GI e diâmetro dos oócitos, e maior proporção de folículos masculinos desovados), sugere que o principal evento de desova de *S. plicata* na Lagoa de Albufeira tenha ocorrido no final do verão e início do outono de 2019. Assim como na população de *S. plicata* da Lagoa de Albufeira, populações de *S. clava* estudadas em diversas localidades do globo, apresentaram o principal evento de desova nos meses de verão, estendendo-se, por vezes, até meados do outono (Kelly, 1974; Lützen e Sørensen, 1993; Lützen, 1999; Davidson *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2011). Esses resultados corroboram a hipótese de que o período de maior recrutamento para a espécie seja no final do verão e início do outono.

No entanto, não foi possível encontrar nenhum padrão reprodutivo sazonal claro para a população de *S. plicata* da Lagoa de Albufeira, pois os oócitos e os folículos masculinos maduros estiveram presentes durante todo o ano e a desova mostrou-se potencialmente contínua, mesmo que tenha sido mais intensa durante o verão. O mesmo foi encontrado para as populações de *S. plicata* no Mediterrâneo Ocidental, em que os gametas maduros estiveram presentes durante todo o ano e a desova mostrou-se

potencialmente contínua, embora tenha sido mais intensa na primavera (Pineda *et al.*, 2013). No Mediterrâneo Oriental, foi observado que, ao final do verão, quase todos os indivíduos de *S. plicata* já haviam desovado, de forma que a atividade reprodutiva diminuiu, assim como o diâmetro médio dos oócitos (Sciscioli *et al.*, 1978). Resultados semelhantes, picos de reprodução numa espécie que reproduz continuamente durante todo o ano, já foram descritos por outros autores em regiões temperadas (Yamaguchi, 1975; Bingham, 1997) e ciclo reprodutivos estendidos para ascídias NIS, também já foram relatados por outros autores (Bourque *et al.*, 2007; Shenkar & Loya, 2008; Wong *et al.*, 2011). Pineda *et al.* (2013) sugere que um período reprodutivo prolongado provavelmente confere uma vantagem competitiva a *S. plicata* em mares temperados, onde a maioria das espécies se reproduz sazonalmente, e pode promover introduções recorrentes, pois as larvas estão disponíveis para assentamento em vetores de transporte durante a maior parte do ano, conferindo à espécie potencial colonizador de novas áreas.

A temperatura da água da Lagoa de Albufeira e o tamanho médio dos oócitos de *S. plicata*, assim como a temperatura e o GI apresentaram correlação positiva. A temperatura mais baixa registrada para a Lagoa de Albufeira durante o período amostral foi de 12°C no mês de janeiro de 2020, e embora não tenha sido encontrados testículos em pós desova, indivíduos maduros e reprodutivamente ativos com oócitos grandes (média de tamanho de oócitos de 94,13 µm) estiveram presentes nos meses mais frios do ano. Sabbadin (1957) define a temperatura de 10°C como a temperatura mínima para que *S. plicata* possa se reproduzir e os limites de temperatura para desova de *S. plicata* no laboratório foram de 11 a 28 C° (West & Lambert, 1976). O resultado encontrado para a Lagoa de Albufeira é semelhante ao encontrado para populações do Mediterrâneo Ocidental, onde Pineda *et al.* (2013) afirmam que temperaturas abaixo de 10°C são raramente atingidas, mesmo na estação mais fria, e que a espécie *S. plicata* também é reprodutivamente ativa nos meses de inverno. O mesmo foi observado por Yamaguchi (1975), na baía de Tóquio, onde os indivíduos de *S. plicata* estavam maduros também no inverno, embora não desovassem durante os meses mais frios do ano, onde as temperaturas da água no inverno variaram de 13° a 17 °C, aproximadamente. Tem sido sugerido por diversos autores que a temperatura é o principal fator desencadeante da reprodução das ascídias (Millar, 1971; Turon, 1988; Lambert, 2005) e também dos ciclos reprodutivos de muitos invertebrados marinhos em mares temperados (Orton, 1920; Lambert, 2005).

Em termos de salinidade, a água da Lagoa de Albufeira apresentou valores mais elevada no mês de agosto de 2020 (36,1) e o valor mais baixo registrado ocorreu em

fevereiro de 2020 (33,3). Esta flutuação nos valores de salinidade da água da lagoa ao longo do ano está relacionada com o fecho intermitente da ligação com o mar durante os meses de inverno, período em que ocorre a entrada apenas de água doce, seja por chuva ou por rio, ocasionando a diminuição nos valores de salinidade (Pereira Coutinho *et al.*, 2012).

Os valores de maior salinidade coincidiram com os maiores diâmetros médio de oócitos e houve uma correlação positiva entre as duas variáveis. Não foram registados valores de salinidade abaixo de 33,3, desta forma, no que diz respeito à salinidade, a Lagoa de Albufeira apresenta condições ótimas para o desenvolvimento da *S. plicata*, pois resultados encontrados por Thiyagarajan & Qian (2003) demonstraram que o desenvolvimento embrionário de *S. plicata* é favorecido às salinidades entre 30 e 34, e as variações de salinidades presentes na Lagoa de Albufeira não representam um fator limitante para a reprodução e sobrevivência de *S. plicata*. A regulação osmótica desta ascídia foi demonstrada a amplas variações de salinidades, por exemplo, em estudos realizados com soluções hipossalinas (17,5), a sobrevivência de *S. plicata* não foi afetada, o mesmo ocorreu quando os espécimes foram submetidos a soluções hipersalinas (38,5) (Sims, 1984). Resultados similares foram encontrados para outras ascídias, a sobrevivência em *C. intestinalis* não foi afetada a salinidade de 39,9 (Dybern, 1967) e *Molgula manhattensis* sobreviveu a salinidade de 38,8 (Gaill & Lasserre, 1977), mostrando que os meios ligeiramente hipersalinos aparentemente não são uma barreira de distribuição nesses tunicados. Em outro estudo, em que os autores relacionaram a diversidade de tunicados em ambientes hipossalinos, foi observado que a diminuição da salinidade afetou negativamente os processos biológicos das espécies nativas, mas as NIS mostraram respostas neutras aos meios hipossalinos, o que confere vantagem às NIS em ambientes alterados (McKnight *et al.*, 2021).

Além disso, tem sido demonstrado que os adultos de *S. plicata* podem responder às mudanças da temperatura e da salinidade aumentando a produção de proteínas relacionadas com o stress. No estudo realizado por Pineda *et al.* (2012), ocorreu variação de 15 vezes nos níveis de expressão do gene hsp70, que esteve significativamente correlacionado à temperatura da água do mar (> 25°C) e às baixas salinidades (< 28), sugerindo consistente previsão de que um certo grau de resiliência a condições ambientais adversas facilitou a distribuição mundial desta espécie.

Em relação às frequências dos estádios dos oócitos e dos folículos masculinos em *S. plicata*, na Lagoa de Albufeira, foi observado que os oócitos maduros estiveram em

maior frequência durante o verão, com pico em julho de 2020 (24,6%) e em menor frequência no final do inverno, em março de 2020 (4,7%). Os folículos masculinos maduros estiveram mais frequentes nos meses de novembro e dezembro de 2019 (96,7% para ambos) e a frequência de indivíduos com testículos desovados foi maior em setembro de 2019 (33,4%) e outubro de 2019. Desta forma, é observado uma assincronicidade no desenvolvimento do tecido gamético masculino e feminino, indicando que para a maior parte do tempo, esta espécie não é capaz de autofecundação. Essa ligeira assincronicidade no desenvolvimento do tecido gamético masculino e feminino foi observado para a *S. clava* em populações do Canadá (Davidson *et al.*, 2005), Irlanda (Parker *et al.*, 1999) e Nova Zelândia (Wong *et al.*, 2011). E embora seja mais provável que, durante o período de desova, as populações tanto de *S. plicata* como a de *S. clava*, predominantemente, não se cruzem devido às incompatibilidades espermatozoides/óvulos, a assincronicidade pode estar relacionada a uma estratégia com a finalidade de reduzir a probabilidade de autofecundação fornecendo um bloqueio temporal (Wong *et al.*, 2011), pois em estudo realizado por Macclary *et al.*, 2008, foi sugerido que *S. clava* é parcialmente autofértil e ao sofrer stress (por exemplo, por perturbação mecânica, como sendo espremida ou abrasada por cascos de navios ou durante a remoção) poderia liberar gametas femininos e masculinos que poderiam se autofecundar e, assim, espalhar a população.

Em relação ao tamanho em que a espécie atinge a idade reprodutiva, apesar da literatura indicar o tamanho de 40 mm, nesse estudo foram encontrados indivíduos menores que 40 mm com oócitos em pré-vitelogénese e em vitelogénese. Esse dado pode revelar que *S. plicata*, por ser uma espécie oportunista invasora, está a atingir a maturidade sexual antes dos 40 mm como uma estratégia para a colonização de novos ambientes (Ricciardi, 2015).

A presença da população de *S. plicata* foi relatada pela primeira vez na Lagoa de Albufeira em 2017 (projeto ProtectInvad, 2018). O presente estudo confirmou a presença estabelecida da população de *S. plicata* na Lagoa de Albufeira, uma vez que os indivíduos analisados se encontram férteis o ano todo e assim apresentam reprodução contínua, pode-se concluir que o ambiente actual da lagoa oferece vantagens para *S. plicata*. A temperatura e a salinidade da lagoa não excedem os limites de tolerância para o estabelecimento e reprodução da espécie e a baixa hidrodinâmica da lagoa, própria de ambientes lênticos, favorece a sobrevivência e o sucesso no estabelecimento das larvas (Naranjo *et al.*, 1996). Estes fatores sugerem que *S. plicata* não encontra obstáculos naturais para a sua reprodução e estabelecimento continuados na Lagoa de Albufeira.

Desta forma, o cultivo de mexilhões na Lagoa de Albufeira encontra-se ameaçado e já foi constatado que a produtividade da cultura de mexilhões está a ser afetada pela presença das ascídias e outros bioincrustantes, como briozoários e crustáceos, que estão a aumentar as taxas de mortalidade dos mexilhões cultivados como constatado durante as amostragens do projeto ProtectInvad (Mar2020). O cultivo de mexilhões pode ser uma importante fonte nutricional e económica, com a vantagem de ser uma fonte sustentável (Duarte *et al.*, 2009), e proporcionar serviços ecossistémicos de grande valor para o ambiente e para a sociedade (van der Schatte Olivier *et al.*, 2020; Avdelas *et al.*, 2020). No entanto, em contraste com o aumento da produção aquícola de mexilhões em todo o mundo, a produção na União Europeia (UE) tem apresentado uma tendência decrescente nas últimas duas décadas (Avdelas *et al.*, 2020). A presença dos organismos incrustantes, como *S. plicata* e suas consequências para a miticultura, somado às alterações dos parâmetros físicos da água ocasionadas pelas mudanças climáticas, colocam os aquacultores em riscos crescentes concretos num futuro próximo (Avdelas *et al.*, 2020).

Algumas propostas para uma gestão adequada da aquacultura de mexilhões para reduzir o impacto dos organismos incrustantes incluem: a remoção temporária dos moluscos bivalves da profundidade favorável às larvas dos organismos incrustantes nos períodos de maior assentamento, o que permitiria que menos larvas colonizem a cultura e; durante o período de assentamento a utilização de placas chamarizes para promoverem o assentamento das larvas e reduzir a fixação nos bivalves cultivados e nos equipamentos de produção (Arakawa, 1990). Outro exemplo de gestão é a limpeza e manutenção das estruturas de fixação dos mexilhões logo após o período de maior assentamento de ascídias, uma técnica já utilizada por diversos aquacultores que facilita o manejo das ascídias (Carver *et al.*, 2003). Embora tenha havido recentes avanços no conhecimento da dinâmica das bioincrustações, para o qual este estudo pretende contribuir, há lacunas significativas na capacidade dos aquacultores de gerirem as ações necessárias para reduzir os impactos negativos da bioincrustação (Bannister *et al.*, 2019). Mesmo que o presente estudo tenha observado que a população de *S. plicata* presente na Lagoa de Albufeira apresenta maior atividade reprodutiva no verão e início do outono e que o período de maior assentamento das larvas possa ocorrer próximo aos meses que sucede o pico reprodutivo, sugere-se que haja mais estudos acerca da dinâmica dessa população, especialmente para identificar claramente a época de maior assentamento das larvas, para que possam ocorrer ações de mitigação das bioincrustações.

Para o controlo das infestações já estabelecidas vem sendo empregue o uso de ácido acético com sucesso nas aquaculturas de bivalves, no entanto, a prática requer conhecimento aprofundado das tolerâncias fisiológicas dos bioincrustantes e de cada espécie de bivalve envolvidos, dos desafios operacionais relacionados à infraestrutura, da escalabilidade e do controlo de qualidade (Cahill *et al.*, 2021).

Baseado nos resultados deste estudo, *S. plicata* está bem estabelecida e com potencial para a reprodução continuado ao longo do ano na Lagoa de Albufeira, é sugerido que sejam encontradas alternativas que possam, por exemplo, tornar as ascídias organismos rentáveis para os aquacultores locais, o que poderia ser a solução de maior sustentabilidade para as áreas já invadidas, se forem objecto de uma gestão correta para evitar uma dispersão não desejada da espécie. As ascídias removidas dos cultivos de mexilhão podem tornar-se uma fonte de renda se tiver, por exemplo, seu potencial nutracêuticos, mais explorado. Estudos realizados por Carletti *et al.* (2020) mostraram que os extratos etanólicos das ascídias apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória com potencial bioativo na prevenção de doenças crônicas que causam baixa densidade óssea. Outros estudos, realizados na Coreia por Park *et al.* (2006), demonstraram que *S. plicata* pode ser usada para a produção de pasta de peixe devido à sua qualidade e funcionalidade. Além dos usos citados, o extrato proveniente de preparação fresca de *S. plicata* apresenta propriedades antioxidantes e anticancerígenas, podendo ser fonte de valiosos materiais bioativos (Kim *et al.*, 2005).



## 7. Conclusão

Os resultados deste estudo permitiram conhecer o comportamento reprodutivo da espécie cosmopolita *S. plicata* na Lagoa de Albufeira, Portugal. Este estudo sugere que a *S. plicata* apresenta um período reprodutivo mais intenso no final do verão e início do outono, apesar da reprodução ter se mostrado contínua durante todo o período amostral. Um período reprodutivo prolongado permite a existência de vários lotes de larvas, garantindo um suprimento abundante de juvenis ao longo do ano, além disso, os parâmetros físicos da água da Lagoa de Albufeira, tais como temperatura e salinidade, são favoráveis à reprodução e o desenvolvimento de *S. plicata*, tornando o ambiente propício para o estabelecimento continuado da espécie na lagoa.

A presença de bioincrustantes na aquacultura marinha representa uma das principais barreiras para uma produção eficiente e sustentável (Bannister *et al.*, 2019; Cahill *et al.*, 2021) e o controlo de bioincrustações é um desafio amplamente estudado (Durr & Watson; 2010; Dunham & Marshall, 2012; Fitridge *et al.*, 2012; Bannister *et al.*, 2019; Cahill *et al.*, 2021) e para o qual ainda se procuram respostas e soluções.

## 8. Referências Bibliográficas

- Adams, C. M., Shumway, S. E., Whitlatch, R. B., & Getchis, T. (2011). Biofouling in Marine Molluscan Shellfish Aquaculture: A Survey Assessing the Business and Economic Implications of Mitigation. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(2), 242–252. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00460.x>
- Ahmed Ibrahim, G. (2018). Oogenesis of the carpet sea squirt *Didemnum vestitum* (Kott, 2004) (Ascidacea-Aplousobranchia) in the Arabian Gulf-Ultrastructural profile. *International Journal of Oceans and Oceanography*, 12(2), 173–190. Retrieved from <http://www.ripublication.com>
- Alleway, H. K., Gillies, C. L., Bishop, M. J., Gentry, R. R., Theuerkauf, S. J., & Jones, R. (2019). The Ecosystem Services of Marine Aquaculture: Valuing Benefits to People and Nature. *BioScience*, 69(1), 59–68. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy137>
- Arakawa, K.Y. (1990). Natural spat collecting in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Mar. Behav. Physiol.* 17: 95-128.
- Avdelas, L., Avdic-Mravljje, E., Borges Marques, A. C., Cano, S., Capelle, J. J., Carvalho, N., Asche, F. (2020). The decline of mussel aquaculture in the European Union: causes, economic impacts and opportunities. *Reviews in Aquaculture*, 91–118. <https://doi.org/10.1111/raq.12465>
- Bailey, J. (2016). Adventures in cross-disciplinary studies: grand strategy and fisheries management. *Mar. Policy*, 63 (2016), pp. 18-27, 10.1016/j.marpol.2015.09.013.
- Bannister, J., Sievers, M., Bush, F., & Bloecher, N. (2019). Biofouling in marine aquaculture: a review of recent research and developments. *Biofouling*, 35(6), 631–648. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1640214>
- Belmonte, G. (2017). Life cycle and life history diversity in marine invertebrates and the implication in community dynamics.
- Bingham, B. L. (1997). Light Cycles and Gametogenesis in Three Temperate Ascidian Species. *Invertebrate Biology*, 116(1), 61. <https://doi.org/10.2307/3226925>
- Bourque D, Davidson J, MacNair NG, Arsenault G, LeBlanc AR, Landry T, Miron G. (2007). Reproduction and early life history of an invasive ascidian *Styela clava* Herdman in Prince Edward Island, Canada. *J Exp Mar Biol Ecol* 342:78–84
- Cahill, P. L., Atalah, J., Cunningham, S., Day, A., Fletcher, L., South, P., Hopkins, G. (2021). Acetic acid immersion – A reactive pest treatment for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 533 (August 2020), 736173.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736173>

- Caicci, F., Zaniolo, G., Burighel, P., Degasperi, V., Gasparini, F. and Manni, L., (2010). Differentiation of papillae and rostral sensory neurons in the larva of the ascidian *Botryllus schlosseri* (Tunicata). *Journal of Comparative Neurology*, 518(4), pp.547-566.
- Callier, M. D., Byron, C. J., Bengtson, D. A., Cranford, P. J., Cross, S. F., Focken, U., McKindsey, C. W. (2018). Attraction and repulsion of mobile wild organisms to finfish and shellfish aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12208>
- Carletti, A., Cardoso, C., Juliao, D., Arteaga, J. L., Chainho, P., Dionísio, M. A., Gavaia, P. J. (2020). Biopotential of Sea Cucumbers (Echinodermata) and Tunicates (Chordata) from the Western Coast of Portugal for the Prevention and Treatment of Chronic Illnesses. *Proceedings*, 61(1), 13. <https://doi.org/10.3390/iecn2020-06994>
- Carlton, J.T., Ruiz, G.M., (2015). Anthropogenic vectors of marine and estuarine invasions: An overview framework. In: Canning-Clode, J. (Ed.), *Biological Invasions in Changing Ecosystems: Vectors, Ecological Impacts, Management and Predictions*. De Gruyter Open, Berlin, pp. 24–36. <http://dx.doi.org/10.1515/9783110438666-005>.
- Carver, C. E.; Chisholm, A; Mallet, A. L. (2003). Strategies to Mitigate the Impact of *Ciona intestinalis* (L.) Biofouling on Shellfish Production.
- Chainho, P., Fernandes, A., Amorim, A., Ávila, S. P., Canning-Clode, J., Castro, J. J., Costa, M. J. (2015). Non-indigenous species in Portuguese coastal areas, coastal lagoons, estuaries and islands. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 167, 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.06.019>
- Computer generated distribution maps for *Styela plicata* (pleated sea squirt), with modelled year 2050 native range map based on IPCC RCP8.5 emissions scenario. [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), version 10/2019 preliminary version. Accessed 22 Apr. 2020.
- Daigle, R. M., & Herbinger, C. M. (2009). Ecological interactions between the vase tunicate (*Ciona intestinalis*) and the farmed blue mussel (*Mytilus edulis*) in Nova Scotia, Canada. *Aquatic Invasions*, 4(1), 177–187. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.18>
- Davidson, J., Arsenault, G., MacNair, N., Landry, T., Bourque, D. (2005). Reproduction, epidemiology and control of the clubbed tunicate, *Styela clava*. In: Prince Edward Island waters. Aquaculture and Fisheries Research Initiative Report Number

043AR15.

- Davis, M.H., and Davis, M.E. (2004). New records of *Styela clava* (Herdman, 1882) (Tunicata, Ascidiacea) in Europe. Porcupine Marine Natural History Society Newsletter 14: 24-28.
- Denny, C.M. (2008). Development of a method to reduce the spread of the ascidian *Didemnum vexillum* with aquaculture transfers. ICES J Mar Sci 65:805–810.
- de Nys R., Horne, M. (2003). Antifouling solutions for the Australian pearling industry. Project No. 2003/206. Final Report to the Fisheries Research and Development Corporation. Townsville (Qld): James Cook University, School of Marine and Tropical Biology. 140 pp.
- de Nys R, Ison O. (2008). Biofouling. In: Southgate PC, Lucas J, editors. The pearl oyster. Oxford (UK): Elsevier. p. 527–553.
- DGRM (2020). Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa. Retrieved October 9, 2020, from [https://www.dgrm.mm.gov.pt/documents/20143/43770/Plano\\_Estrat%C3%A9gico\\_Aquicultura\\_2014\\_2020.pdf](https://www.dgrm.mm.gov.pt/documents/20143/43770/Plano_Estrat%C3%A9gico_Aquicultura_2014_2020.pdf)
- DGRM (2019). Plano para a aquicultura em águas de transição (PAqAT). Retrieved from <https://www.dgrm.mm.gov.pt/web/guest/plano-para-aquicultura-em-aguas-detransi>
- Dionísio, M. A. (2018). ProtectInvad iNaturalist. Retrieved March 1, 2021, from <https://www.inaturalist.org/projects/protectinvad?tab=about>
- Duarte, C.M., Holmer M, Olsen Y, Soto D, Marba N, Guiu J, Black KD, Karakassis I (2009) Will the oceans help feed humanity? Bioscience 59:967–976
- Dunham, A., Marshall, R.D. (2012). Using stocking density modifications and novel growth medium to control shell deformities and biofouling in suspended culture of bivalves. Aquaculture. 324:234–241.
- Durr, S., Watson, D.I. (2010). Biofouling and antifouling in aquaculture. In: Durr, S, Thomason, J.C, editors. Biofouling. West Sussex (UK): Wiley-Blackwell; p. 267–287.
- Dupont, L., Viard, F., David, P., Bishop, J.D.D. (2007). Combined effects of bottlenecks and selfing in populations of *Corella eumyota*, a recently introduced sea squirt in the English Channel. Divers Distrib 13:808–817
- Dybern, B.I. (1965). The life cycle of *Ciona intestinalis* (L.) f. *typica* in the relation to environmental temperature. Oikos 16:109–131

- EFSA (2014). Scientific opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury. EFSA J 12(7):80
- Epelbaum, A., Herborg, J.M., Therriault, T.W., Pearce, C.M. (2009). Temperature and salinity effects on growth, survival, reproduction, and potential distribution of two non-indigenous botryllid ascidians in British Columbia. J Exp Mar Biol Ecol 369:43–52
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Food and Agriculture Organization, Rome. 200 pp.
- FAO (2010). Fisheries Technical Paper No 511 Bivalve Depuration: Fundamental and Practical Aspects; FAO: Rome, Italy.
- FAO (2017). Part I of the Fishery and Aquaculture Country Profile. Fisheries and Aquaculture Department.
- FAO (2019). Retrieved June 15, 2019, from <http://www.fao.org/aquaculture/en/>
- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture.
- Fernández, E., Álvarez-Salgado, X.A., Beiras, R., Ovejero, A., Méndez, G. (2016). Coexistence of urban uses and shellfish production in an upwelling-driven, highly productive marine environment: The case of the Ría de Vigo (Galicia, Spain). Reg. Stud. Mar. Sci., 8, 362–370.
- Ferrario, J., Caronni, S., Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., 2017. Role of commercial harbours and recreational marinas in the spread of nonindigenous fouling species. Biofouling 33 (8), 651–660. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2017.1351958>
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & de Nys, R. (2012). Biofouling The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>
- Fletcher, L. M., Forrest, B. M., Atalah, J., & Bell, J. J. (2013). Reproductive seasonality of the invasive ascidian *Didemnum vexillum* in New Zealand and implications for shellfish aquaculture. Aquaculture Environment Interactions, 3(3), 197–211. <https://doi.org/10.3354/aei00063>
- Flimlin, G.E. and G.W. Mathis. (1993). Biological biofouling control in a field-based nursery for the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. World Aquaculture 24(4): 47-48.
- Gaber Ahmed Saad. (2008). Histological and Histochemical Studies of the Process of

- Deutoplasmogenesis (Vitellogenesis) in the Oocyte of *Styela plicata* (Lesuaer, 1823); *Styela partia* (Stimpson, 1852) and *Ciona intestinalis* (Linnaeus, 1767). Urochordata-Ascidiacea. Egyptian Journal of Aquatic Research, (December).
- Gaill, F. & P. Lasserre, (1977). Modifications osmotiques dans le sang et l'urine de l'ascidie *Molgula manhattensis* (Ascidiacea) adaptée a différentes salinités. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, Vol. 285, pp. 1343-1346.
- Grabowski, J.H., Brumbaugh, R.D., Conrad, R.F., Keeler, A.G., Opaluch, J.J., Peterson, C.H., Piehler, M.F., Powers, S.P., Smyth, A.R. (2012). Economic valuation of ecosystem services provided by oyster reefs. *BioScience* 62: 900–909.
- Holmes, N.J. (1976). Occurrence of the ascidian *Styela clava* Herdman in Hobson's Bay, Victoria: a new record from the southern hemisphere. *Proc. R. Soc. Vic.* 88: 115-116.
- Howey, R. (1998). Tunicates with Salad on the Side. *Micscape Magazine*. <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov98/rhtunic.html>
- Instituto Nacional de Estatística - Estatísticas da Pesca. Lisboa: INE, (2020). Disponível na www: <[url:https://www.ine.pt/xurl/pub/435690295](https://www.ine.pt/xurl/pub/435690295)>. ISSN 0377-225-X. ISBN 978-989-25-0540-4
- Jeffrey, A., McNeely. (2001). The Great Reshuffling-Human Dimensions of Invasive Alien Species. *World*.
- Karaiskou, A., Swalla, B. J., Sasakura, Y., & Chambon, J. P. (2015). Metamorphosis in solitary ascidians. *Genesis*, 53(1), 34–47. <https://doi.org/10.1002/dvg.22824>
- Kawamura, K., Tiozzo, S., Manni, L., Sunanaga, T., Burighel, P., & De Tomaso, A. W. (2011). Germline cell formation and gonad regeneration in solitary and colonial ascidians. *Developmental Dynamics*, 240(2), 299–308. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22542>
- Kelly, D.L. (1974) Aspects of the reproductive ecology of three solitary ascidians: *Ciona intestinalis* (L.), *Styela plicata* (Les.), and *Styela clava* (H.) from southern California. MA thesis, California State University, Fullerton
- Lambert, C.L., and Lambert, G. 2003. Persistence and differential distribution of nonindigenous ascidians in harbors of the Southern California Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259: 145-161.
- Lambert, G. (2001). A Global Overview of Ascidian Introductions and Their Possible Impact on the Endemic Fauna. In *The Biology of Ascidians* (pp. 249–257). Springer

- Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-66982-1\\_40](https://doi.org/10.1007/978-4-431-66982-1_40)
- Lambert, G. (2005). Ecology and natural history of the protochordates. *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z04-156>. January
- Lane A, Willemsen PR. (2004). Collaborative effort looks into biofouling. *Fish Farming Int*. 2004:34–35.
- Le Blanc, A.R., Davidson, J., Tremblay, R., McNiven, M., Landry, T. (2007). The effect of anti-fouling treatments for the clubbed tunicate on the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Aquaculture* 264:205–213.
- Locke, A., Carman, M., Lutz-Collins, V., Ramsay, A., Quijón, P. A., & Davidson, J. (2009). Invasive tunicates fouling mussel lines: evidence of their impact on native tunicates and other epifaunal invertebrates. *Aquatic Invasions*, 4. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.22>
- Lutzen, J. (1999). *Styela clava* Herdman (Urochordata, Ascidiacea) a successful immigrant to North West Europe: ecology, propagation and chronology of spread. *Helgol. Meeresunters*. 52: 383-391.
- Lutzen, J., Sørensen, V. (1993) Udbredelse, økologi og forplantning i Danmark af den indsleebte sopung, *Styela clava* Herdman. *Flora Fauna* 99:75–79 (in Danish, with an English summary)
- Mcclary, D., Phipps, C., & Golder Associates, S. H. (2008). Reproductive behaviour of the Clubbed Tunicate, *Styela clava*, in northern New Zealand waters Prepared for BNZ Post-clearance Directorate. Retrieved from <http://www.biosecurity.govt.nz/about-us/our-publications/technical-papers>
- Marques, H. L. D. A., Pereira, R. T. L., & Correa, B. C. (1998). Seasonal variation in growth and yield of the brown mussel *Perna perna* (L.) cultured in Ubatuba, Brazil. *Aquaculture*, 169(3–4), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00372-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00372-X)
- Martinez-Albores, A., Lopez-Santamarina, A., Rodriguez, J. A., Ibarra, I. S., Del Carmen Mondragón, A., Miranda, J. M., Cepeda, A. (2020). Complementary methods to improve the depuration of Bivalves: A review. *Foods*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods9020129>
- McKnight, E., Spake, R., Bates, A., Smale, D. A., & Rius, M. (2021). Non-native species outperform natives in coastal marine ecosystems subjected to warming and freshening events. *Global Ecology and Biogeography*. <https://doi.org/10.1111/geb.13318>
- Minchin, D., and Duggan, C.B. (1988). The distribution of the exotic ascidian, *Styela clava* Herdman, in Cork Harbour. *Ir. Nat. J.* 22(9): 388-393.

- Minton, M.S., Miller, A.W., Ruiz, G.M., 2015. Implications of ship type on delivery and management of ballast water. In: Canning-Clode, J. (Ed.), *Biological Invasions in Changing Ecosystems: Vectors, Ecological Impacts, Management and Predictions*. De Gruyter Open, pp. 343–364. <http://dx.doi.org/10.1515/9783110438666-021>.
- Millar, R. H. (1971). The biology of ascidians. *Advances in Marine Biology*, 9(C), 1–100. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60341-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60341-7)
- Miyauti, T. (1968). Studies on the effect of shell cleaning in pearl culture – III. The influence of fouling organisms upon the oxygen consumption in the Japanese pearl oysters. *Nihon*
- Naranjo, S., Carballo, J., & García-Gómez, J. (1996). Effects of environmental stress on ascidian populations in Algeciras Bay (southern Spain). Possible marine bioindicators? *Marine Ecology Progress Series*, 144, 119–131. <https://doi.org/10.3354/meps144119>
- Neves, F. M., Brandão Guerreiro Barbosa, L. C., & Da Cunha de Oliveira Santos Neves, J. M. (2019). A Biodiversidade na Era da Globalização: Mercado Internacional e Degradação Ambiental como Vetores de Simplificação da Biosfera. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, 8(1), 185–213. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2019v8i1.p185-213>
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, Â., & Pereira, M. J. (2013). Bivalve Harvesting and Production in Portugal: An Overview. *Journal of Shellfish Research*, 32(3), 911. <https://doi.org/10.2983/035.032.0334>
- Ogura, Y. & Sasakura, Y. (2013). Ascidians as excellent models for studying cellular events in the chordate body plan. *Biological Bulletin* 224: 227-236.
- Orton, J.H. (1920) Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. *J Mar Biol Assoc UK* 12:339–366
- Osman, R.W. and R.B. Whitlatch. (1995). Ecological factors controlling the successful invasion of three species of ascidians into marine subtidal habitats of New England. In Balcom, N.(ed) *Proceedings of the Northeast Conference on non-indigenous aquatic and nuisance species*. Connecticut Seagrass Coll. Prog. Publ. CT-SG-95-04. pp.49-60.
- Osman, R.W. and R.B. Whitlatch. (2004). The control of the development of a marine benthic community by predation on recruits. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311: 117-145.
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, Â., & Pereira, M. J. (2013). Bivalve Harvesting and Production in Portugal: An Overview. *Journal of Shellfish Research*, 32(3), 911.



<https://doi.org/10.2983/035.032.0334>

- Ordóñez, V., Pascual, M., Fernández-Tejedor, M., Pineda, M. C., Tagliapietra, D., & Turon, X. (2015). Ongoing expansion of the worldwide invader *Didemnum vexillum* (Ascidiacea) in the Mediterranean Sea: high plasticity of its biological cycle promotes establishment in warm waters. *Biological Invasions*. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0861-z>
- Panagiotou, M., Antoniadou, C., Krestenitis, Y., Chintiroglou, C. (2007). Stock assessment of the dominant ascidians: *Microcosms savignyi*, *Styela plicata* and *Phallusia mammillata*, in Thessaloniki bay (Thermaikos Gulf). *Fresen Environ Bull* 16:1012–1019
- Parker, L.E., Culloty, S., O’Riordan, R.M., Kelleher, R., Steele, S., Van der Velde, G. (1999). Preliminary study on the gonad development of the exotic ascidian *Styela clava* in Cork Harbour. *J Mar Biol Assoc UK* 79:1141–1142
- Pereira Coutinho, M.T., (2012). A phytoplankton tool for water quality assessment in semi-enclosed coastal lagoons: Open vs closed regimes, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, doi:10.1016/j.ecss.2012.04.007
- Perera, M., Ballesteros, M., & Turon, X. (1990). Estudio de los organismos epibiontes en un culvito de bivalvos marinos del delta del Ebro. *Cahiers de Biologie Marine*, 31(3), 385–399.
- Perissi, I., Bardi, U., El Asmar, T., & Lavacchi, A. (2017). Dynamic patterns of overexploitation in fisheries. *Ecological Modelling*, 359, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.06.009>
- Pineda, M.C., Lopez-Legentil, S., Turon, X. (2011) The Whereabouts of an Ancient Wanderer: Global Phylogeography of the Solitary Ascidian *Styela plicata*. *PLoS ONE* 6(9): e25495. doi:10.1371/journal.pone.0025495
- Pineda, M. Carmen, López-Legentil, S., & Turon, X. (2013). Year-round reproduction in a seasonal sea: Biological cycle of the introduced ascidian *Styela plicata* in the Western Mediterranean. *Marine Biology*, 160(1), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2082-7>
- Pineda, Mari Carmen, Turon, X., & López-Legentil, S. (2012). Stress levels over time in the introduced ascidian *Styela plicata*: The effects of temperature and salinity variations on hsp70 gene expression. *Cell Stress and Chaperones*, 17(4), 435–444. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0321-y>

- Piola, R.F., Dunmore, R.A., Forrest, B.M. (2010). Assessing the efficacy of spray-delivered 'eco-friendly' chemicals for the control and eradication of marine fouling pests. *Biofouling* 26:187–203.
- REA (2019). Portal do estado do ambiente. <https://rea.apambiente.pt/content/produ%C3%A7%C3%A3o-em-aquicultura> (consultado a 27 de setembro de 2021).
- Renault, T. (1996). Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Revue Scientifique et Technique Office International Epizooties*, 15(2), 551–561. <https://doi.org/10.20506/rst.15.2.941>
- Reilly, C. (1998) Selenium: a new entrant into the functional food arena. *Trends Food Sci Technol* 9:114–118
- Ricciardi, A. (2015). Ecology of Invasive Alien Invertebrates. Chapter 5: Ecology and General Biology, 83–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00005-X>
- Rocha, R. M., Kremer, L. P., Baptista, M. S., & Metri, R. (2009). Bivalve cultures provide habitat for exotic tunicates in Southern Brazil. *Aquatic Invasions*, 4(1), 195–205. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.20>
- Rodolfo, C., de Barros, R. M., da R. and M. R. P. (2009). Human-mediated global dispersion of *Styela plicata* (Tunicata, Ascidiacea). *Aquatic Invasions*, Volume 4,(1: 45-57). <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.4>
- Sá, F. S. de, Nalesso, R. C., & Paresque, K. (2007). Fouling organisms on *Perna perna* mussels: is it worth removing them? *Brazilian Journal of Oceanography*, 55(2), 155–161. <https://doi.org/10.1590/s1679-87592007000200008>
- Sabbadin, A. (1957). Il ciclo biologico di *Ciona intestinalis* (L.), *Molgula manhattensis* (de Kay) e *Styela plicata* (Lesueur) nella laguna veneta. *Arch Oceanog Limnol* XI:1–28
- Satoh, N. (1994). *Developmental Biology of Ascidiaceans*. New York: Cambridge University Press.
- Science Advice for Policy by European Academies (SAPEA) (2017). *Food From the Oceans: How Can More Food and Biomass be Obtained From the Oceans in a Way That Does not Deprive Future Generations of Their Benefits?*. SAPEA, Berlin.
- Sciscioli, M., Lepore, E., & Tursi, A. (1978). Relazione fra insediamento e riproduzione di *Styela plicata* (Les.)(Tunicata). *Memorie Di Biologia Marina e Di Oceanografia*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris->

- Shenkar N, Loya Y. (2008). The solitary ascidian *Herdmania momus*: native (Red Sea) versus non-indigenous (Mediterranean) populations. *Biol Invasions* 10:1431–1439
- Sievers, M., Fitridge, I., Bui, S., Dempster, T. (2017). To treat or not to treat: a quantitative review of the effect of biofouling and control methods in shellfish aquaculture to evaluate the necessity of removal. *Biofouling*. 33:755–767.
- Sims, L. L. (1984). Osmoregulatory capabilities of three macrosympatric stolidobranch ascidians, *Styela clava* (Herdman), *S. plicata* (Lesueur), and *S. montereyensis* (Dall). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 82(2–3), 117–129. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90098-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90098-4)
- Smaal, A. C., Ferreira, J. G., Grant, J., Petersen, J. K., & Strand, Ø. (2018). Goods and services of marine bivalves. *Goods and Services of Marine Bivalves*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9>
- Sun-Min Park, Hye-Kyung, S. C. L. (2006). Preparation and Quality Properties of Fish Paste Containing *Styela plicata*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.9.1256>
- Svane, I.; Young, C.M. (1989). The ecology and behaviour of ascidian larvae. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 27: 45-90In: *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Aberdeen University Press/Allen & Unwin: London. ISSN 0078-3218; e-ISSN 2154-9125
- Therriault, T.W., Herborg, L.M. (2008). Predicting the potential distribution of the vase tunicate *Ciona intestinalis* in Canadian waters: informing a risk assessment. *ICES J Mar Sci* 65:788–794
- Thiyagarajan, V., & Qian, P. Y. (2003). Effect of temperature, salinity and delayed attachment on development of the solitary ascidian *Styela plicata* (Lesueur). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 290(1), 133–146. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00071-6)
- Tucker, G. H. (1942). The histology of the gonads and development of the egg envelopes of an ascidian (*Styela plicata* Lesueur). *Journal of Morphology*, 70(1), 81–113. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050700106>
- Tursi, A., Matarrese, A. (1981). Phenomena of settling in *Styela plicata* (Les.) (Tunicata). *Mem Biol Mar Oceanogr* 11:117–130

- Valentine, P.C., Carman, M.R., Blackwood, D.S., Heffron, E.J. (2007). Ecological observations on the colonial ascidian *Didemnum sp.* in a new England tide pool habitat. *J Exp Mar Biol Ecol* 32:109–121
- van der Schatte Olivier, A., Jones, L., Vay, L. Le, Christie, M., Wilson, J., & Malham, S. K. (2020). A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 3–25. <https://doi.org/10.1111/raq.12301>
- Villa, L. A., & Patricolo, E. (2000). The Follicle Cells of *Styela Plicata* (Asciacea, Tunicata): A Sem Study. *Zoological Science*, 17(8), 1115–1121. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.1115>
- West, A. B., & Lambert, C. C. (1976). Control of spawning in the tunicate *Styela plicata* by variations in a natural light regime. *Journal of Experimental Zoology*, 195(2), 263–270. <https://doi.org/10.1002/jez.1401950211>
- Wilcove, D. S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., & Losos, E. (1998). Quantifying Threats to Imperiled Species in the United States. *BioScience* (Vol. 48).
- Wong, N.A., McClary, D., Sewell, M.A. (2011). The reproductive ecology of the invasive ascidian, *Styela clava*, in Auckland Harbour, New Zealand. *Mar Biol* 158:2775–2785
- Yamaguchi, M. (1975). Growth and Reproductive Cycles of the Marine Fouling Ascidiaceans *Ciona intestinalis*, *Styela plicata*, *Botrylloides violaceus*, and *Leptoclinum mitsukurii* at Aburatsubo-Moroiso Inlet (Central Japan). *Ymrine Biology* (Vol. 29). Springer-Verlag.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis*. 5th edn. Practice Hall, New Jersey, 226-244.
- Zhan, A., Briski, E., Bock, D. G., Ghabooli, S., & MacIsaac, H. J. (2015). Ascidiaceans as models for studying invasion success. *Marine Biology*, 162(12), 2449–2470. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2734-5>

## 9. Anexos

### Anexo I

#### Processamento de Tecidos:

- Álcool 80% (2h)
- Álcool 96% (2h)
- Álcool 99% (1h)
- Álcool 99% (1h)
- Álcool 99% (1h)
- Álcool 99% + Xilol (1:1) (2h)
- Xilol (1h)
- Xilol (1h)
- Xilol + Parafina (1/4:1) (3h)
- Parafina (4h)

### Anexo II

#### Coloração – Procedimento Hematoxilina-Eosina e Montagem das Lâminas:

##### 1- Desparafinação e Re-hidratação

- Xilol (10 minutos)
- Xilol (10 minutos)
- Álcool a 100% (5 minutos)
- Álcool a 100% (5 minutos)
- Álcool a 85% (5 minutos)
- Álcool a 70% (5 minutos)
- Álcool a 50% (5 minutos)
- Água destilada (5 minutos)
- Hematoxilina de Harris (5 minutos)
- Água da torneira corrente baixo fluxo (3 minutos)
- Eosina 1% (3 minutos)
- Água da torneira corrente baixo fluxo (3 minutos)

##### 2- Desidratação II

- Álcool a 70% (1 minuto)
- Álcool a 85% (1 minuto)
- Álcool a 100% (1 minuto)
- Álcool a 100% (1 minuto)
- Xilol (5 minutos)

### 3- Montagem das lâminas com albumina e lamela