

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

**Mortalidade de ovos de sardinha e carapau por parasitismo,
impacto na sobrevivência das fases iniciais de vida e
implicações para a gestão destes recursos**

Daniela Patrícia Gonçalves Carriço

Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental

Relatório de Estágio orientado por:
José Lino Costa
Maria Manuel Angélico

2022

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor José Lino Costa e Doutora Maria Manuel Angélico pela disponibilidade e apoio constante ao longo de todo este processo que é desenvolver e escrever uma dissertação de mestrado, por todas os auxílios quando me encontrava meio perdida e pela prontidão sempre demonstrada.

À Doutora Isabel Meneses por toda a disponibilidade para ajudar, pelos materiais fornecidos e pelo conhecimento passado, que foi de extrema importância para este estudo.

À Doutora Ana Veríssimo e ao CIBIO, pela oportunidade de poder desenvolver uma parte do meu trabalho com eles, pela ajuda prestada em assuntos que fugiam da minha área de conhecimento e pela vontade de me apoiar sempre demonstrada.

Ao João Paulo Medeiros, pois foi uma ajuda indispensável para os métodos estatísticos apresentados neste trabalho. Pela prestabilidade e paciência, apesar de sobrecarregado, o meu muito obrigada.

À Elisabete e à Lurdes pelo excelente ambiente de trabalho no laboratório do IPMA e por toda a ajuda completamente imprescindível ao longo de todo o ano de desenvolvimento deste trabalho, por tudo o que me ensinaram e por todas as palavras de apoio, sem nunca me deixarem ir abaixo.

Ao IPMA, pela oportunidade de poder realizar o meu estágio nas suas instalações e fazer parte do projeto SARDINHA2020.

Ao Miguel, pelo suporte emocional e por todas as vezes que me animou quando o trabalho mostrava adversidades.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todo o meu percurso académico, sem nunca me pressionarem, pois sem eles não seria possível ter chegado onde já cheguei, e onde ainda chegarei.

Resumo

A sardinha (*Sardina pilchardus*) e o carapau (*Trachurus trachurus*) são duas espécies com uma enorme importância ao nível das cadeias tróficas marinhas e com um elevado valor comercial, apresentando uma peculiar importância na Península Ibérica, onde fazem parte da alimentação tradicional portuguesa. As populações de sardinha e carapau apresentam flutuações nos seus mananciais, não sendo a origem destas totalmente conhecida. Uma das causas conhecidas para a mortalidade na fase inicial de vida (ovo) é o parasitismo por *Ichthyodinium chabelardi*, um endoparasita de ovos de peixes pelágicos, como a sardinha e o carapau, que acaba, em todos os casos conhecidos, por levar o seu hospedeiro à morte.

Este trabalho teve dois objetivos principais: (i) estudar a prevalência da infeção por *Ichthyodinium chabelardi* em ovos de sardinha e carapau; (ii) analisar a distribuição espacial dos ovos infetados na área de estudo (costa sul e oeste das águas Ibéricas atlânticas), tendo em conta determinados fatores ambientais. Desta forma, procedeu-se à análise de amostras de ictioplâncton, de 10 campanhas (em 7 destas foram analisados ovos de sardinha e em 5 de carapau), classificando os ovos por estádios de desenvolvimento e níveis de infeção. Um objetivo complementar considerou a análise do possível mecanismo de infeção dos ovos pelo parasita. Para este fim, foi explorada a hipótese de infeção na fase adulta (antes da emissão dos oócitos) e desenvolvidos protocolos de análise molecular para a deteção do parasita em gónadas de sardinha.

Os resultados mostraram que a percentagem de ovos infetados pelo parasita (prevalência) nos anos analisados variou entre 0,80% e 4,32% nos ovos de sardinha e entre 0,82% e 10,97% nos ovos de carapau e que a percentagem de estações com ovos parasitados (PEOP) variou entre 2,53% e 15,32% no caso dos ovos de sardinha e entre 2,00% e 12,59% no caso dos ovos de carapau. Foi possível identificar a profundidade como um possível fator ambiental responsável para estas flutuações, bem como a localização geográfica (costa ocidental vs costa sul) e a temperatura (esta última apenas para a sardinha) através de análises GLM efetuadas, em que se tomaram determinados fatores ambientais como variáveis independentes e o número de ovos parasitados como variável dependente.

Quando se comparou a mortalidade total dos ovos de sardinha com a prevalência de infeção nos mesmos anos, foi possível verificar que os anos com maior percentagem de mortalidade total foram também os anos com maior prevalência de infeção pelo parasita.

Os resultados relativos à análise molecular, que indicaram a presença de fragmentos de ADN de *Ichthyodinium chabelardi* nas gónadas de sardinha, parecem indicar que parte do ciclo de vida do parasita ocorre na fase adulta do hospedeiro, pelo que os oócitos, quando expelidos pelas fêmeas, poderão já estar contaminados pelo parasita em questão, carecendo, no entanto, esta informação de confirmação pela sequenciação dos fragmentos de ADN que se pensam ser do parasita.

Torna-se evidente, assim, a importância de conhecer melhor o ciclo de vida de *Ichthyodinium chabelardi* e de aprofundar a identificação dos fatores ambientais em que este mais prolifera, de modo que se consiga fazer uma gestão apropriada das populações das espécies-alvo deste trabalho, que são um recurso de extrema importância económica para a área em estudo, de forma a garantir a sustentabilidade das mesmas.

Palavras-chave: parasitismo; *Ichthyodinium chabelardi*, prevalência, ovos de peixe, *Sardina pilchardus*, *Trachurus trachurus*

Abstract

Sardine (*Sardina pilchardus*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) are two species that present an enormous importance at the level of marine trophic chains and with an elevated commercial value, presenting a peculiar importance in the Iberian Peninsula, where they are part of the Portuguese traditional diet. The sardine and horse mackerel populations exhibit fluctuations on its stocks, however, the origin of these isn't totally known. One of the known causes for the mortality in the early life phase (egg), is the parasitism by *Ichthyodinium chabelardi*, an endoparasite of pelagic fish eggs, where the sardine and horse mackerel are included, which ends up, in all known cases, leading to its host's death.

This work had two main objectives: (i) study the prevalence of infection by *Ichthyodinium chabelardi* in sardine and horse mackerel eggs; (ii) to analyse the special distribution of the infected eggs in the study area (south and west coast of Atlantic Iberian waters), in consideration of some ambiental factors. Thus, it was proceeded the analysis of ichthyoplankton samples of 10 campaigns (in 7 of these were analyzed sardine eggs and in 5 mackerel eggs), and it was made the classification of the eggs by development stage and infection level. An additional objective considered the analysis of the possible mechanism of infection of the eggs by the parasite. For this purpose, it was explored the hypothesis of infection in the adult phase (before the oocytes emission) and developed molecular analysis protocols for the detection of the parasite in sardine gonads.

The results showed that the percentage of eggs infected by the parasite (prevalence) in the analysed years varied between 0,80% and 4,32% in sardine eggs and between 0,82% and 10,97% in horse mackerel eggs and that the percentage of stations with parasitized eggs (PEOP) varied between 2,53% and 15,32% in the case of sardine eggs and between 2,00% and 12,59% in the case of horse mackerel eggs. It was possible to identify the depth as a possible ambiental factor responsible for these fluctuations, as well as the geographical location (west coast vs south coast) and the temperature (the last one only for sardine) through effected GLM analyses, in which certain environmental factors were taken as independent variables and the number of parasitized eggs as the dependent variable.

When the total mortality of sardine eggs was compared with the prevalence of infection in the same years, it was possible to verify that the years with the highest percentage of total mortality were also the years with the highest prevalence of infection by the parasite.

The results relating to molecular analysis, that indicated the presence of *Ichthyodinium chabelardi* DNA fragments in the sardine gonads, seems to indicate that part of the life cycle of the parasite takes place in the adult stage of the host, and that the oocytes, when expelled by the females, may already be contaminated by the parasite, lacking, however, this information of confirmation by the sequencing of the DNA fragments thought to be from the parasite.

Therefore, it becomes evident the importance of the better understanding of *Ichthyodinium chabelardi* life cycle and of deepen the identification of the environmental factors where it proliferates the most, in order to properly manage the populations of the target species of this work, which are an extremely important economical resource for the area under study, to ensure their sustainability.

Keywords: parasitism, *Ichthyodinium chabelardi*, prevalence, fish eggs, *Sardina pilchardus*, *Trachurus trachurus*

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2 Biologia e distribuição da sardinha e do carapau	2
1.2.1 Sardinha.....	2
1.2.2 Carapau.....	3
1.2.3 Distribuição de sardinha e de carapau	3
1.2.3.1 Sardinha.....	3
1.2.3.2 Carapau.....	3
1.3 Estado dos mananciais de sardinha e carapau	4
1.3.1 Sardinha.....	4
1.3.2 Carapau.....	4
1.4 O parasita <i>Ichthyodinium chabelardi</i>	6
1.4.1 Biologia e particularidades	6
1.4.2 Ciclo de vida do parasita	6
1.4.3 Mecanismo de infeção do parasita	7
1.5 Objetivos do estudo.....	8
2. Métodos	9
2.1 Caracterização da área de estudo.....	9
2.1.1 Divisão da área de estudo para análise	9
2.2 Recolha de amostras no mar.....	12
2.2.1 Campanhas dirigidas a sardinha, PNAB:PT-DEPM-PIL	14
2.2.2 Campanhas dirigidas a carapau, PNAB:PT-DEPM-HOM.....	16
2.3 Preparação e análise de amostras em laboratório	16
2.4 Análises moleculares em gónadas de sardinha.....	17
2.4.1 Recolha, armazenamento e preparação das gónadas	18
2.4.2 Extração de ADN em gónadas	18
2.4.3 PCR e eletroforese do ADN extraído	18
2.5 Análise de dados.....	19
2.5.1 Ovos infetados na área de estudo	19
2.5.1.1 Prevalência e Percentagem de Estações com Ovos Parasitados (PEOP) pelo parasita nos ovos de carapau e sardinha.....	19

2.5.1.2 Distribuição de ovos infetados na área de estudo	19
2.5.2 Comparação da prevalência e Percentagem de Estações com Ovos Parasitados (PEOP) ao longo dos anos para sardinha e carapau	20
2.5.3 Relação entre a distribuição espacial do parasita e fatores ambientais	20
2.5.4 Detecção do parasita em gónadas de sardinha	21
3. Resultados	22
3.1 O parasita na área de estudo	22
3.1.1 Prevalência de ovos parasitados e percentagem de estações com ovos parasitados (PEOP)	24
3.1.1.1 Sardinha.....	24
3.1.1.2 Carapau.....	25
3.1.2 Análise da Prevalência e PEOP	25
3.1.2.1 Sardinha.....	25
3.1.2.2 Carapau.....	27
3.1.2.3 Seleção de hospedeiro por <i>Ichthyodinium chabelardi</i>	28
3.1.3 Distribuição dos ovos parasitados na área de estudo.....	28
3.1.3.1 Sardinha.....	28
3.1.3.2 Carapau.....	28
3.1.4 Prevalência dos ovos parasitados em três subdivisões da área de estudo.....	34
3.2 Síntese dos valores dos fatores ambientais selecionados	37
3.3 Relação entre a distribuição espacial do parasita e fatores ambientais	43
3.4 Relação entre a prevalência de infeção e a mortalidade de ovos estimada nas análises do método DEPM.....	45
3.5 Análise molecular para deteção de <i>Ichthyodinium chabelardi</i> em gónadas de sardinha.....	46
4. Discussão	48
5. Considerações Finais	52
6. Referências Bibliográficas	54
7. Anexos	58
Anexo I- Descrição e fotografia da classificação em estádios de desenvolvimento dos ovos de sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>).....	58
Anexo II- Descrição e fotografias da classificação em estádios de desenvolvimento dos ovos de carapau (<i>Trachurus trachurus</i>).....	62
Anexo III- Gráficos resumos de abundâncias de ovos parasitados e não parasitados, nos anos em estudo, nas duas espécies analisadas.	64
Anexo IV- Síntese dos valores fatores ambientais selecionados (profundidade, temperatura e salinidade) em todas as estações de amostragem, por espécie e estrato, em todos os anos de estudo.	68

Anexo V – Informações dos indivíduos e gónadas de sardinha utilizados para análises moleculares para deteção de <i>Ichthyodinium chabelardi</i>	71
Anexo VI – Protocolo de extração de ADN EasySpin.	74
Anexo VII – Condições e programa de temperaturas para os PCR's de ampliação de ADN extraído das gónadas de sardinha.	75

Lista de figuras

Figura 1. 1- Distribuição de <i>Sardina pilchardus</i>	4
Figura 1. 2- Distribuição de <i>Trachurus trachurus</i> ..	4
Figura 1. 3- Resumo da avaliação dos mananciais de sardinha.	5
Figura 1. 4- Resumo da avaliação dos mananciais de carapau.....	5
Figura 1. 5- Ovos de sardinha num estágio primário (a) e num estágio avançado (b) de infecção por <i>Ichthyodinium chabelardi</i>	6
Figura 1. 6- Esquema do desenvolvimento de <i>I. chabelardi</i> baseado na observação de ovos de sarda (Scomber scombrus) parasitados.....	7
Figura 2. 1- Mapa da costa ocidental da Península Ibérica (área do presente estudo).....	10
Figura 2. 2- Distribuição de temperatura (esquerda) e salinidade(direita) superficiais obtidas através do termosalinómetro de registo contínuo, no ano de 2019, entre 25 de janeiro e 25 fevereiro.....	11
Figura 2. 3- Representação esquemática do MPDO (Método Diário de Produção de Ovos)..	14
Figura 2. 4- Rede CalVET, utilizada para recolha de plâncton, e registo de temperatura, salinidade e fluorescência (clorofila) nas campanhas dirigidas a MPDO	15
Figura 2. 5- Descrição dos níveis de infecção do parasita <i>Ichthyodinium chabelardi</i>	17
Figura 3. 1- Distribuição do parasita pelos 11 estádios de desenvolvimento dos ovos de sardinha e por níveis de parasitação (1 ao 4) em todos os anos analisados, conjuntamente.....	22
Figura 3. 2- Distribuição do parasita pelos 11 estádios de desenvolvimento dos ovos de carapau e por níveis de parasitação (1 ao 4) em todos os anos analisados, conjuntamente.....	23
Figura 3. 3- Número de amostras de cada ano de campanha analisada - sardinha.....	23
Figura 3. 4- Número de amostras por cada ano de campanha analisada - carapau	23
Figura 3. 5- Número de ovos de sardinha analisados por ano de campanha.....	24
Figura 3. 6- Número de ovos de carapau analisados por ano de campanha	24
Figura 3. 7- Prevalência (nº de ovos parasitados/nº de ovos total) e PEOP (nº de estações com ovos parasitados/nº de estações total) para a sardinha nos anos analisados.....	24
Figura 3. 8- Prevalência (nº de ovos parasitados/nº de ovos total) e PEOP (nº de estações com ovos parasitados/nº de estações total) para o carapau nos anos analisados.	25
Figura 3. 9- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2007	29
Figura 3. 10- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2013	29
Figura 3. 11- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2014	29
Figura 3. 12- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2016	30
Figura 3. 13- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2017	30
Figura 3. 14- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2019	30
Figura 3. 15- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2020	31

Figura 3. 16- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2002	32
Figura 3. 17- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2004	32
Figura 3. 18- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2005	32
Figura 3. 19- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2007	33
Figura 3. 20- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por <i>Ichthyodinium chabelardi</i> (a cinzento) durante a campanha de 2019	33
Figura 3. 21- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2007.....	34
Figura 3. 22- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2013.....	34
Figura 3. 23- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2014.....	35
Figura 3. 24- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2016	35
Figura 3. 25- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2017.....	35
Figura 3. 26- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha - 2019.	35
Figura 3. 27- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha- 2020.	35
Figura 3. 28- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2002.	35
Figura 3. 29- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2004.	36
Figura 3. 30- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2005.	36
Figura 3. 31- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2007.	36
Figura 3. 32- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2019.	36
Figura 3. 33 - Profundidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de sardinha, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra).	38
Figura 3. 34- Profundidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de carapau, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra).	39
Figura 3. 35- Temperaturas das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de sardinha, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra).	40
Figura 3. 36- Temperaturas das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de carapau, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra).	40

Figura 3. 37- Salinidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de sardinha, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra).	42
Figura 3. 38- Salinidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de carapau, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra).	42
Figura 3. 39- Resultado da eletroforese dos produtos do PCR do ADN de ovos de sardinha. Legenda: L-Lader, B-Branco. A seta azul indica o local onde é possível observar a presença dos fragmentos com o tamanho esperado.	46
Figura 3. 40- Resultado da eletroforese dos produtos dos PCR do ADN de ovos (esquerda) e gónadas (direita) de sardinha. Legenda: L- Lader, B- Branco. A seta branca indica o local onde é possível observar a presença dos fragmentos com o tamanho esperado.	47

Lista de tabelas

Tabela 2. 1 – Resumo das campanhas de amostragem analisadas	13
Tabela 3. 1 - Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência do parasita em estudo nos ovos de sardinha, nos anos analisados.....	26
Tabela 3. 2 - Resultados do teste G-de-independência para comparação da PEOP do parasita em estudo nos ovos de sardinha, nos anos analisados	26
Tabela 3. 3 - Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência do parasita em estudo nos ovos de carapau, nos anos analisados.....	27
Tabela 3. 4 - Resultados do teste G-de-independência para comparação da PEOP do parasita em estudo nos ovos de carapau, nos anos analisados	27
Tabela 3. 5 - Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência e PEOP do parasita em estudo nos ovos de sardinha e carapau, nos anos analisados comuns às duas espécies	28
Tabela 3. 6 - Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência do parasita em estudo nas três divisões da área de estudo.....	37
Tabela 3. 7 - Resultados da análise GLM com os fatores ambientais selecionados para integrar o modelo explicativo final, tomando como variável dependente o número de ovos de sardinha parasitados.	44
Tabela 3. 8 - Resultados da análise GLM com os fatores ambientais selecionados para integrar o modelo explicativo final, tomando como variável dependente o número de ovos de carapau parasitados.....	44
Tabela 3. 9 – Comparação da estimativa de mortalidade total de ovos de sardinha pelo método DEPM e a prevalência de infecção do parasita obtida neste estudo, nos anos em comum.....	45

Lista de abreviaturas e símbolos

AP- Arrasto pelágico

CER- Cerco

ADN – ácido desoxirribonucleico

DEPM – Daily Egg Production Method

dNTPs - deoxyribonucleotide triphosphate

ICES - International Council for the Exploration of the Sea

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

GLM- Generalized Linear Model

MPDO - Método de Produção Diária de Ovos

pb- pares de bases

PCR- polymerase chain reaction

PEOP - Percentagem de estações com ovos parasitados

PNAB - Plano Nacional de Amostragem Biológica

SSB - spawning stock biomass

SSU - small subunit of ribossomal RNA

TBE - Tris-Borato-EDTA

V - Volt

WGHANSA - Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy, and Sardine

WGACEGG- Working Group on Acoustic and Egg Surveys

WGMEGS- Working Group on Acoustic and Egg Surveys for Small Pelagic Fish in NE Atlantic

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A sardinha, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), e o carapau, *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) são espécies de peixes pelágicos, clupeiformes e perciformes, respetivamente, com uma enorme importância nas cadeias tróficas marinhas, sendo consideradas espécies chave (bem como outros pequenos peixes pelágicos) nas regiões com maior produtividade dos oceanos, ocupando um nível intermédio na teia alimentar (Garrido *et al.*, 2017). O valor destas duas espécies não se restringe ao seu papel na cadeia alimentar do ecossistema onde se inserem, pois as mesmas têm um importante interesse comercial, apresentando um valor acrescido na Península Ibérica, onde fazem parte da alimentação tradicional da população (Stratoudakis *et al.*, 2000).

Os estudos mais recentes realizados sobre a distribuição e abundância de sardinha e carapau na costa Atlântica da Península Ibérica indicam que não existiu uma diminuição dos mananciais nos últimos anos, no entanto, é claro que têm ocorrido flutuações ao longo do tempo (ICES, 2020). Estas espécies, tal como outras espécies pelágicas, estão naturalmente sujeitas a variações consideráveis no recrutamento anual e abundância populacional devido a fatores biológicos e ambientais. É, no entanto, atribuído às pescas o maior impacto na diminuição dos mananciais de peixes, uma vez que não existe ainda uma solução que permita a realização de pescas verdadeiramente sustentáveis (Pauly *et al.*, 2002). Entre as causas possíveis para as flutuações conhecidas nas populações de pequenos peixes pelágicos estão a sua biologia e estratégia reprodutiva uma vez que as mesmas características que as podem tornar resilientes são também as que as tornam potencialmente suscetíveis a flutuações no ambiente que as rodeia. São em geral espécies que ocupam uma posição intermédia nas teias tróficas, com longevidade curta (principalmente a sardinha), fecundação externa e ovos e larvas pelágicos que podem potencialmente sofrer mortalidades elevadas por condições adversas do meio ou predação. Por outro lado também limitações na disponibilidade de alimento, principalmente para as larvas e juvenis, podem justificar as flutuações usuais nestas populações de pequenos peixes pelágicos (Stratoudakis *et al.*, 2000). O parasitismo nas fases iniciais de vida é outro fator que tem potencial para influenciar a mortalidade da espécie e consequentemente contribuir para flutuações no recrutamento, podendo levar à diminuição do mesmo (Longshaw *et al.*, 2010).

Em 1952 foi descrito, pela primeira vez, o endoparasita *Ichthyodinium chabelardi*, um organismo encontrado em ovos de vários peixes pelágicos (Borges *et al.*, 1996), nos quais se incluem as duas espécies deste estudo. Foi primeiramente descrito precisamente na *Sardina pilchardus* (Hollande e Cachon, 1952,1953). Este parasita conduz, em todos os casos conhecidos, à morte do indivíduo (Shadrin *et al.*, 2010), ainda no ovo, ou logo após a eclosão da larva, sendo que o ovo, na maioria dos casos, se desenvolve normalmente, mesmo estando infetado. O parasita vai-se replicando no vitelo, até que ocorre o rompimento da membrana do saco vitelino, libertando o parasita e, caso ainda não tenha acontecido antes, levando nessa altura à morte da larva (Borges *et al.*, 1996).

A infeção por *Ichthyodinium chabelardi* pode, potencialmente, ser uma importante causa de mortalidade dos ovos e larvas e consequente diminuição do recrutamento anual das espécies em estudo.

Shadrin *et al.* (2010) apresentaram resultados da prevalência (número de ovos parasitados/número total de ovos na amostra) deste parasita na Baía de Nha Trang, entre os anos de 2002 e 2010, variando os valores entre 11,8% e 57,0% nas amostras recolhidas na época de inverno-primavera, e entre 6,3% e 35,8% nas amostras recolhidas no outono, tendo estes cálculos sido efetuados sem distinguir as várias espécies presentes nas amostras utilizadas. Stratoudakis *et al.* (2000) descreveram resultados acerca da infeção por este parasita em ovos de sardinha entre 1997 e 1999, nas águas Ibéricas. Os números apresentados são menores que os apresentados por Shadrin *et al.* (2010): a sardinha apresentou uma prevalência média de infeção por este parasita de 6,5% e 3,8%, em 1997 e 1999, respetivamente.

Atendendo ao potencial contributo do parasita *Ichthyodinium chabelardi* para a mortalidade de sardinha e carapau e ao conhecimento limitado da presença e distribuição da infeção em ovos destas espécies, nas águas atlânticas da Península Ibérica, torna-se relevante monitorizar e investigar a sua ocorrência e quais os fatores que a determinam.

Este trabalho insere-se no âmbito do projeto SARDINHA2020 (Abordagem Ecosistémica para a gestão da pesca da sardinha (MAR2020) -MAR-01.04.02-FEAMP-0009) onde foi considerada uma tarefa específica para: “Quantificar a prevalência e intensidade da infeção de ovos de espécies de peixes pelágicos (sardinha, carapau, biqueirão) pelo parasita letal *Ichthyodinium chabelardi*.”

1.2 Biologia e distribuição da sardinha e do carapau

1.2.1 Sardinha

A sardinha pertence à família *Clupeidae* (Parrish *et al.*, 1989) e é um peixe pelágico de pequenas dimensões, atingindo, na idade adulta, um tamanho médio entre os 15,3 e os 23cm, tendo uma longevidade média de 6 anos mas podendo, contudo chegar aos 14 anos (Muino *et al.*, 2003; Afilal *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008). Na costa Ibérica atlântica não são conhecidos movimentos migratórios para a espécie, no entanto em termos zonais, os adultos fazem migrações entre zonas mais e menos profundas, maioritariamente devido à quantidade de luz existente e aos processos de desova e de alimentação (Giannoulaki *et al.*, 1999, Zwolinski *et al.*, 2007).

A sardinha, tal como outros clupeiformes, é uma espécie omnívora que se alimenta de uma forma oportunística, apresentando uma dieta variada, focando-se grande parte da sua alimentação em espécies de micro- e meso-plâncton com uma componente de fitoplâncton (Bode *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2007).

Relativamente à reprodução desta espécie, a sua maturação sexual ocorre entre o primeiro e o segundo ano de vida, uma vez que é uma espécie com uma reduzida longevidade (Silva *et al.*, 2006). O período de desova da sardinha ocorre de outubro a maio/junho, existindo um pico entre dezembro e fevereiro, podendo estes períodos variar com a zona geográfica, devido a variações nas condições ambientais (*e.g* temperatura) (Nunes *et al.*, 2011b). A fecundação dos oócitos é externa e ocorre preferencialmente a temperaturas entre os 14°C e os 16°C na natureza (Coombs *et al.*, 2006). Trabalhos realizados em cativeiro por Miranda *et al.* (1990) mostraram que o desenvolvimento dos ovos ocorre de forma mais rápida, quanto maior for a temperatura (máximo de 20°C). Durante toda a época de reprodução ocorrem várias desovas (Nunes *et al.*, 2011a), e cada fêmea liberta, em média, entre 300 e 400 ovos por grama de peso, por evento de desova (Nunes *et al.*, 2011a, Santos *et al.*, 2012).

O desenvolvimento das gónadas ocorre durante o ano e é comum ser atribuída uma escala de maturação macroscópica para classificar a fase de maturação durante a época reprodutiva. Divide-se em 5 fases segundo Brown-Petersen *et al.* (2011): imaturo, em desenvolvimento, capaz de desovar, regressão, regeneração.

Os ovos de sardinha vivem na coluna de água essencialmente a profundidades acima dos 50-60m são esféricos, transparentes e com dimensões entre 1,3 e 1,9mm de diâmetro. Estes apresentam uma única gota de óleo no saco vitelino, que é segmentado e têm um espaço perivitelino grande (Munk e Nielsen, 2005, Ré e Meneses, 2008). O tempo de incubação do ovo varia entre 3 e 5 dias, de acordo com a temperatura (Miranda *et al.*, 1990).

1.2.2 Carapau

O carapau, pertencente à família *Carangidae*, é um peixe com vida essencialmente pelágica (adultos de maiores dimensões podem ser associados também ao domínio demersal), que na idade adulta, atinge, em média, 30cm e tem uma longevidade média acima dos 30 anos (Abaunza *et al.*, 2003). Algumas populações desta espécie fazem migrações sazonais na costa atlântica da Península Ibérica principalmente para alimentação e durante o período de reprodução para desovar (Murta *et al.*, 2008).

O carapau é uma espécie oportunista no que diz respeito à alimentação, mas tem como principais fontes de alimentação copépodes e pequenos crustáceos, nomeadamente eufausiáceos (krill), havendo ainda uma reduzida fração da sua alimentação que inclui outros peixes pequenos (Cabral e Murta, 2002).

A época de reprodução desta espécie tem lugar, de forma mais predominante, entre dezembro e março/abril (Santos *et al.*, 2001).

A idade de primeira maturação pode variar entre os 2 e os 4 anos de idade. Cada fêmea liberta, por evento de desova, cerca de 200 ovos por grama de peso (Abaunza *et al.*, 2003, Gonçalves *et al.* 2009). A fecundação dos oócitos ocorre externamente, a uma temperatura mínima de 10°C (Lockwood e Johnson, 1977), sendo a libertação dos mesmos efetuada de forma seriada (várias vezes ao longo da época de reprodução).

De forma semelhante à sardinha, o estado de maturação desta espécie também se divide em 5 fases: imaturo, em desenvolvimento, capaz de desovar, regressão, regeneração (Brown-Petersen *et al.*, 2011). Desde o primeiro ao terceiro estágio as gónadas vão ocupando uma cada vez maior porção da cavidade abdominal do indivíduo. Pelo contrário, a partir do terceiro e até ao último estágio vão diminuindo sucessivamente (Costa, 2009).

Os ovos de carapau são pelágicos, esféricos e apresentam um diâmetro entre 0,81 e 1,04mm. Apresentam uma gota de óleo, no saco vitelino, que apresenta segmentação (Munk e Nielsen, 2005, Ré e Meneses, 2008). O tempo de incubação do ovo varia entre 3 e 5 dias, de acordo com a temperatura da água (Cunha *et al.*, 2008).

1.2.3 Distribuição de sardinha e de carapau

1.2.3.1 Sardinha

A sardinha ocorre no Atlântico Nordeste, desde a Islândia, onde é rara, e do Mar do Norte, até ao Senegal. No Atlântico Centro Leste, esta ocorre no sul de Marrocos, Madeira, Ilhas Canárias e Cabo Verde. A partir de 1970 foi possível encontrar esta espécie também na costa norte da Mauritânia (na figura 1.1 pode observar-se a sua distribuição) (Tous *et al.*, 2015). Na costa Atlântica Ibérica a sardinha pode encontrar-se sobre toda a plataforma continental mas preferencialmente em profundidades de 100-150m. Os indivíduos mais jovens ocorrem em maiores abundâncias, a menores profundidades (Parrish *et al.*, 1989).

1.2.3.2 Carapau

O carapau ocorre no Atlântico Norte e Leste, incluindo o Mar Mediterrâneo (onde é menos abundante que no Atlântico), o Mar de Mármara e o Mar Negro. No Atlântico está presente desde a Noruega até ao sul de África, prolongando a sua ocorrência no Índico, ao longo da costa de Maputo (na figura 1.2 pode observar-se a sua distribuição) (Smith-Vaniz *et al.*, 2015). Na costa Atlântica Ibérica o carapau ocorre sobre toda a plataforma continental e talude, mas preferencialmente em profundidades entre os 100-250m aproximadamente. Os indivíduos mais jovens ocorrem em maior densidade, a menores profundidades (Sousa *et al.*, 2005)



Figura 1.1- Distribuição de *Sardina pilchardus*. Fonte: IUCN Red List, 2021.

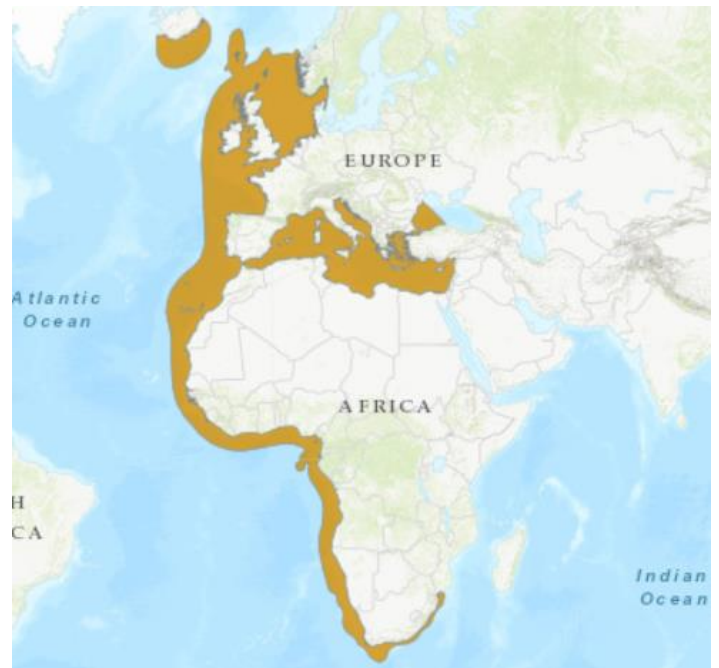


Figura 1.2- Distribuição de *Trachurus trachurus*. Fonte: IUCN Red List, 2021.

1.3 Estado dos mananciais de sardinha e carapau

1.3.1 Sardinha

Segundo o último relatório do grupo WGHANSA (Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy, and Sardine) do ICES (2021), os mananciais de sardinha mostram uma recuperação nos anos mais recentes, após uma fase de declínio entre 2006 e 2016 (fig. 1.3). Entre o ano de 2019 e 2020 ocorreu, também um aumento da captura de sardinha, em Portugal, de cerca de 57%.

1.3.2 Carapau

Os mananciais de carapau têm-se mantido relativamente constantes ao longo do tempo, embora com algumas variações, no entanto, a biomassa dos mananciais desta espécie tem vindo a aumentar nos últimos anos (fig.1.4). No ano de 2020 ocorreu uma descida da captura desta espécie quando comparado com o de 2019, de cerca de 15% (ICES, 2021).

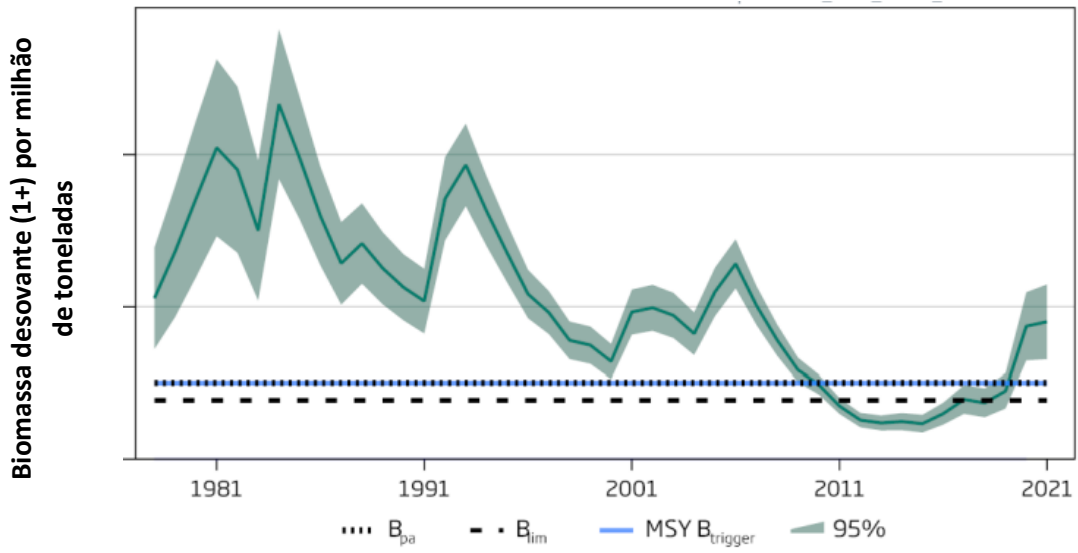


Figura 1. 3- Resumo da avaliação dos mananciais de sardinha Fonte: ICES,2021. Legenda: Bpa: Biomass, precautionary approach, Blim: Biomass, limit, MSYBtrigger: Maximum Sustainable Yield

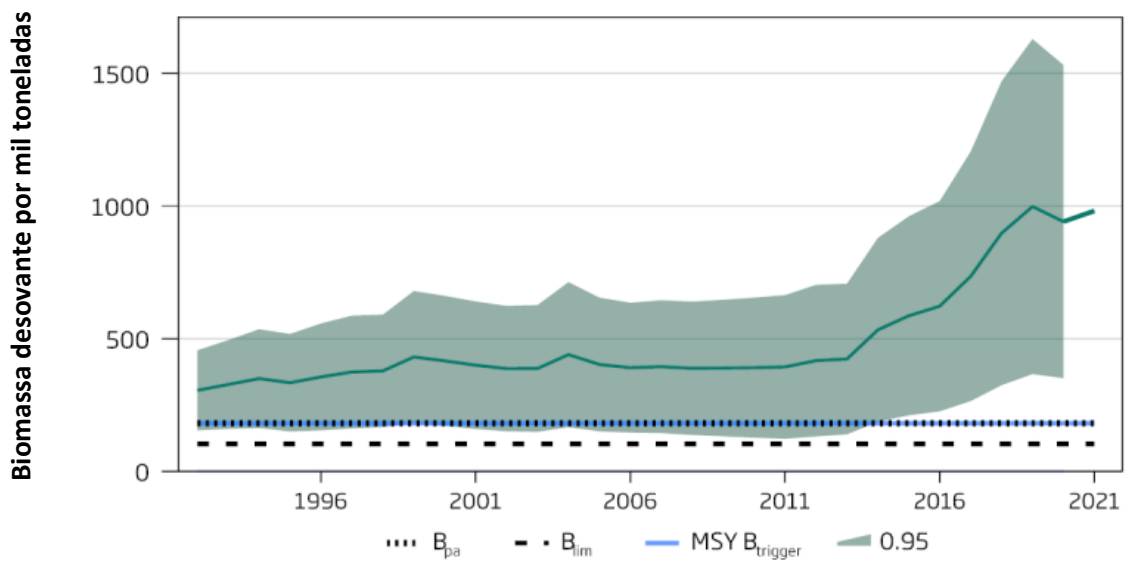


Figura 1. 4- Resumo da avaliação dos mananciais de carapau. Fonte: ICES,2021. Legenda: Bpa: Biomass, precautionary approach, Blim: Biomass, limit, MSYBtrigger: Maximum Sustainable Yield

1.4 O parasita *Ichthyodinium chabelardi*

1.4.1 Biologia e particularidades

Ichthyodinium chabelardi foi descrito pela primeira vez em 1952 (Hollande e Cachon, 1952) como um dinoflagelado parasita de ovos de sardinha, devido às suas semelhanças com algumas espécies de dinoflagelados (Borges *et al.*, 1996, Gleason *et al.*, 2019). Inicialmente foi discutida a classificação taxonómica desta espécie mas em 2009, através da análise filogenética com base em SSU rADN, foi proposta a posição taxonómica deste parasita como pertencente ao grupo alveolado MAGI (Marine Alveolate Group I), onde se inserem diversos outros parasitas semelhantes a dinoflagelados (Skovgaard *et al.*, 2009).

Este parasita pode considerar-se uma espécie generalista, pois já foi encontrada em pelo menos 13 espécies de peixes marinhos, alguns com um elevado interesse comercial, tais como *Sparus aurata* (dourada), *Engraulis encrasicolus* (biqueirão) e *Micromesistius poutassou* (verdinho) (Gleason *et al.*, 2019). *Ichthyodinium chabelardi* desenvolve-se no saco vitelino dos ovos de diversos peixes pelágicos (fig.1.5), e o seu desenvolvimento não parece interferir com o desenvolvimento do ovo. O parasita multiplica-se muito rápido no saco vitelino e acaba por esgotar as reservas do mesmo, as quais a larva precisa para sobreviver (Borges *et al.*, 1996; Meneses *et al.*, 2003). O primeiro sinal de infeção nos ovos torna-se visível apenas após a gastrulação, o que significa que nos estádios iniciais de desenvolvimento do ovo, o parasita não está presente ou não consegue ser detetado, pelo menos visualmente (Gleason *et al.*, 2019).

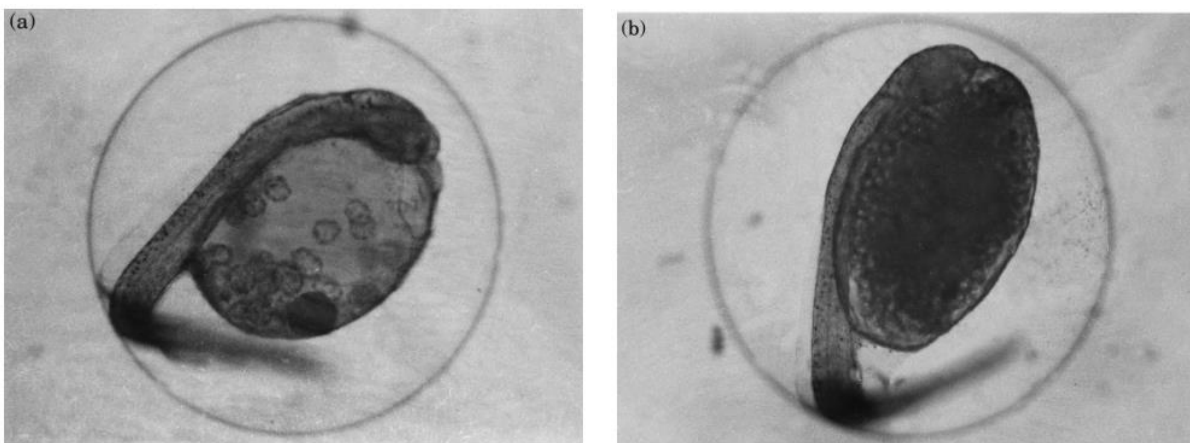


Figura 1. 5- Ovos de sardinha num estágio primário (a) e num estágio avançado (b) de infeção por *Ichthyodinium chabelardi* (Ampliação 50x). Fonte: Stratoudakis *et al.* (2000).

1.4.2 Ciclo de vida do parasita

A informação recolhida através de vários trabalhos confirma que parte do ciclo de vida de *Ichthyodinium chabelardi* ocorre no saco vitelino do hospedeiro, no entanto as etapas do ciclo de vida fora do hospedeiro ainda não são totalmente conhecidas. A figura 1.6 mostra, de forma esquemática, o desenvolvimento do parasita dentro do saco vitelino, passando este desenvolvimento por 3 fases: esquizontes primordiais (entre 15 e 140 μ), esquizontes secundários (30 a 100 μ) e esquizontes de última geração (entre 70 e 15 μ) (Meneses *et al.*, 2003).

Esquizontes primordiais

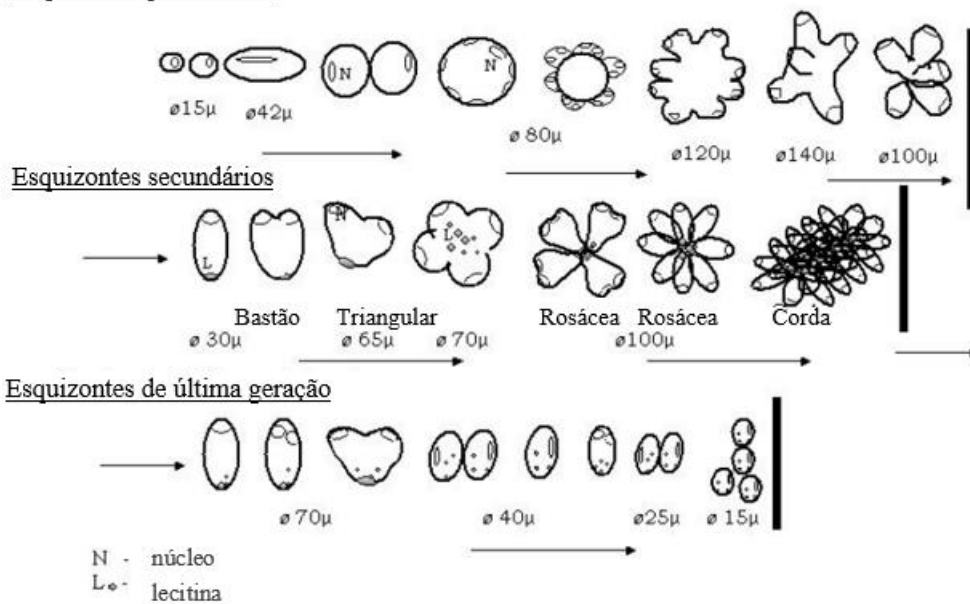


Figura 1.6 – Esquema do desenvolvimento de *I. chabelardi* baseado na observação de ovos de sarda (*Scomber scombrus*) parasitados. Adaptado de Meneses *et al.* (2003).

1.4.3 Mecanismo de infecção do parasita

A forma como *Ichthyodinium chabelardi* infeta o hospedeiro ainda não é totalmente conhecida, tendo sido propostas várias hipóteses que podem explicar a forma como esta infecção acontece. Segundo Borges *et al.* (1996), existem 4 possíveis formas de entrada do parasita nos ovos:

- 1- O parasita encontra-se na água e consegue entrar para o saco vitelino através do micrópilo, antes do fecho deste, que ocorre após a fecundação (ainda no estágio I do ovo – Anexos I e II);
- 2- O parasita entra no hospedeiro na fase adulta e existe já nas gónadas dos progenitores, logo os gâmetas estão infetados mesmo antes da fecundação ocorrer;
- 3- O parasita encontra-se na água e penetra o ovo através dos poros existentes no córion;
- 4- O parasita encontra-se na água e entra no ovo através de fagocitose, com o auxílio de enzimas.

Relativamente à segunda hipótese referida por Borges *et al.* (1996), esta foi testada por Yuasa *et al.* (2007) com a espécie *Thunnus albacares* (atum-amarelo) e o genoma do parasita foi detetado em ovos fertilizados infetados, no saco vitelino de larvas e na água, mas não nas gónadas dos indivíduos estudados.

Mori *et al.* (2007) afirmam que, segundo experiências *in vitro* e *in vivo*, a infecção dos ovos pelo parasita ocorre horizontalmente, ou seja, que o parasita existente na água do mar acaba por conseguir penetrar os ovos (pelágicos) libertados.

Não obstante os resultados referidos por Mori *et al.* (2007) e Yuasa *et al.* (2007) e as as experiências realizadas, subsistem dúvidas sobre o mecanismo de infecção dos ovos pelo parasita *Ichthyodinium chabelardi*.

1.5 Objetivos do estudo

Apesar de ter sido descrito pela primeira vez há mais de meio século, persistem muitas dúvidas em relação a *Ichthyodinium chabelardi*, ao seu ciclo de vida e aos danos que pode causar às populações das espécies que infeta. O presente estudo tem como foco as populações de sardinha e carapau na costa sul e oeste atlântica da Península Ibérica, que são afetadas por este parasita.

Este estudo tem, então, dois objetivos principais:

- (i) Estudar a prevalência de infecção e a PEO (percentagem de estações com ovos parasitados) por *Ichthyodinium chabelardi* em ovos de sardinha e carapau, ao longo de vários anos, na área de estudo;
- (ii) Analisar a distribuição espacial dos ovos infetados na área de estudo (costa sul e oeste atlântica da Península Ibérica), tendo em conta fatores ambientais.

Para além dos objetivos principais, existe ainda um objetivo complementar:

Explorar o possível mecanismo de infecção dos ovos pelo parasita através da análise molecular das gónadas de sardinha, de forma a compreender se o parasita se encontra nas mesmas.

2. Métodos

2.1 Caracterização da área de estudo

A área do presente estudo insere-se na subdivisão 9a (Sul e Oeste) das regiões definidas pelo ICES, estendendo-se na região Ibérica atlântica desde o Cabo Finisterra até ao sul de Espanha, no Golfo de Cádiz (fig. 2.1). A costa ocidental da Península Ibérica situa-se no sudoeste da Europa, sendo a zona mais ocidental da Europa e banhada pelo Oceano Atlântico. Nesta região, tipicamente as temperaturas e salinidades são superiores no sul, decrescendo à medida que se progride para norte. A título de exemplo, no ano de 2019 (entre 25 de janeiro e 25 de fevereiro) as temperaturas da água à superfície variaram entre os 12,5°C e os 17°C, aumentando do norte para o sul, e as salinidades, também à superfície, variaram entre 33 e 36,6, podendo verificar-se que, de uma forma geral, estas aumentam também de norte para sul, como se pode observar na figura 2.2.

A Península Ibérica encontra-se no limite norte da Província costeira da Corrente da Canárias e tal como em outros sistemas de corrente da margem oriental (*eastern boundary current systems*) a oceanografia regional é condicionada pela migração sazonal da cintura de ventos alísios que origina o afloramento costeiro sazonal, o qual é mais intenso no verão (Longhurst, 2007). A região costeira está também sujeita a forte variabilidade hidrodinâmica associada com estruturas de mesoescala (plumas menos salinas, vórtices e meandros) e correntes de carácter transitório ao longo da costa. No bordo e declive da plataforma observa-se uma corrente recorrente em direção ao polo. (Peliz *et al.*, 2002, 2005).

O ecossistema pelágico na costa Ibérica Atlântica é, assim, bastante controlado pelo transporte vertical de nutrientes para a camada fótica. Acresce que a existência de vários estuários e rias também contribui significativamente para a produtividade regional. Esta região, situada entre a influência das águas centrais subpolares e subtropicais (Mason *et al.* 2006), alberga tipicamente uma variedade de espécies de peixes, sendo os pelágicos muito relevantes (grupo ao qual pertencem a sardinha e o carapau). Outras espécies pelágicas muito comuns neste sistema são o biqueirão (*Engraulis encrasicolus*), a cavala (*Scomber colias*) e a sardinela (*Sardinella aurita* e *Sardinella maderensis*), entre outros (Longhurst, 2007).

2.1.1 Divisão da área de estudo para análise

A área de estudo foi dividida em três regiões distintas: (i) do Cabo Trafalgar no Golfo de Cádiz, ao Cabo de Sagres, (ii) do Cabo Sagres ao Canhão da Nazaré e (iii) do Canhão da Nazaré ao Cabo Finisterra, na Galiza. Esta divisão foi efetuada de forma que se conseguisse avaliar a proporção de ovos parasitados, em comparação, nestas três regiões, nos anos em análise. A divisão foi realizada tendo em conta características topográficas, oceanográficas e biológicas destas regiões e que são usualmente também adotadas no reporte de informação das campanhas regulares do IPMA.

Foi também utilizada a divisão em apenas duas regiões, separando a costa sul da costa ocidental da área de estudo: 1- do Cabo Trafalgar no Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres e 2- do Cabo de Sagres ao Cabo Finisterra, às quais se deu o nome de “estratos”.

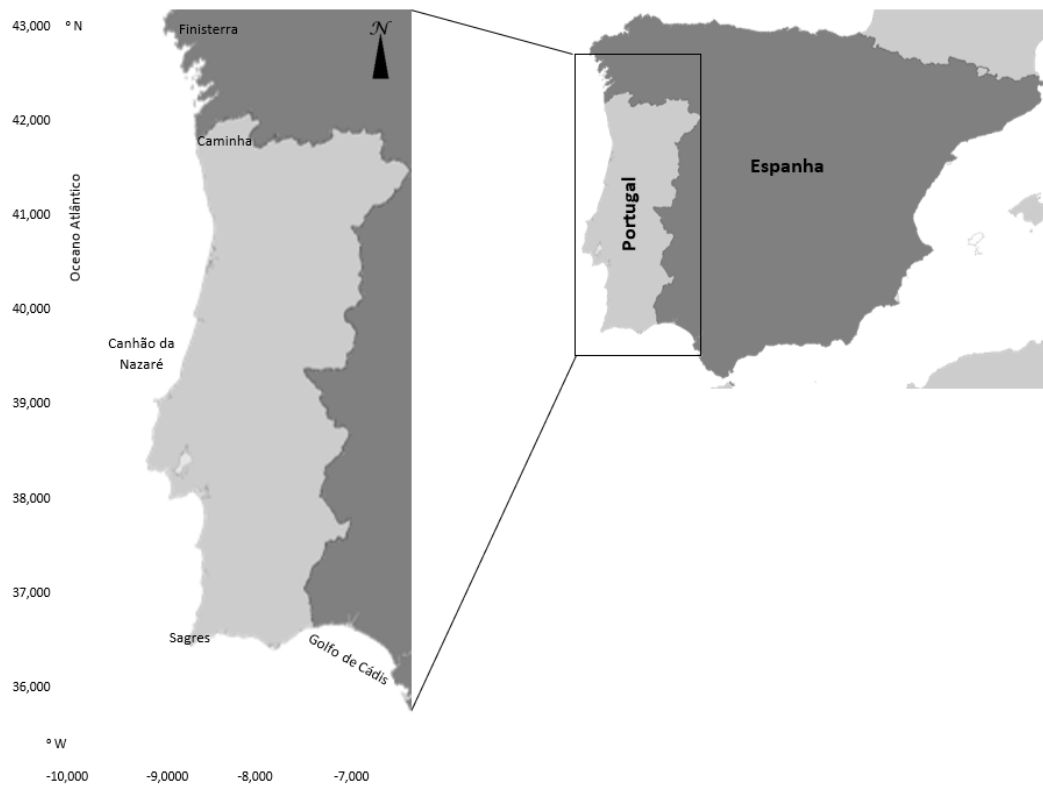


Figura 2. 1– Mapa da costa ocidental da Península Ibérica (área do presente estudo).

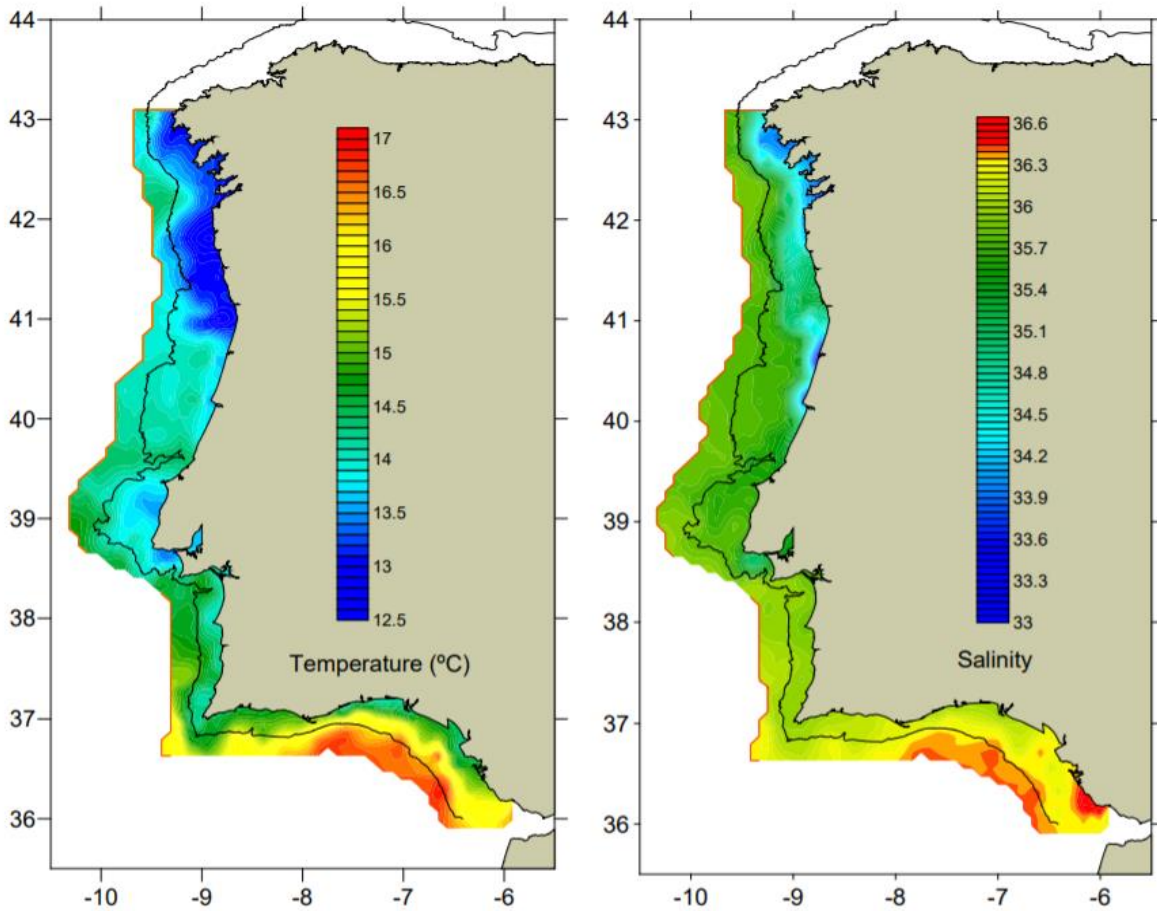


Figura 2. 2- Distribuição de temperatura (esquerda) e salinidade(direita) superficiais obtidas através do termosalinómetro de registo contínuo, no ano de 2019, entre 25 de janeiro e 25 fevereiro. Fonte: ICES Scientific Report. Group WGMEGS, 2019. <https://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Expert%20Group%20Report/EOSG/2021/WGMEGS%20Report%202020.pdf>

2.2 Recolha de amostras no mar

As amostras de plâncton utilizadas no presente trabalho resultaram de amostragens efetuadas nas campanhas regulares do IPMA para a estimação da biomassa desovante (SSB) através do Método de Produção Diária de Ovos (MPDO ou DEPM- Daily Egg Production Method) para as espécies de sardinha (campanhas PNAB: PT-DEPM-PIL) e carapau (campanhas PNAB: PT-DEPM-HOM). A tabela 2.1 resume as campanhas de amostragem efetuadas nos anos considerados para este trabalho.

O método MPDO é usado desde os anos de 1990 para estimar o manancial de biomassa desovante (SSB) (ICES,2021). Esta metodologia implica a amostragem em toda a área potencial de desova da espécie alvo para recolha dos ovos, para estimação da Produção de Ovos e, simultaneamente, a realização de pescas para a colheita de adultos para determinação de pesos médios, proporção entre sexos, fração de desova e fecundidade. De forma a obter os resultados mais exatos, este método implica a recolha de amostras no pico da época de reprodução (Stratoudakis *et al.*, 2006). Na figura 2.3 apresenta-se de forma esquemática os diferentes componentes do MPDO por forma a obter a estimação de Biomassa Desovante.

As campanhas dirigidas à aplicação do MPDO ocorrem a cada 3 anos para cada espécie-alvo e são coordenadas internacionalmente através de grupos de trabalho no âmbito do ICES, o WGACEGG (Working Group on Acoustic and Egg Surveys for Small Pelagic Fish in NE Atlantic) e o WGMEGS (Working Group on Mackerel and Horse Mackerel Egg Surveys), onde são padronizadas as metodologias e análises a efetuar, e coordenada a realização das campanhas em cada ano.

Embora o método seja o mesmo, existem pequenas diferenças nas metodologias de amostragem no mar durante as campanhas dirigidas à sardinha ou ao carapau, as quais decorrem da distribuição e abundância das espécies-alvo em cada campanha. As diferenças prendem-se essencialmente com a dimensão da rede de amostragem de plâncton (existe uma maior área de filtração de rede para os ovos de carapau, por serem menos abundantes que os de sardinha) e com a grelha de estações de monitorização, bem como com o tipo de arrastos de pesca (essencialmente pelágicos para sardinha e maioritariamente de fundo para carapau).

As amostras de plâncton foram recolhidas na área referida (desde o Cabo Finisterra até ao Golfo de Cádiz), essencialmente sobre a plataforma continental e bordo superior do talude. Os pontos de amostragem para plâncton podem variar entre campanhas, dependendo do tipo de campanha (dirigida a sardinha ou a carapau) e porque a metodologia é adaptativa durante a amostragem. Alguma modificação na cobertura espacial pode também ter-se devido a condições atmosféricas ou de estado do mar adversas, que podem ter levado a limitações na amostragem.

Tabela 2. 1– Resumo das campanhas de amostragem analisadas. As amostras assinaladas com * foram observadas e classificadas pela autora deste trabalho, os restantes resultados provêm da base de dados do IPMA.

Ano	Referência da Campanha	Rede Plâncton	Data	Nº de Amostras
<u>Sardinha</u>				
2007	PT-DEPM07-PIL	CalVET - Ø 40cm	03/02- 02/03/2007	406
2013	PT-DEPM13- PIL	CalVET - Ø 40cm	10/02- 19/02/2013	222 *
2014	PT-DEPM14- PIL	CalVET - Ø 25cm	15/03- 12/05/2014	563 *
2016	PT-DEPM16- PIL	CalVET - Ø 25cm	11/03- 01/05/2016	395 *
2017	PT-DEPM17- PIL	CalVET - Ø 25cm	11/03- 26/05/2017	380 *
2019	PT-DEPM19- PIL	CalVET - Ø 40cm	25/01- 25/02/2019	550 *
2020	PT-DEPM20- PIL	CalVET - Ø 25cm	05/02- 28/02/2020	491
<u>Carapau</u>				
2002	PT-DEPM02-HOM	CalVET - Ø 40cm	08/01- 02/02/2002	484
2004	PT-DEPM04-HOM	BONGO - Ø 40cm	15/01- 026/02/2002	141
2005	PT-DEPM05-HOM	CalVET - Ø 40cm	29/01- 22/02/2005	407
2007	PT-DEPM07-HOM	CalVET - Ø 40cm	03/02- 02/03/2007	406
2019	PT-DEPM19-HOM	CalVET - Ø 40cm	25/01- 25/02/2019	550

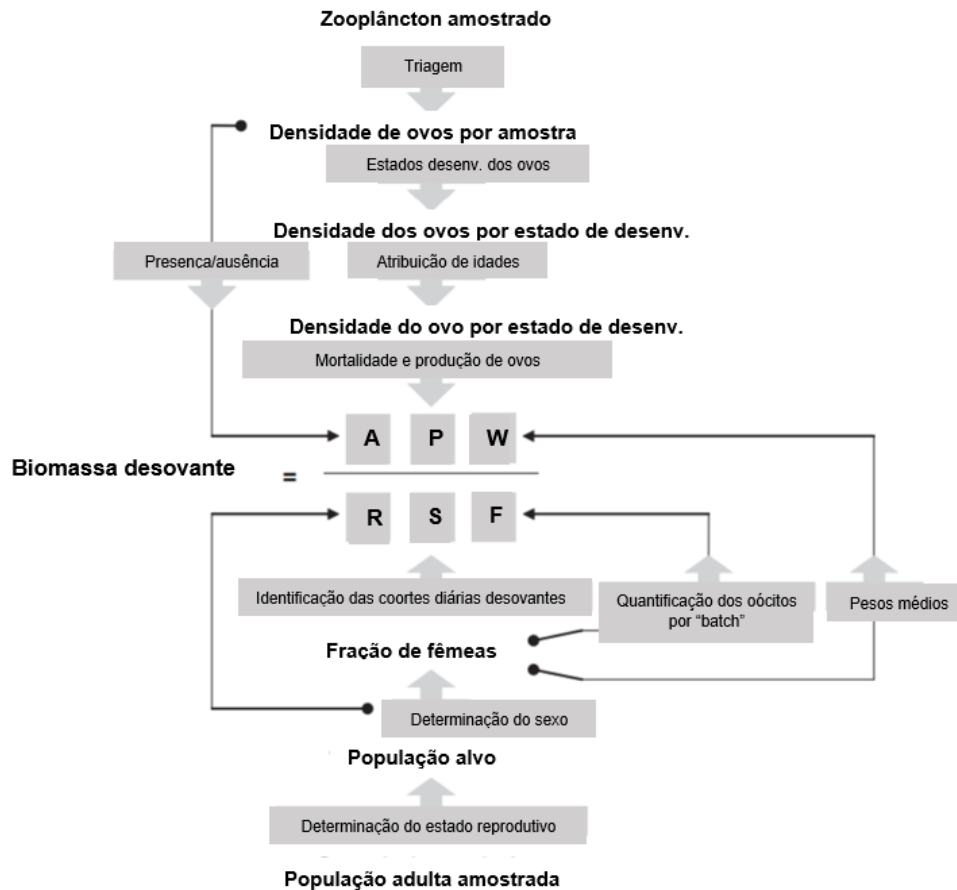


Figura 2. 3- Representação esquemática do MPDO (Método Diário de Produção de Ovos). Adaptado de Stratoudakis *et al.* (2006).

2.2.1 Campanhas dirigidas a sardinha, PNAB:PT-DEPM-PIL

As campanhas dirigidas a sardinha ocorrem nas áreas ICES 8c e 9a. O IPMA cobre a área 9a sul e oeste, enquanto o IEO (Instituto Espanhol de Oceanografia) cobre a área 9a a norte e toda a área 8c. A área coberta pelo IPMA é compreendida entre a Costa Ibérica atlântica, desde Cádiz (Cabo Trafalgar), e a fronteira norte de Portugal e Espanha.

Nesta tipologia de campanha, dedicada à sardinha, o plâncton é recolhido ao longo da área de estudo através de arrastos, utilizando um sistema CalVET adaptado (fig.2.4), no qual estão integradas duas redes e um CTD (para obtenção de perfis de temperatura, salinidade e fluorescência), bem como um fluxómetro na boca de cada uma das redes, cujo objetivo é medir o volume de água filtrada. Os arrastos, com o navio parado, são efetuados na vertical, a uma velocidade de 1m/s até à profundidade máxima de 150m. O amostrador é constituído por dois aros (Ø 25cm) onde estão montadas duas redes com 1,5 m de comprimento e malhagem de 150 µm. As estações onde são realizadas as amostragens estão dispostas ao longo de transectos fixos perpendiculares à linha de costa, que se distanciam entre si 8 milhas náuticas. O sistema CUFES (Continuous Underway Fish Egg Sampler) recolhe amostras continuamente durante o percurso entre cada estação para amostras CalVET e é utilizado como amostrador auxiliar, ajudando a definir a densidade de amostragem com as redes CalVET e a definir a extensão dos transectos. O número de estações amostradas ao longo de cada transecto (na zona média e exterior da plataforma) é adaptativo em função da densidade de ovos observados *in situ* nas amostras CUFES e,

desta forma, esses pontos de amostragem podem distanciar-se entre 3 ou 6 milhas. O limite de um transecto é definido quando ocorrem duas amostras CUFES consecutivas com zero ovos das espécies alvo (Angélico *et al.*, 2020). É devido a esta metodologia adaptativa que a grelha de estações efetuadas não é exatamente igual em todos os anos.

Terminados os arrastos, as redes são lavadas do lado exterior, com uma mangueira, com água proveniente do mar. As amostras recolhidas são guardadas em frascos devidamente identificados e preservadas em solução de formaldeído a 4% em água destilada. O processamento das amostras é posteriormente realizado em laboratório.



Figura 2. 4– Rede CalVET, utilizada para recolha de plâncton, e registo de temperatura, salinidade e fluorescência (clorofila) nas campanhas dirigidas a MPDO. Fonte: IPMA, Documentos internos.

2.2.2 Campanhas dirigidas a carapau, PNAB:PT-DEPM-HOM

O processo de recolha de plâncton com o objetivo de recolha de ovos de carapau é um processo semelhante ao descrito para a recolha de ovos da sardinha, no entanto, devido à diferença que existe na biologia destas duas espécies, ocorrem algumas diferenças no tipo de material utilizado e nos transectos de amostragem efetuados. A campanha HOM ocorre na área 9a, desde Cádiz (Cabo Trafalgar) até ao Cabo Finisterra, na Galiza.

Os arrastos verticais são feitos até uma profundidade máxima de 200m, pois a desova desta espécie pode ocorrer a uma maior profundidade. Os dois aros do amostrador CalVET têm um diâmetro de 40 cm (Ø 40cm) para permitir a filtração de um maior volume de água e desta forma potenciar a captura de maior número de ovos de carapau, que são menos abundantes que os de sardinha, e a altura da rede é de 2,0m. Os transectos de amostragem perpendiculares à linha de costa distanciam-se entre si 12 milhas náuticas, por forma a permitir a cobertura de toda a área potencial de desova no número de dias de campanha disponíveis (ICES, 2014).

2.3 Preparação e análise de amostras em laboratório

No laboratório do IPMA, é medido o biovolume de cada amostra de plâncton recolhida, para determinação do volume de plâncton através do método de volume deslocado (Flint & Flint, 2002).

As amostras são posteriormente triadas e todos os ovos e larvas de peixes armazenadas em tubos em solução formaldeído (4%). As espécies alvo são preservadas separadamente para posterior análise.

Para observar os ovos de sardinha e carapau, uma vez que o formaldeído é uma substância nociva, foi retirado o mesmo dos tubos onde os ovos se encontram (numa hotte, com a ajuda de uma pipeta) e colocado no recipiente apropriado para posterior reciclagem.

Com a ajuda de água destilada, os ovos foram, então, posteriormente retirados dos tubos, com uma pipeta, colocados numa placa de Petri, e, finalmente, observados à lupa, com ampliações que variaram entre 7x e 90x.

Todos os ovos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento utilizando uma escala com 11 estados de desenvolvimento, descritos em documentos internos do IPMA (adaptados de Ahlstrom, 1943, Gamulin e Hure, 1955 e notas internas) (Anexos I e II).

Em simultâneo com a atribuição dos estádios de desenvolvimento foi identificada a presença de *Ichthyodinium chabelardi* no vitelo de cada um dos ovos analisados. O nível de infeção foi determinado de acordo com a escala em 4 níveis definida por Meneses (2003) (fig. 2.7).

Finalizada a análise pretendida, foi retirada toda a água da placa de Petri, mais uma vez, com a ajuda de uma pipeta. Depositou-se depois solução de formaldeído (4%) na placa de Petri, dentro da hotte, para que os ovos pudessem ser aspirados e colocados novamente nos tubos onde ficaram armazenados para uso futuro.

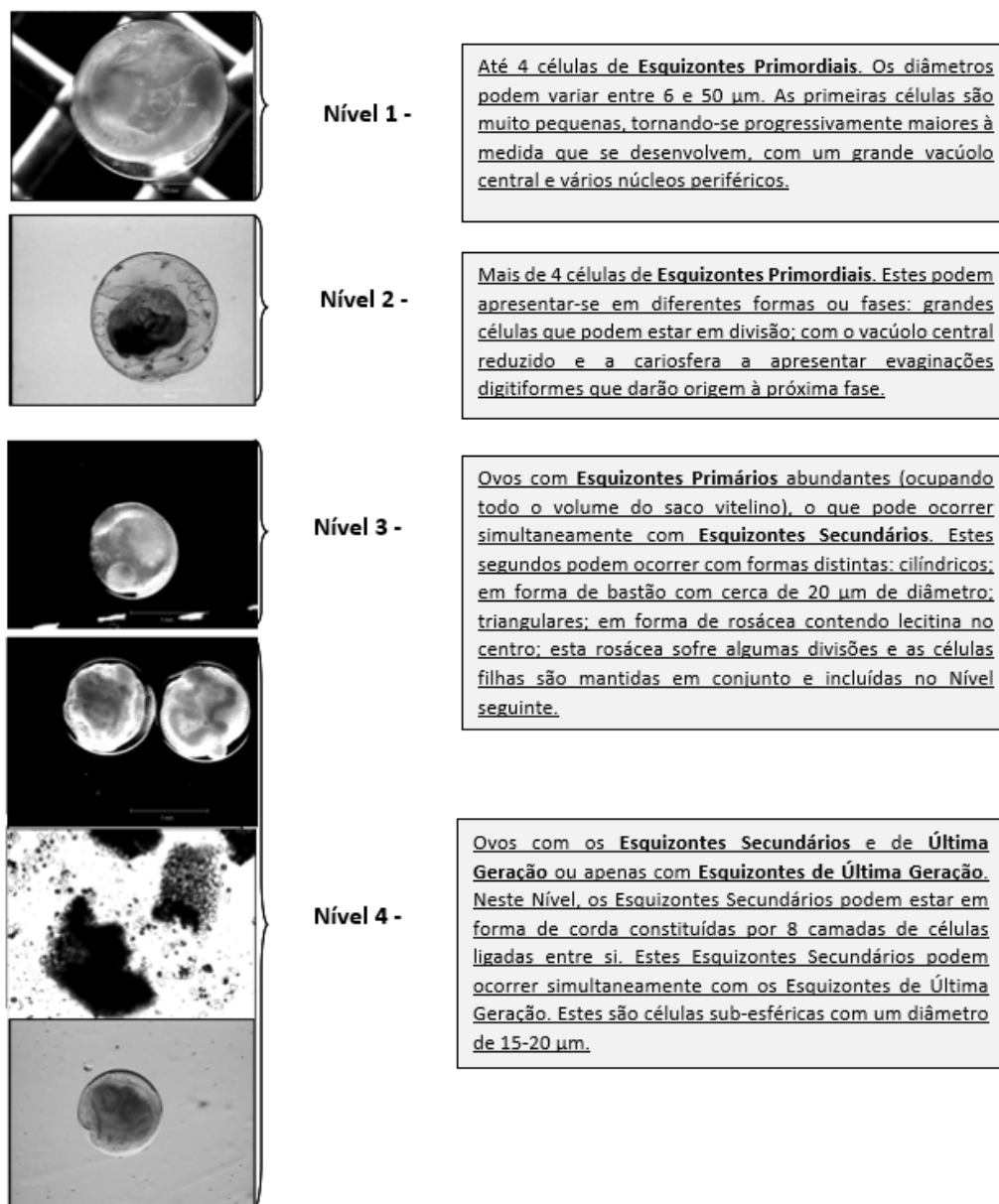


Figura 2. 5- Descrição dos níveis de infecção do parasita *Ichthyodinium chabelardi*. Adaptado de Meneses (2003).

2.4 Análises moleculares em gónadas de sardinha

Com o objetivo de verificar se o parasita em estudo se encontra nas gónadas de sardinha, ou seja, se os oócitos poderiam estar infetados mesmo antes de serem expelidos para a água, e de serem fecundados,

foram efetuadas análises moleculares às gónadas de 10 fêmeas de sardinha, tendo sido extraído o ADN das gónadas de 98 indivíduos para uso e análise futura.

2.4.1 Recolha, armazenamento e preparação das gónadas

As gónadas das fêmeas de sardinha analisadas foram recolhidas de peixes capturados na Campanha de Rastreo Acústico PELAGO 21, realizada pelo IPMA, em março de 2021. Todas as informações relativas a cada um dos indivíduos podem ser encontradas no Anexo V.

As sardinhas foram recolhidas, através de pescas pelágicas ou de cerco e, logo em seguida, pesadas, medidas e classificadas quanto ao estado de maturação das gónadas. As gónadas foram extraídas e preservadas em álcool a 96%, em frascos devidamente identificados para posterior análise laboratorial.

No laboratório do IPMA, foram cortados, com a ajuda de um bisturi e uma pinça, 3 pedaços de diferentes partes das gónadas de cada indivíduo, com cerca de 25mg cada, e guardados em tubos com álcool a 96%, devidamente identificados. O que restou das gónadas permaneceu guardado nos frascos anteriores, para possíveis usos posteriores.

2.4.2 Extração de ADN em gónadas

Nos laboratórios do CIBIO (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos), em junho de 2021, foi extraído o ADN das gónadas dos 98 indivíduos, em diferentes estados de maturação. Para a realização da extração foi utilizado o kit EasySpin® Genomic DNA Tissue Kit (Citomed, Lisbon), em colunas, seguindo-se o protocolo fornecido no kit (Anexo VI). A única alteração feita ao protocolo aconteceu na quantidade de Proteinase K utilizada, tendo sido utilizados 30 µl em vez dos 20 µl recomendados, uma vez que foi utilizada uma grande quantidade de amostra de gónada para a extração. Antes de prosseguir para o passo seguinte, foi verificada a quantidade e qualidade do ADN extraído através da eletroforese em gel de agarose (0,8%), corrido com uma voltagem de 300V em tampão TBE.

2.4.3 PCR e eletroforese do ADN extraído

Foi realizada a amplificação de um fragmento do gene “small subunit of ribossomal RNA” (SSU) a partir do ADN extraído das gónadas através do processo de PCR (Mori *et al.*, 2007). Este processo foi feito com o ADN de 10 ovos de sardinha, que estavam infetados com o parasita, sendo estes o controlo positivo, e com o ADN das gónadas de apenas 10 dos 98 indivíduos. O ADN de cada uma das amostras foi usado em dois PCR consecutivos. O primeiro foi um PCR no qual foram usados primers universais para o SSU de eucariotas (EukA-F e EukB-R), usando 0,5 µl de cada primer (10 µM), juntamente com 5 µl de MyTaq master mix (Mg²⁺ + buffer + Taq polimerase + dNTPs) e 6 µl de ADN, correndo o PCR nas condições apresentadas no Anexo VII, passando pelo passo inicial de desnaturação, pelos ciclos de desnaturação, ligação de primers e extensão e, por último, por uma extensão final.

O segundo PCR foi um PCR específico para o SSU do alvo do estudo, o parasita *Ichthyodinium chabelardi*. Foram usados dois primers específicos para ampliar o ADN do parasita (SSU-Icht3F e SSU-

Icht4R), 0,5 µl de cada (10 µM), juntamente com 5 µl de MyTaq master mix (Mg²⁺ + buffer + Taq polimerase + dNTPs), 1 µl do ADN amplificado resultante do primeiro PCR e 3 µl de água (autoclavada), correndo o PCR segundo as condições apresentadas no Anexo VII, passando também pelo passo inicial de desnaturação, pelos ciclos de desnaturação, ligação de primers e extensão, e por uma extensão final.

Com o ADN obtido no segundo PCR, foi realizada a eletroforese. Para tal, misturaram-se 2 µl de ADN de cada uma das 10 amostras com 3 µl de azul de bromofenol, que foram depois depositados nos poços do gel de agarose (2%, com adição de GelRed®), que já continha uma solução tampão (TBE). O gel foi posteriormente colocado na cuba de eletroforese, que foi ligada a uma fonte de alimentação (300V) durante cerca de 15 minutos, de forma que ocorresse a migração do ADN. As bandas obtidas no gel foram então observadas num transiluminador, com a ajuda de luz ultravioleta.

Posteriormente, os produtos de PCR foram limpos do excesso de primers e outros inibidores por adição de 1 µl de ExoSap (USB Corporation, OH, EUA), seguindo as orientações do fabricante, e as respetivas sequências nucleotídicas foram obtidas por sequenciação de Sanger. A reação de sequenciação foi feita separadamente para cada primer SSU-Icht3F e SSU-Icht4R, usando o kit BigDye (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos para sequenciação foram posteriormente limpos com Sephadex e corridos na plataforma Genetic Analyzer ABI 3130xl (ABI Applied Biosystems). Os cromatogramas foram analisados quanto à sua qualidade com o software Geneious Prime® 2020.1.2, e as respectivas sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências de *Ichthyodinium chabelardi*.

2.5 Análise de dados

2.5.1 Ovos infetados na área de estudo

2.5.1.1 Prevalência e Percentagem de Estações com Ovos Parasitados (PEOP) pelo parasita nos ovos de carapau e sardinha

Para estimar a percentagem de ovos parasitados na área de estudo para as diversas campanhas, recorreu-se ao cálculo da prevalência, ou seja, à proporção de ovos infetados da espécie alvo relativamente ao total de ovos dessa espécie. (Bush *et al.*, 1997)

Determinou-se também a percentagem de estações com ovos parasitados (PEOP), que se calculou através da divisão do número de estações de amostragem (amostras) com ovos parasitados pelo número total de estações amostradas, no ano em questão.

2.5.1.2 Distribuição de ovos infetados na área de estudo

Para representar a distribuição dos ovos infetados pelo parasita na área de estudo, foram elaborados, recorrendo ao *software* QGIS 3.4.12, mapas. Nestes mapas estão assinaladas estações de amostragem em cada ano, evidenciando as estações onde foram recolhidos ovos parasitados, bem como está evidenciada a abundância de ovos das espécies alvo em cada estação.

2.5.2 Comparação da prevalência e Percentagem de Estações com Ovos Parasitados (PEOP) ao longo dos anos para sardinha e carapau

Comparação da prevalência de infecção e PEOP entre campanhas (variação inter-anual)

Com o objetivo de verificar se existiam variações estatisticamente significativas (probabilidade < 0,05) na prevalência do parasita nos ovos de cada uma das espécies ao longo dos anos analisados neste estudo, foram efetuados testes G-de-independência com a correção de Williams (Sokal & Rohlf, 1995). Sempre que ocorreram variações significativas para o conjunto das amostras, foram realizados testes STP (*Simultaneous Test Procedure*) a *posteriori* para determinar quais os subconjuntos independentes. O mesmo procedimento foi aplicado para verificar se existiam variações significativas na PEOP nos vários anos considerados. Estes testes foram efetuados com recurso ao *software* R 3.5.1.

Comparação da prevalência de infecção e PEOP para sardinha e carapau amostrados simultaneamente (variação entre espécies)

Os mesmos testes foram ainda utilizados para averiguar se existiam variações significativas, tanto na prevalência como na PEOP, entre a sardinha e o carapau, nos anos em que os dados considerados neste estudo coincidiam para as duas espécies, ocorrendo tal apenas em 2007 e 2019.

Comparação da prevalência de infecção entre sub-regiões da área de estudo (variação espacial)

Com o objetivo de comparar a prevalência do parasita nas sub-regiões da área de estudo referidas no subcapítulo 2.1.1, foram igualmente efetuados testes G-de-independência, de modo que se pudesse entender se haveria alguma região que se destacasse por ter uma maior ou menor prevalência.

2.5.3 Relação entre a distribuição espacial do parasita e fatores ambientais

Para descrever a relação existente entre a distribuição dos ovos parasitados (variável dependente) e os fatores ambientais (variáveis independentes) selecionados para este estudo (profundidade, temperatura, salinidade e estratos), foi efetuada uma análise GLM (generalized linear model). Devido à natureza dos dados (contagens com muitos zeros), foi utilizada a distribuição binomial negativa com função de ligação e o volume filtrado (o volume de água que passou pelas redes aquando da captura do plâncton) das amostras como *offset*.

A fórmula inicial do modelo descreve-se da seguinte forma:

```
glm.nb (formula = Ovos_Parasit ~ Lat + Long + Profundidade + Temperatura + offset(log(Vol_filtr)) + Salinidade + Estratos, data = fit0, init.theta = 0.05512438972, link = log)
```

Para a seleção do modelo foi utilizado o critério AIC. Os “estratos” (sub-regiões geográficas dentro da área de estudo) considerados são os referidos na secção 2.1.1, aos quais foram atribuídos os valores 1 e 2, que correspondem às regiões Golfo de Cádiz-Sagres e Sagres-Finisterra, respetivamente. O valor de

significância utilizado foi 0,05. Foram tidos em conta todos os anos em análise e o procedimento foi executado tanto para a sardinha como para o carapau. Esta análise foi efetuada com recurso ao *software* R (versão 3.5.1).

2.5.4 Deteção do parasita em gónadas de sardinha

Foram apenas analisadas 10 gónadas dos 98 indivíduos em estudo, dado que após observação das bandas obtidas no gel (após o segundo PCR) constatou-se que a amplificação foi inespecífica, isto é, foram amplificados vários fragmentos a partir do ADN extraído das gónadas, ao invés de uma banda única, como observado no controlo positivo, os ovos parasitados.

3. Resultados

3.1 O parasita na área de estudo

Após a análise e classificação dos ovos em laboratório (figs. 3.1 e 3.2) (Anexo III), calcularam-se a prevalência e a percentagem de estações com ovos parasitados.

No total foram analisadas 3007 amostras de 7 campanhas para ovos de sardinha e 1990 amostras de 5 campanhas para ovos de carapau. Foram identificados e classificados quanto ao grau de parasitação 26856 ovos de sardinha e 4292 ovos de carapau. A distribuição do número de amostras e de ovos pelos anos analisados pode ser observada nas figuras 3.3 a 3.6.

Nas figuras 3.1 e 3.2 pode observar-se a distribuição do parasita pelos 11 estádios de desenvolvimento do ovo, de sardinha e de carapau respetivamente, por níveis de parasitação (4 níveis). O menor estádio de desenvolvimento em que se observa infeção é o estádio V (infeção de nível 1 e nível 2). Pode também observar-se que todos os quatro níveis de infeção podem ser observados a partir do estádio VI e até ao estádio XI.

De um modo geral, também se observa que os estádios de desenvolvimento maior, independentemente do nível, apresentam mais parasitação.

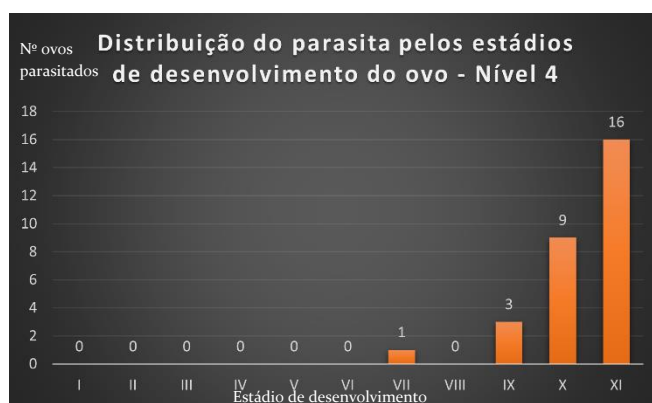


Figura 3. 1- Distribuição do parasita pelos 11 estádios de desenvolvimento dos ovos de sardinha e por níveis de parasitação (1 ao 4) em todos os anos analisados, conjuntamente.

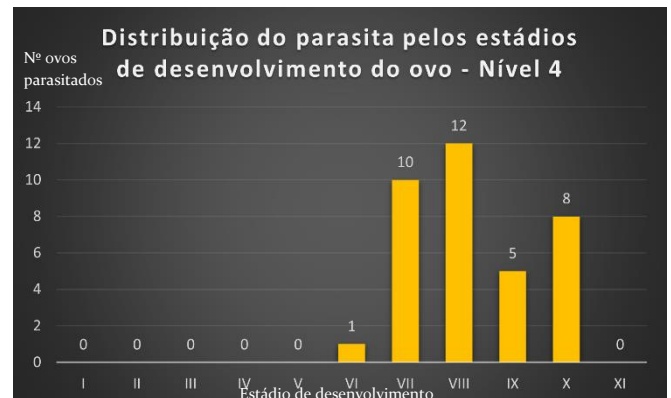
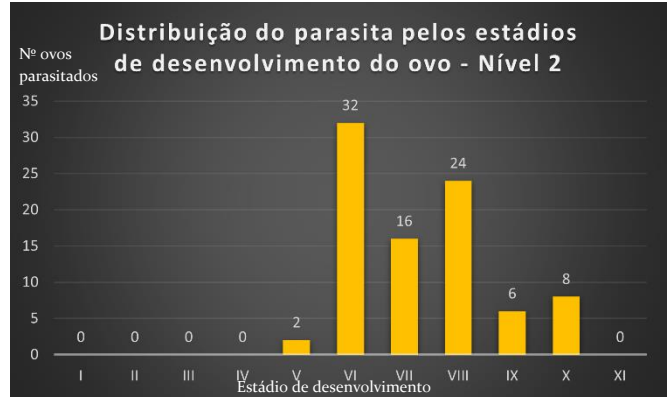


Figura 3. 2- Distribuição do parasita pelos 11 estádios de desenvolvimento dos ovos de carapau e por níveis de parasitação (1 ao 4) em todos os anos analisados, conjuntamente.

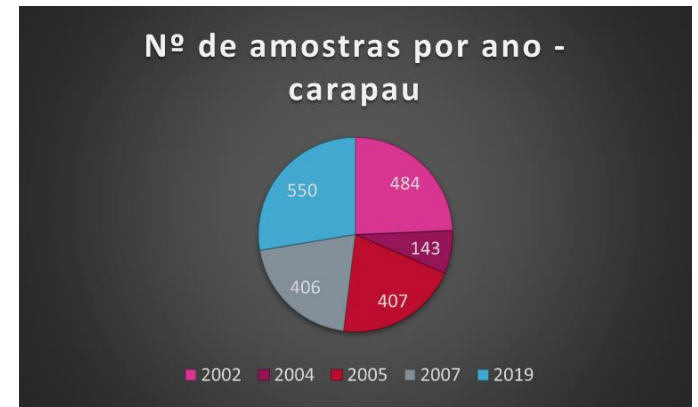
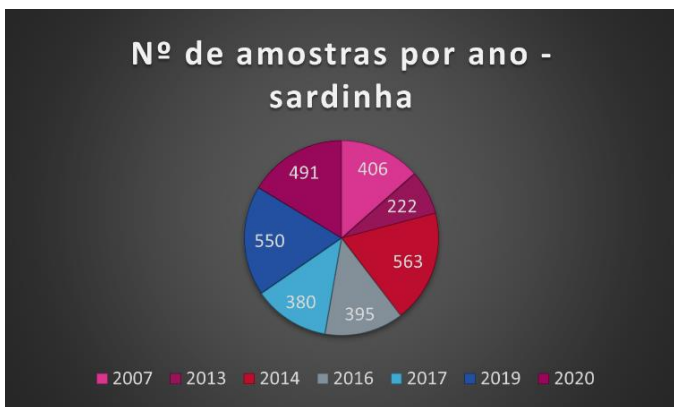


Figura 3. 3- Número de amostras de cada ano de campanha analisada-sardinha.

Figura 3.4- Número de amostras por cada ano de campanha analisada – carapau.



Figura 3. 5- Número de ovos de sardinha analisados por ano de campanha.

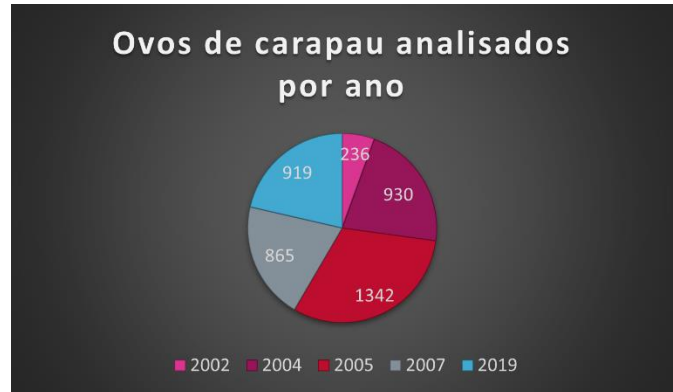


Figura 3. 6- Número de ovos de carapau analisados por ano de campanha.

3.1.1 Prevalência de ovos parasitados e percentagem de estações com ovos parasitados (PEOP)

3.1.1.1 Sardinha

No caso dos ovos de sardinha, analisados para os anos 2007, 2013, 2014, 2016, 2017, 2019 e 2020, obteve-se uma prevalência máxima de 4,32% em 2013, e uma prevalência mínima de 0,80% em 2017. Relativamente à PEOP, obteve-se um máximo de 15,32% em 2013 e um mínimo de 2,53% em 2016 (fig. 3.7). De um modo geral, um aumento da PEOP ocorre quando se verifica um aumento da prevalência, já que o crescimento ou diminuição das duas barras tem a mesma tendência de variação. Por outro lado, não parece existir uma tendência de variação destes fatores ao longo do tempo, uma vez que os mesmos não apresentam nenhum padrão evidente, apesar de se registar um incremento de ambos nos últimos dois anos analisados (2019 e 2020).

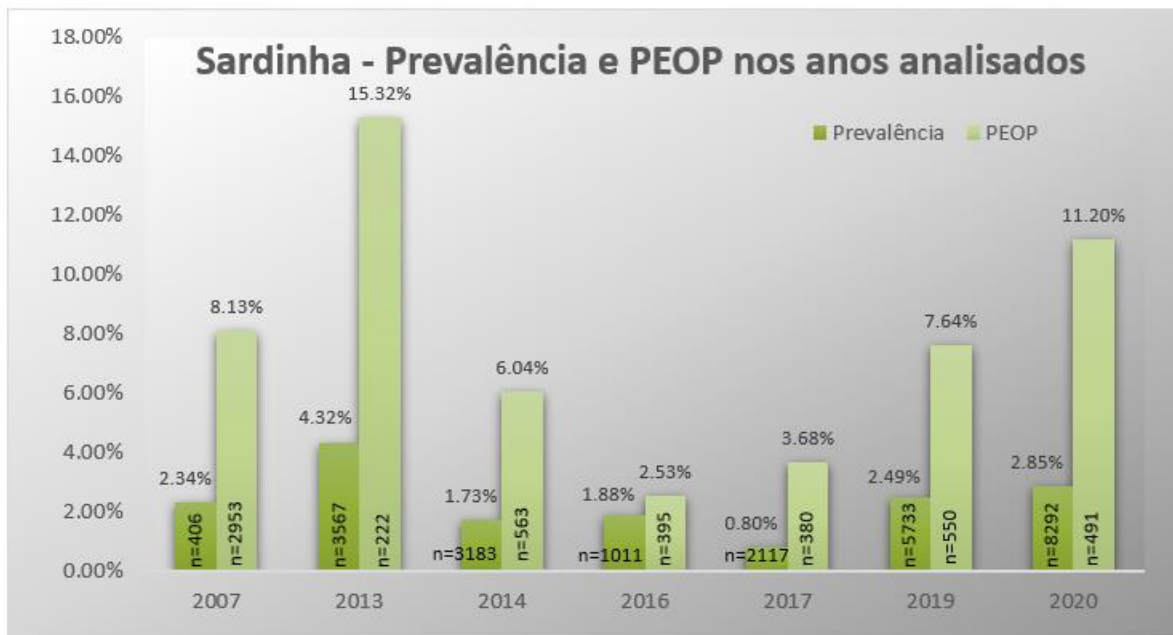


Figura 3. 7- Prevalência (nº de ovos parasitados/nº de ovos total) e PEOP (nº de estações com ovos parasitados/nº de estações total) para a sardinha nos anos analisados. n- número de ovos ou amostras.

3.1.1.2 Carapau

Para os ovos de carapau, analisados nos anos de 2002, 2004, 2005, 2007 e 2019, foi estimada uma prevalência máxima de 10,97% em 2004 e uma prevalência mínima de 0,82% em 2005. A PEOP apresentou um máximo de 12,59% em 2004 e um mínimo de 2,00% em 2019 (fig 3.8). De forma semelhante ao observado para sardinha, o aumento ou a diminuição da PEOP acompanha a prevalência, não existindo neste caso qualquer tendência positiva ou negativa em nenhum dos anos.

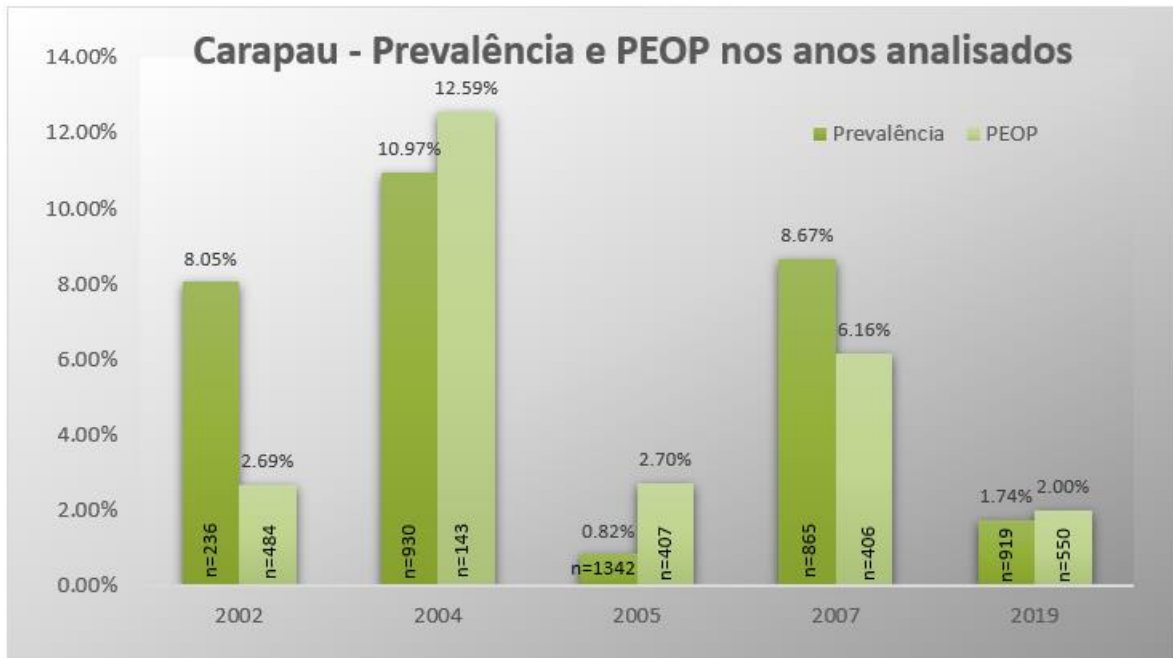


Figura 3. 8- Prevalência (nº de ovos parasitados/nº de ovos total) e PEOP (nº de estações com ovos parasitados/nº de estações total) para o carapau nos anos analisados. n- número de ovos ou amostras.

As campanhas para as quais se obtiveram resultados de infecção por *Ichthyodinium chabelardi* em ovos de sardinha e carapau em simultâneo foram nos anos 2007 e 2019 e pode observar-se que em 2007 os ovos de carapau apresentaram uma maior prevalência (8,67% comparando com os 2,34% da sardinha), no entanto a sua PEOP foi menor que a da sardinha. Já no ano de 2019 a sardinha apresentou uma maior prevalência (2,49% comparando com os 1,74% do carapau) e um maior PEOP.

3.1.2 Análise da Prevalência e PEOP

3.1.2.1 Sardinha

O teste G-de-independência demonstrou existirem variações estatisticamente significativas na prevalência do parasita nos ovos de sardinha nos anos em estudo. A tabela 3.1 mostra que a prevalência no ano de 2013 diferiu de todos os restantes, destacando-se por apresentar uma maior prevalência (4,32%) (fig. 3.5). A prevalência no ano de 2017 (para além de 2013) diferiu também da prevalência de 2007, 2019 e 2020, pois mostrou uma menor prevalência (0,80%) quando comparada com os anos referidos. Em 2020 a prevalência diferiu ainda, igualmente, da estimada para 2014, sendo maior que a deste último (2,85%).

Analisando a tabela 3.2, que contém os resultados do teste G-de-independência executado com os valores da PEOB para a mesma relação parasitária, infere-se que o valor do ano de 2013 se distinguiu significativamente de todos os outros, exceto de 2007 e 2020, pelo facto de neste se ter observado uma maior PEOB (15,32%) (fig.3.5), e que tal aconteceu também entre 2016 (para além de 2013) e 2007, 2019 e 2020, sendo que neste caso a PEOB de 2016 apresenta um valor mais baixo(2,53%). Existiram ainda variações estatisticamente significativas entre os valores da PEOB de 2017 e 2020, distinguindo-se este último por apresentar uma maior PEOB (11,20%).

Tabela 3. 1- Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência do parasita em estudo nos ovos de sardinha, nos anos analisados (probabilidade<0,05). A vermelho encontram-se representados os valores estatisticamente significativos.

	2007	2013	2014	2016	2017	2019
2013	<0,001	-	-	-	-	-
2014	1,000	<0,001	-	-	-	-
2016	1,000	0,002	1,000	-	-	-
2017	<0,001	<0,001	0,069	0,243	-	-
2019	1,000	<0,001	0,349	1,000	<0,001	-
2020	1,000	0,001	0,008	1,000	<0,001	1,000

Tabela 3. 2- Resultados do teste G-de-independência para comparação da PEOB do parasita em estudo nos ovos de sardinha, nos anos analisados (probabilidade<0,05). A vermelho encontram-se representados os valores estatisticamente significativos.

	2007	2013	2014	2016	2017	2019
2013	0,137	-	-	-	-	-
2014	1,000	0,001	-	-	-	-
2016	0,007	<0,001	0,179	-	-	-
2017	0,168	<0,001	1,000	1,000	-	-
2019	1,000	0,039	1,000	0,009	0,225	-
2020	1,000	1,000	0,057	<0,001	<0,001	1,000

3.1.2.2 Carapau

O teste G-de-independência efetuado para os dados de prevalência do parasita nos ovos de carapau (tabela 3.3) evidenciou que os valores do ano de 2005 se distinguiram de todos os outros, exceto 2019, por apresentar uma prevalência significativamente menor (0,82%) (fig.3.2). Em 2019, por sua vez, também a prevalência variou em relação à estimada para restantes anos, exceto para 2005, pela mesma razão (prevalência= 1,74%).

A tabela 3.4, com os resultados do teste G-de-independência realizado com os valores da PEOP no caso dos ovos de carapau mostrou que a métrica PEOP de 2004 se distinguiu estatisticamente de todos os outros, exceto de 2007, devido a apresentar uma maior PEOP (12,69%) e que 2007 também variou significativamente em relação a 2019, por apresentar também uma maior PEOP (6,16%).

Tabela 3. 3- Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência do parasita em estudo nos ovos de carapau, nos anos analisados (probabilidade<0,05). A vermelho encontram-se representados os valores estatisticamente significativos.

	2002	2004	2005	2007
2004	1,000	-	-	-
2005	<0,001	<0,001	-	-
2007	1,000	1,000	<0,001	-
2019	<0,001	<0,001	0,525	<0,001

Tabela 3. 4- Resultados do teste G-de-independência para comparação da PEOP do parasita em estudo nos ovos de carapau, nos anos analisados (probabilidade<0,05). A vermelho encontram-se representados os valores estatisticamente significativos.

	2002	2004	2005	2007
2004	<0,001	-	-	-
2005	1,000	<0,001	-	-
2007	0,111	0,197	0,160	-
2019	1,000	<0,001	1,000	0,009

3.1.2.3 Seleção de hospedeiro por *Ichthyodinium chabelardi*

Para as campanhas de 2007 e 2019 foi possível avaliar a presença de ovos infetados e calcular a prevalência e PEOP para sardinha e carapau nas mesmas amostras (figs. 3.5 e 3.6). Os resultados obtidos e a análise estatística (tabela 3.5) realizada mostraram não existir uma tendência para maior percentagem de infeção para qualquer uma das espécies em estudo, já que os testes G-de-independência não mostraram qualquer diferença estatisticamente significativa para qualquer um dos parâmetros, nos dois anos tidos em conta. O parasita *Ichthyodinium chabelardi* não parece ser seletivo quanto ao hospedeiro que utiliza.

Tabela 3. 5- Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência e PEOP do parasita em estudo nos ovos de sardinha e carapau, nos anos analisados comuns às duas espécies (probabilidade<0,05).

	PEOP	Prevalência
2007	G = 0,263, X ² , gdl = 1, p = 0,608	G = 3,704, X ² , gdl = 1, p = 0,054
2019	G = 3,346, X ² , gdl = 1, p = 0,067	G = 0,120, X ² , gdl = 1, p = 0,730

3.1.3 Distribuição dos ovos parasitados na área de estudo

As campanhas analisadas não incluíram exatamente o mesmo número de estações amostradas, no entanto, em todos os anos, a área de estudo variou entre Cádiz-Caminha (campanhas dirigidas a sardinha) ou Cádiz-Finisterra (campanhas dirigidas a carapau). É evidente pelas distribuições apresentadas nos mapas dos subcapítulos 3.1.3.1 e 3.1.3.2, que existiu uma grande variação espacial na abundância de ovos de sardinha e carapau, bem como nas localizações das estações onde foram capturados ovos das espécies alvo. O número de estações onde foram capturados ovos parasitados, das duas espécies, também variou bastante entre as campanhas de amostragem.

3.1.3.1 Sardinha

A nível espacial, apesar de os ovos de sardinha ocorrerem por toda a área de estudo, é possível destacar as zonas entre Cádiz e Punta Umbria e entre Aveiro e o Porto, como tendo mais ovos parasitados recorrentemente nos anos analisados (figs. 3.9 a 3.15).

3.1.3.2 Carapau

Tal como observado para os ovos de sardinha, a distribuição dos ovos de carapau parasitados não evidenciou um padrão regular entre campanhas, tendo sido observados ovos parasitados em toda a área de estudo, apesar de os ovos parasitados serem mais constantes na região sudoeste da área de estudo, entre Sagres e Vila Nova de Milfontes (figs 3.16 a 3.20).

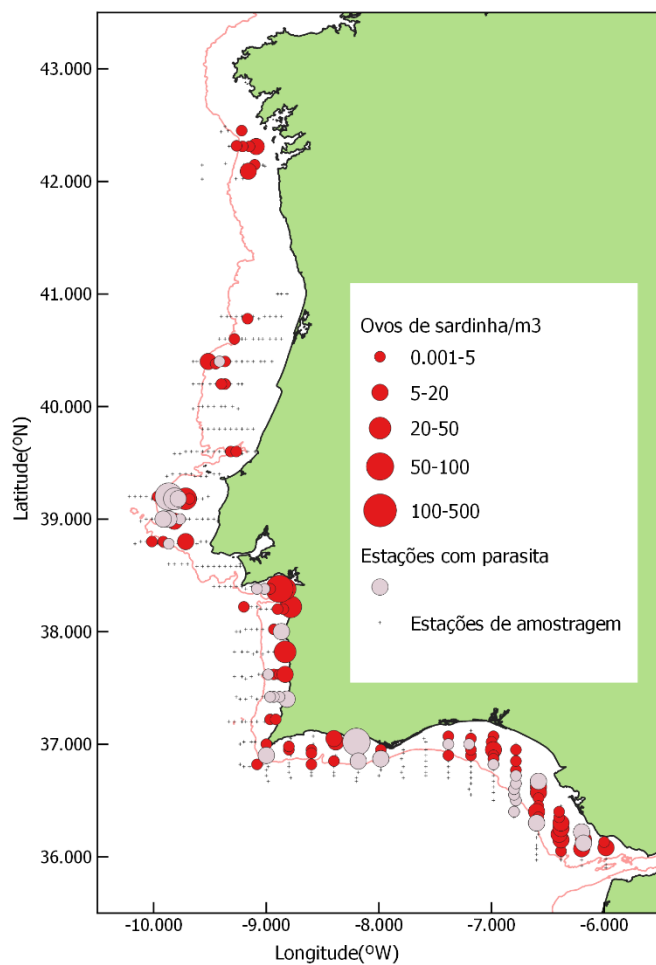


Figura 3. 9- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2007. Os círculos são proporcionais à abundância.

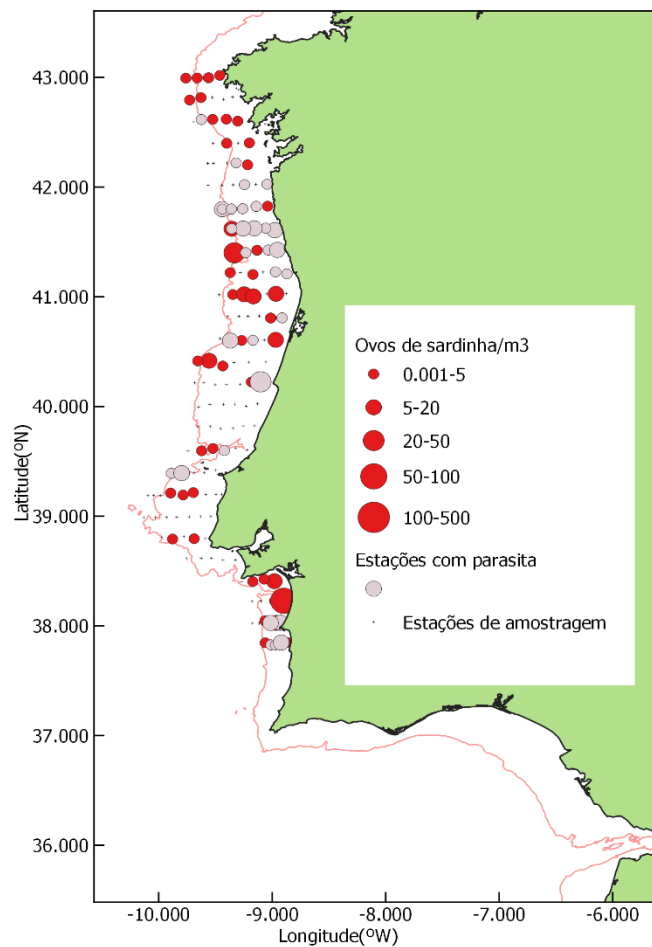


Figura 3. 10- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2013. Os círculos são proporcionais à abundância.

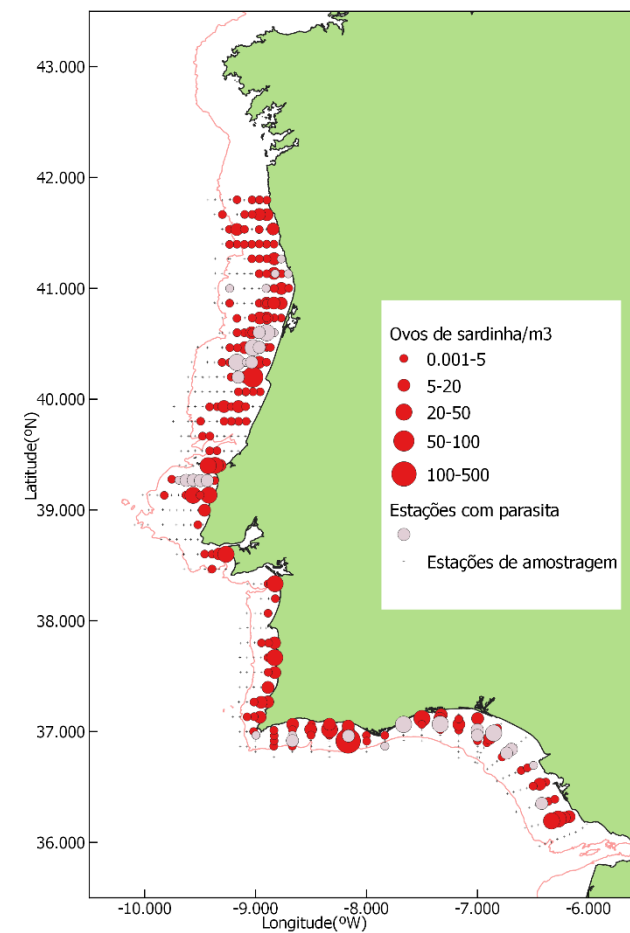


Figura 3. 11- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2014. Os círculos são proporcionais à abundância.

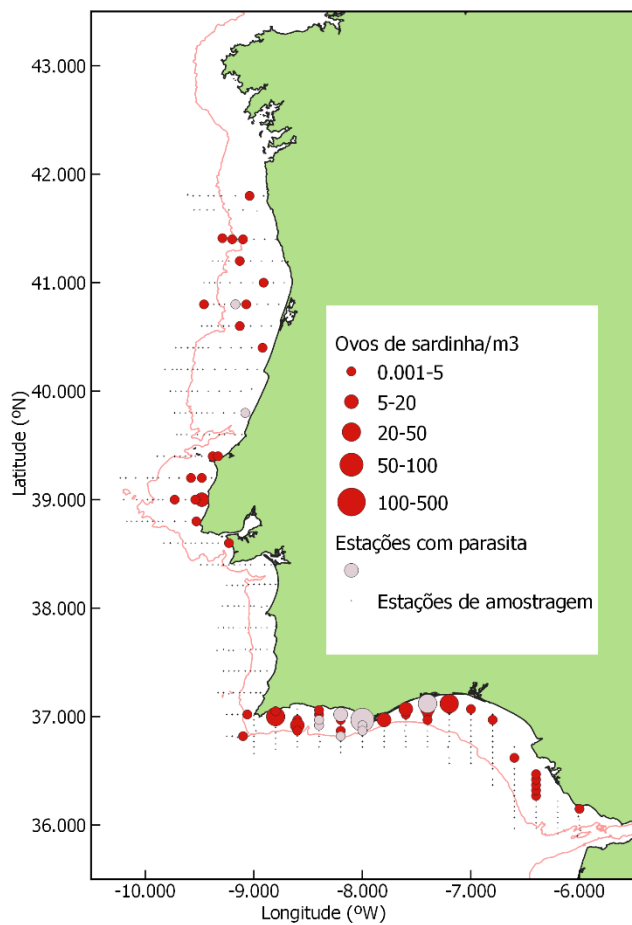


Figura 3. 12- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2016. Os círculos são proporcionais à abundância.

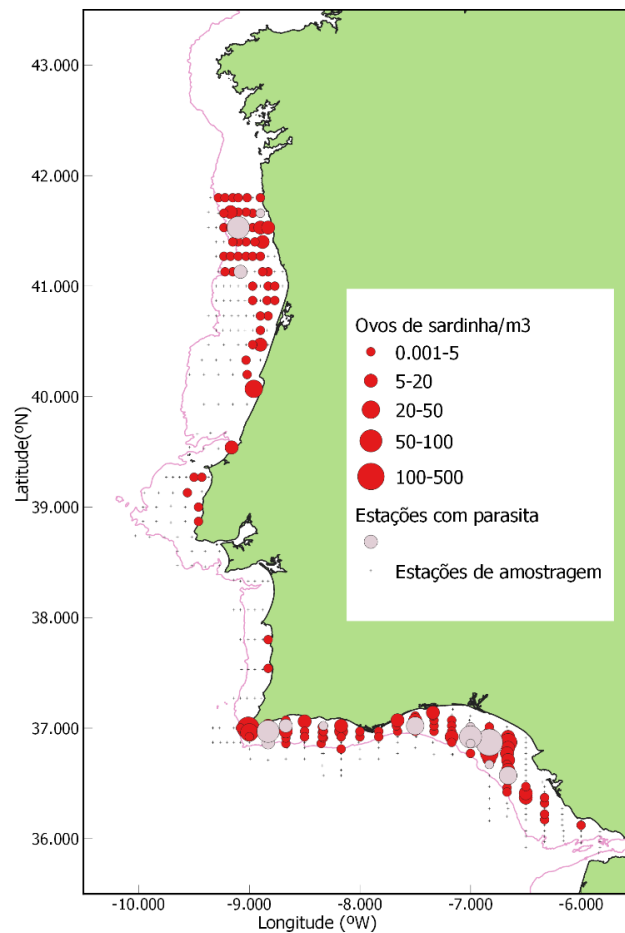


Figura 3. 13- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2017. Os círculos são proporcionais à abundância.

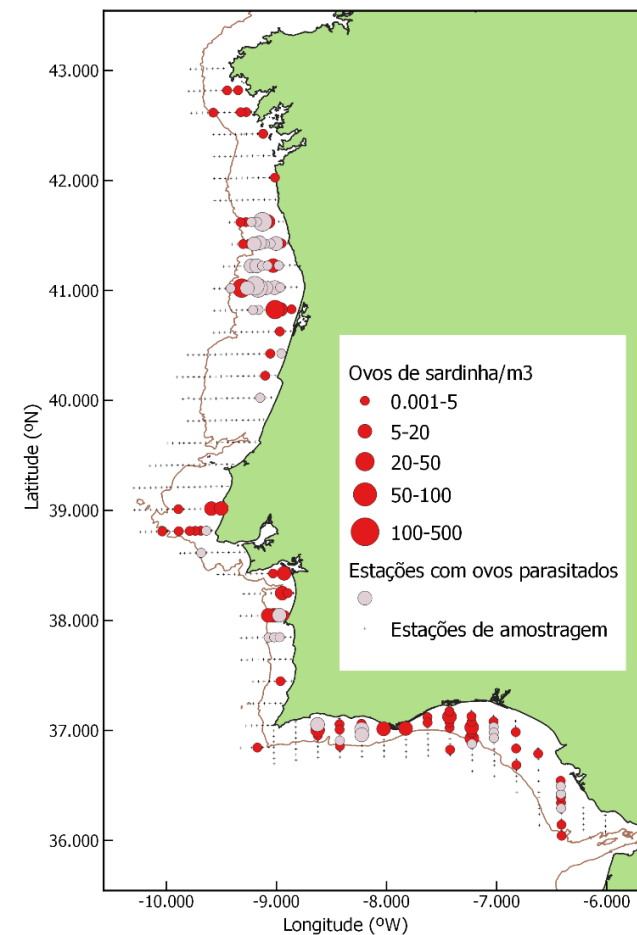


Figura 3. 14- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2019. Os círculos são proporcionais à abundância.

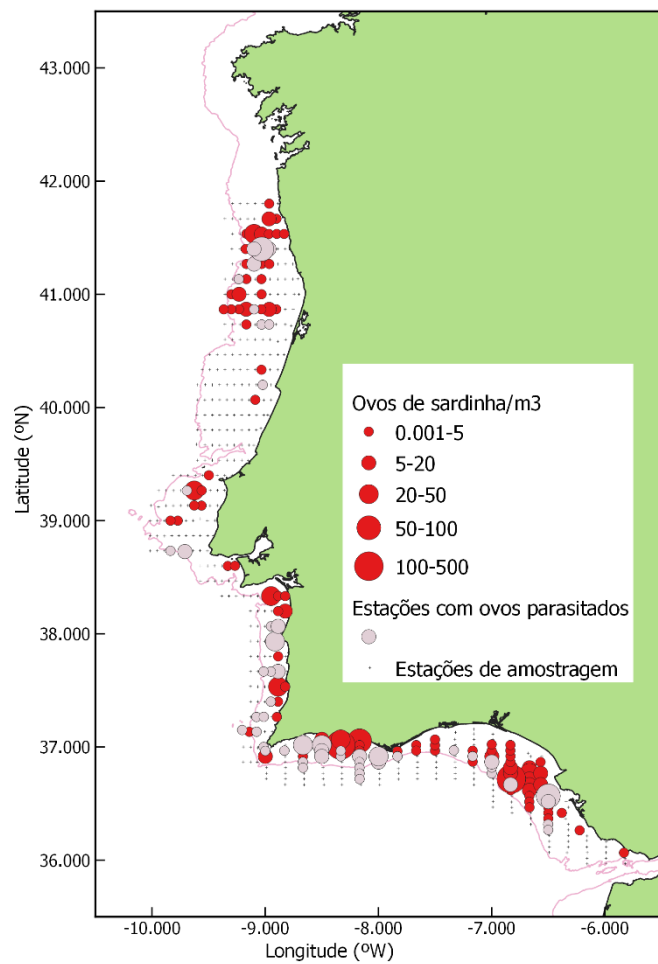


Figura 3. 15- Distribuição de abundância de ovos de sardinha incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2020. Os círculos são proporcionais à abundância.

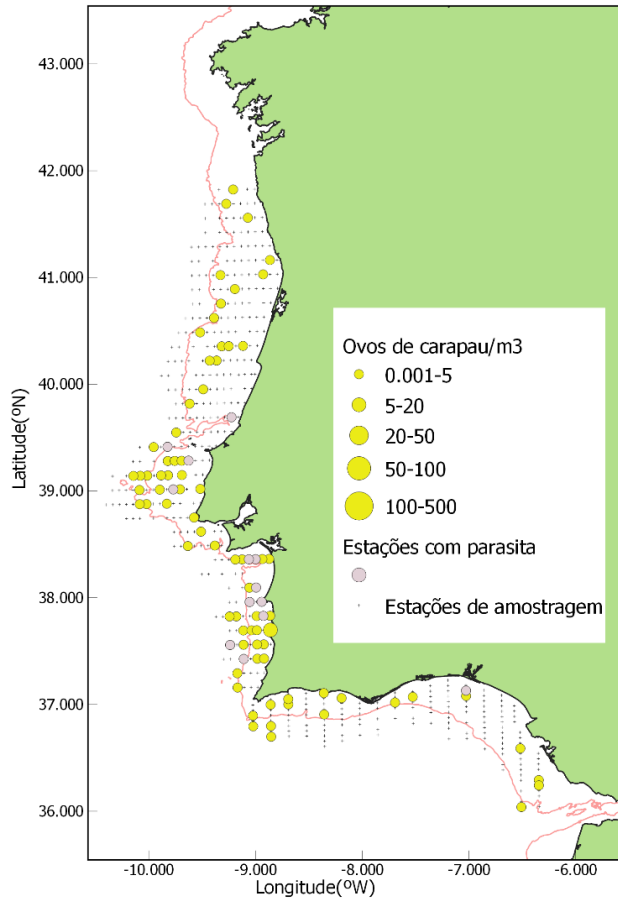


Figura 3. 16- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2002. Os círculos são proporcionais à abundância.

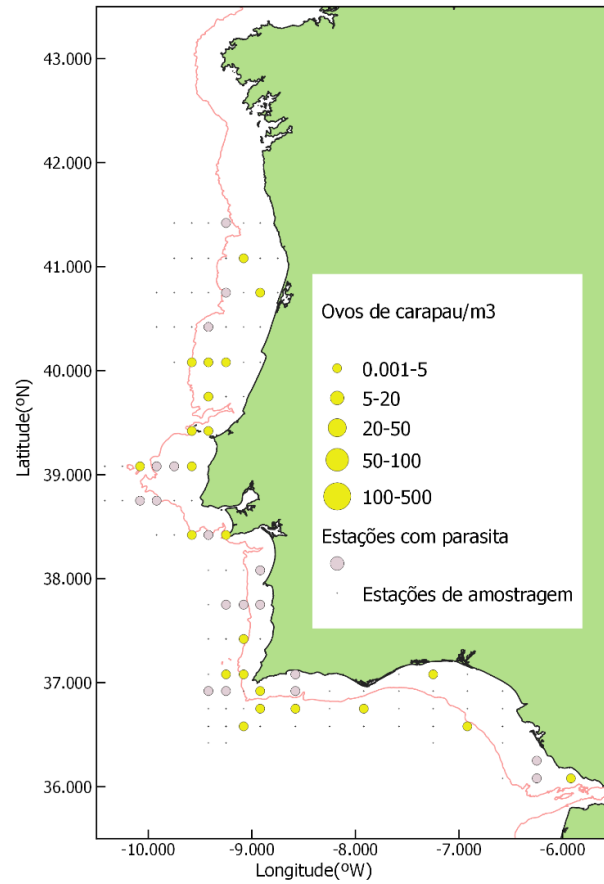


Figura 3. 17- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2004. Os círculos são proporcionais à abundância.

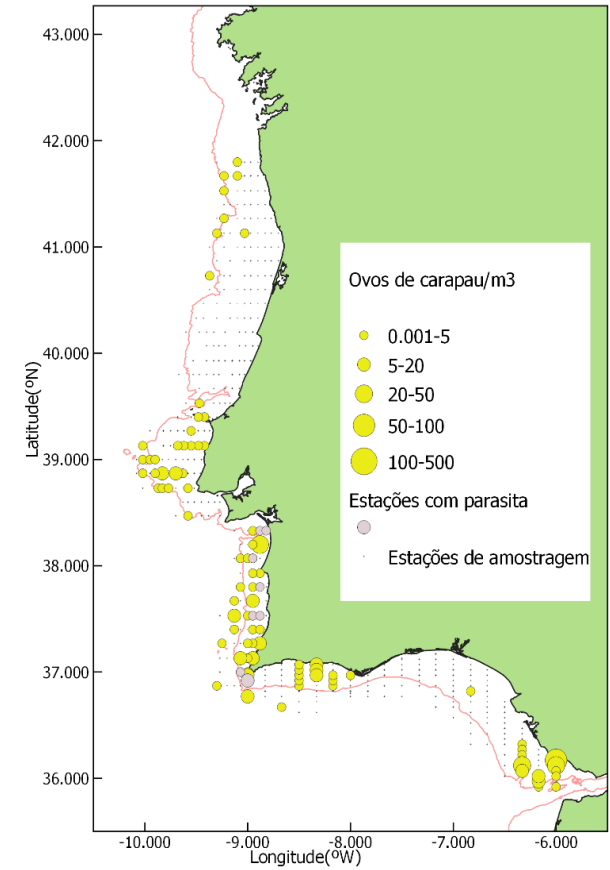


Figura 3. 18- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2005. Os círculos são proporcionais à abundância.

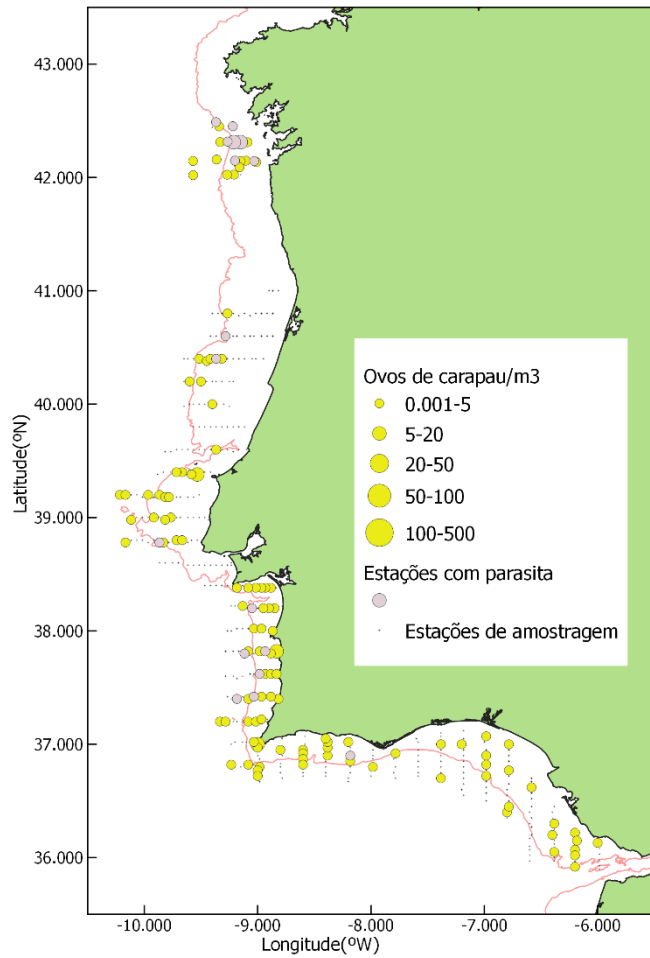


Figura 3. 19- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2007. Os círculos são proporcionais à abundância.

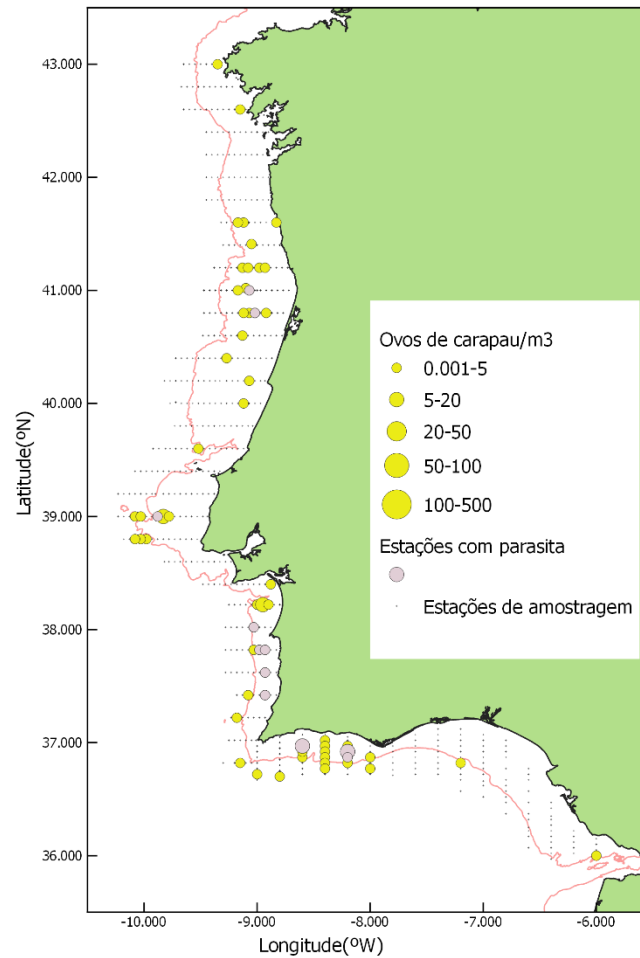


Figura 3. 20- Distribuição de abundância de ovos de carapau incluindo os ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi* (a cinzento) durante a campanha de 2019. Os círculos são proporcionais à abundância.

3.1.4 Prevalência dos ovos parasitados em três subdivisões da área de estudo

Com o objetivo de avaliar a proporção de ovos parasitados a nível espacial e fazer uma comparação inter-anual, a área de estudo foi dividida em três secções (Golfo de Cádiz-Sagres, Sagres-Canhão da Nazaré, Canhão da Nazaré-Finisterra), tal como descrito na metodologia (subsecção 2.1.1). Foram efetuados testes G-de-independência para comparar a prevalência do parasita em cada uma das secções (figs. 3.21 a 3.32), nos ovos das espécies-alvo, de modo que se pudesse entender se haveria alguma região que se destacasse por ter uma maior ou menor prevalência.

No caso dos ovos de sardinha, apenas se verificaram variações estatisticamente significativas nos anos de 2007, em que a região Canhão da Nazaré-Finisterra se destaca por apresentar uma menor prevalência (0,28%), 2014, em que a região Sagres-Canhão da Nazaré apresenta variações significativas relativamente à região Cádiz-Sagres, por ter uma menor prevalência (0,94% comparado com 2,46%, respetivamente), e 2020, em que mais uma vez se destaca a região Canhão da Nazaré-Finisterra por apresentar uma menor prevalência (1,27%).

Relativamente aos ovos de carapau, as variações estatisticamente significativas foram observadas nos anos de 2004, em que a região Canhão da Nazaré-Finisterra apresenta variações significativas, por apresentar uma maior prevalência (27,82%), e 2007 em que é a região Cádiz-Sagres que se destaca, neste caso por apresentar uma prevalência de parasitismo menor (1,10%) quando comparada com as outras duas regiões.

O que se pode concluir através da análise dos resultados destes testes (tabela 3.6) é que não existem variações muito evidentes entre as três regiões em relação a este parâmetro, uma vez que apenas em alguns anos se identificaram dissemelhanças. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos, pode inferir-se que a região que mostra uma maior independência relativamente às outras duas é a do Canhão da Nazaré-Finisterra.

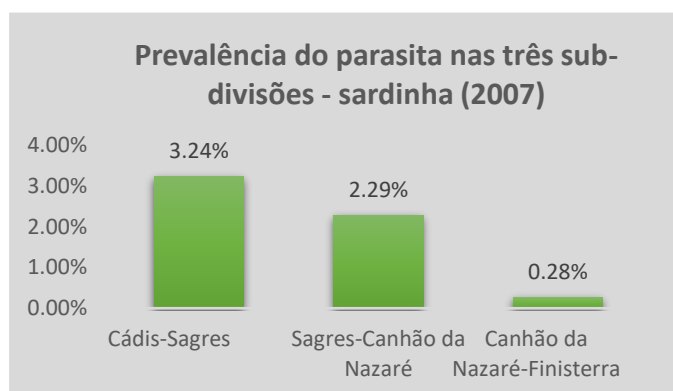


Figura 3. 21- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2007.

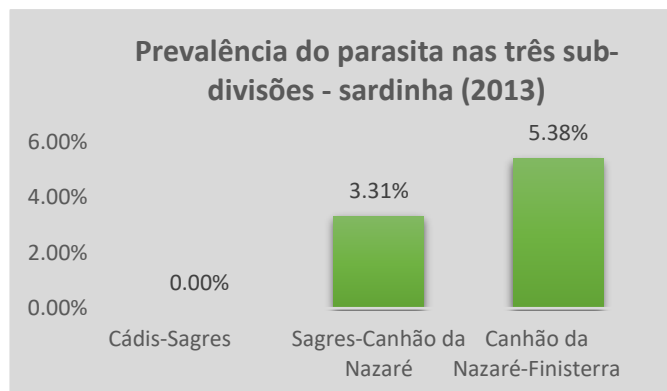


Figura 3. 22- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2013.

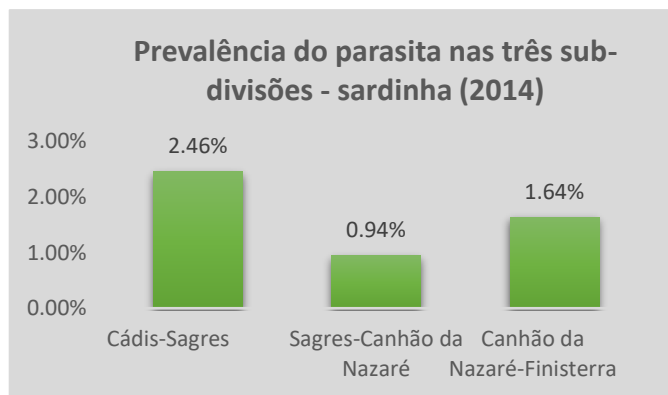


Figura 3. 23- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2014.

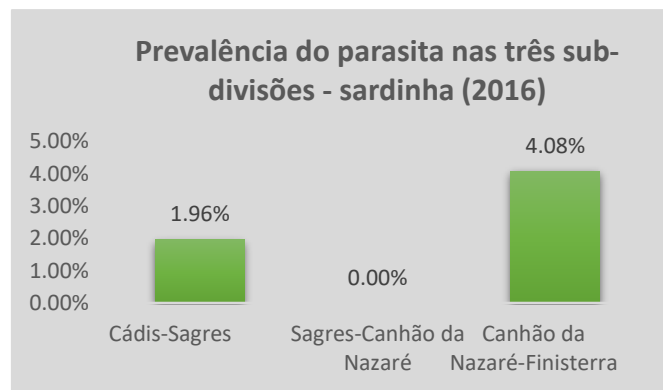


Figura 3. 24- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2016.

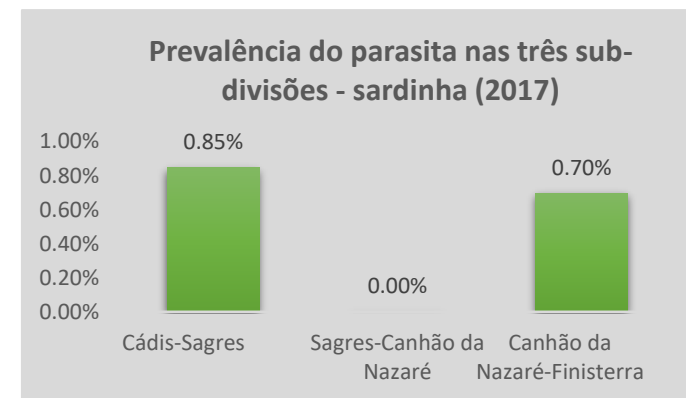


Figura 3. 25- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha – 2017.

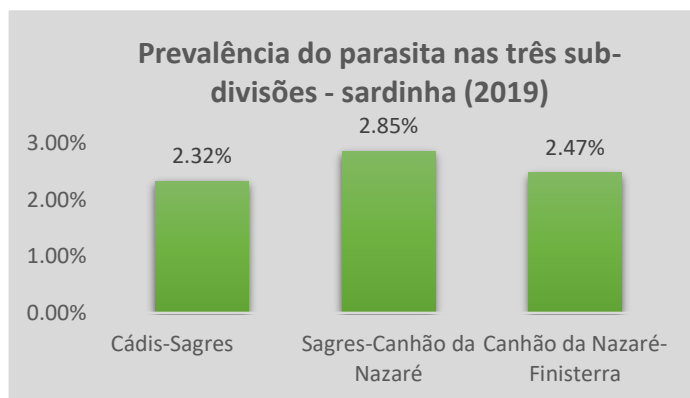


Figura 3. 26- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha - 2019.

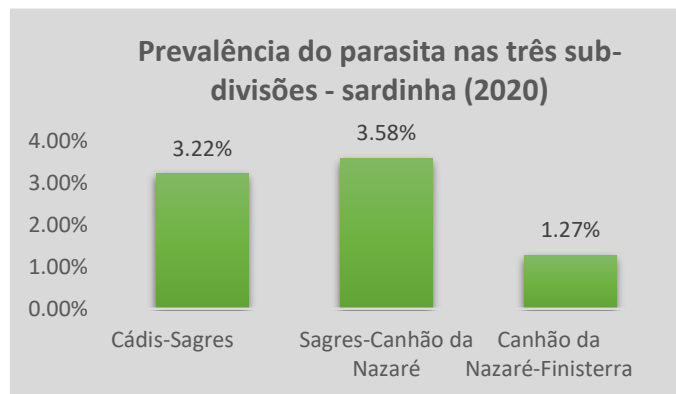


Figura 3. 27- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de sardinha-2020.

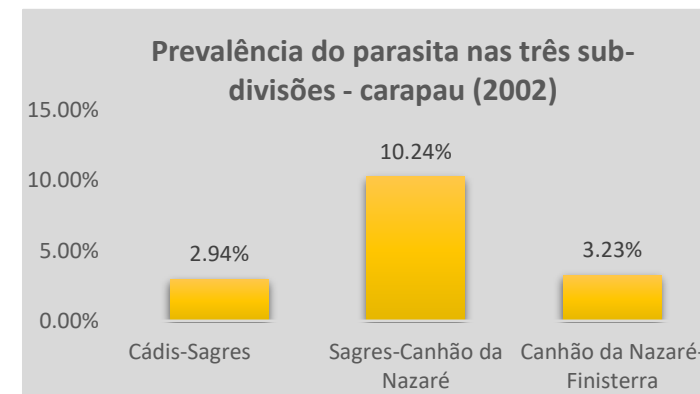


Figura 3. 28- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau- 2002.

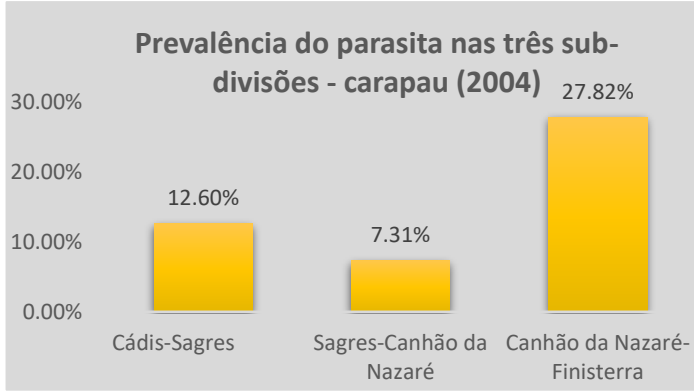


Figura 3. 29- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2004.

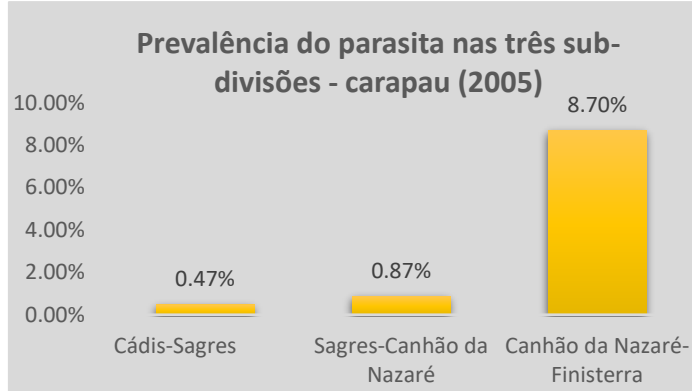


Figura 3. 30- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2005.

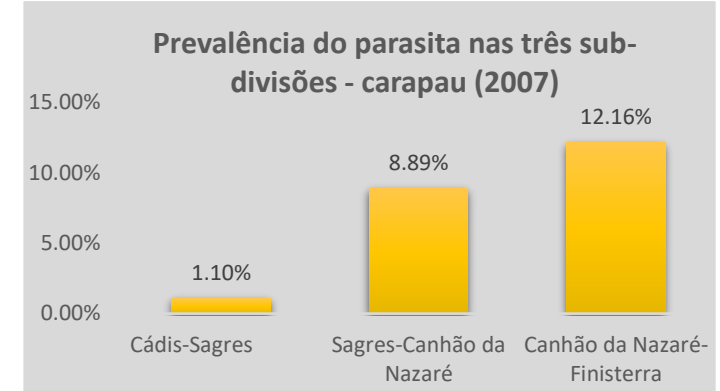


Figura 3. 31- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2007.

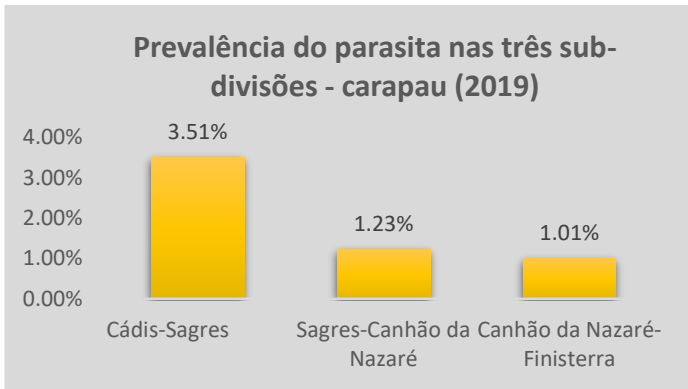


Figura 3. 32- Prevalência do parasita nas três subdivisões da área de estudo nos ovos de carapau - 2019.

Tabela 3. 6- Resultados do teste G-de-independência para comparação da prevalência do parasita em estudo nas três divisões da área de estudo (probabilidade<0,05). A vermelho encontram-se representados os valores estatisticamente significativos entre os anos.

Sardinha		Cádiz-Sagres	Sagres-Canhão da Nazaré
2007	Sagres-Canhão da Nazaré	0,462	-
	Canhão da Nazaré-Finisterra	<0,001	0,008
2014	Sagres-Canhão da Nazaré	0,049	-
	Canhão da Nazaré-Finisterra	0,375	0,658
2020	Sagres-Canhão da Nazaré	1,000	-
	Canhão da Nazaré-Finisterra	<0,001	<0,001
Carapau		Cádiz-Sagres	Sagres-Canhão da Nazaré
2004	Sagres-Canhão da Nazaré	0,184	-
	Canhão da Nazaré-Finisterra	0,006	<0,001
2007	Sagres-Canhão da Nazaré	<0,001	-
	Canhão da Nazaré-Finisterra	<0,001	0,596

3.2 Síntese dos valores dos fatores ambientais selecionados

São apresentados nesta secção os valores dos fatores ambientais e geográficos selecionados nas estações de amostragem analisadas nos vários anos em estudo, sendo os mesmos relacionados com as densidades de ovos e ovos parasitados para cada espécie e por estrato.

Profundidade

As profundidades variaram, em todas as estações (com e sem ovos), em todos os anos de análise, entre os 7,5 e os 2043m, no caso dos ovos de sardinha e entre os 8 e os 2730m no caso dos ovos de carapau (Anexo IV).

Para construir diagramas de caixa que mostrassem os resultados de forma mais adequada, foram retirados os valores das estações com profundidades superiores a 300m, pois estes constituíam registos extremos sem particular interesse para as análises a efetuar.

Tendo em conta os gráficos que mostram a profundidade dos locais a que foram recolhidos ovos de sardinha (fig. 3.33), pode observar-se que o estrato 2 apresenta, de modo geral, profundidades maiores. Quando comparadas as profundidades das estações com todos os ovos (parasitados e não parasitados) e as profundidades das estações onde se encontraram ovos parasitados, não se observa uma grande dissemelhança em nenhum dos estratos.

Nos gráficos que mostram a profundidade a que foram recolhidos ovos de carapau (fig. 3.34) pode observar-se novamente que o estrato 2 apresenta, na sua maioria, profundidades maiores. Comparando as profundidades das estações com todos os ovos e as profundidades das estações onde se encontraram

ovos parasitados, a única variação relevante aparente ocorreu no ano de 2005, no estrato 1, onde as estações com ovos parasitados apresentam uma profundidade tendencialmente superior que as estações com todos os ovos.

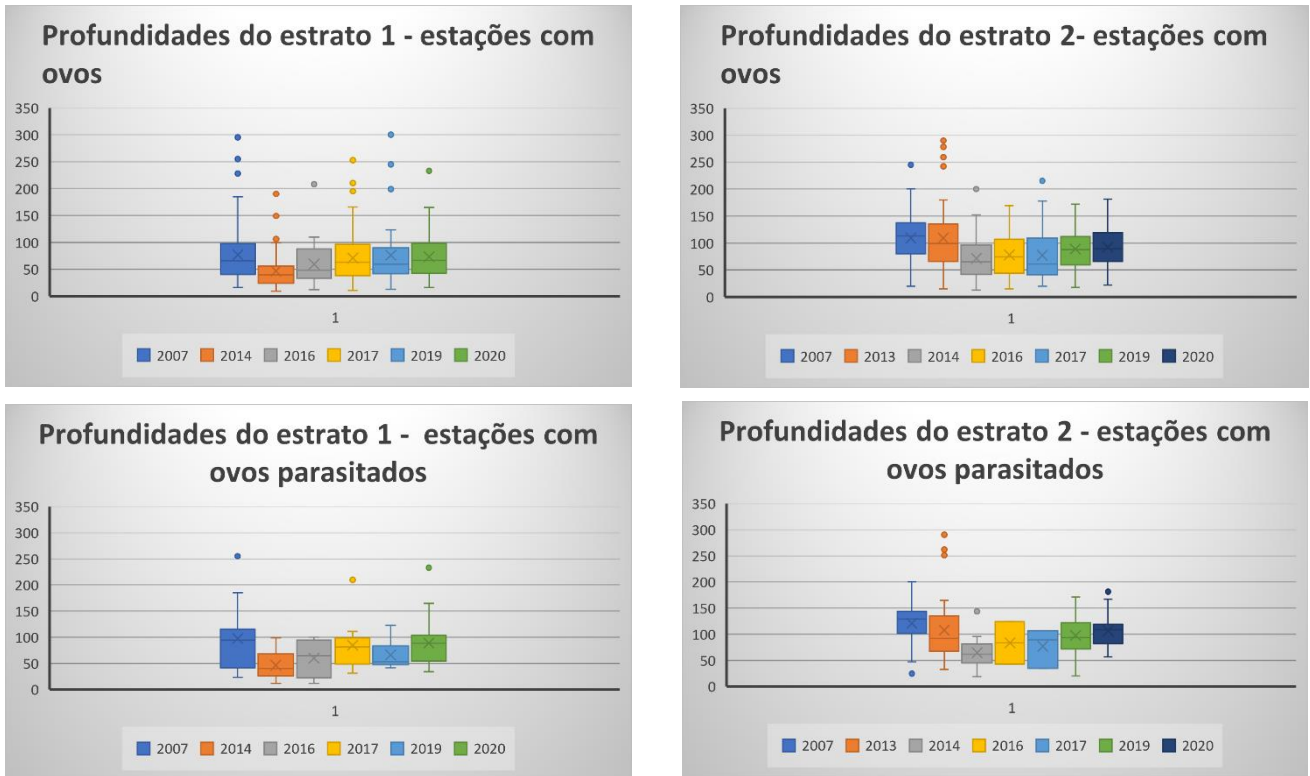


Figura 3. 33- Profundidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de sardinha, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra). Nestes gráficos encontram-se representadas as medianas, os máximos e mínimos e o 1º e o 3º quartil dos dados analisados.

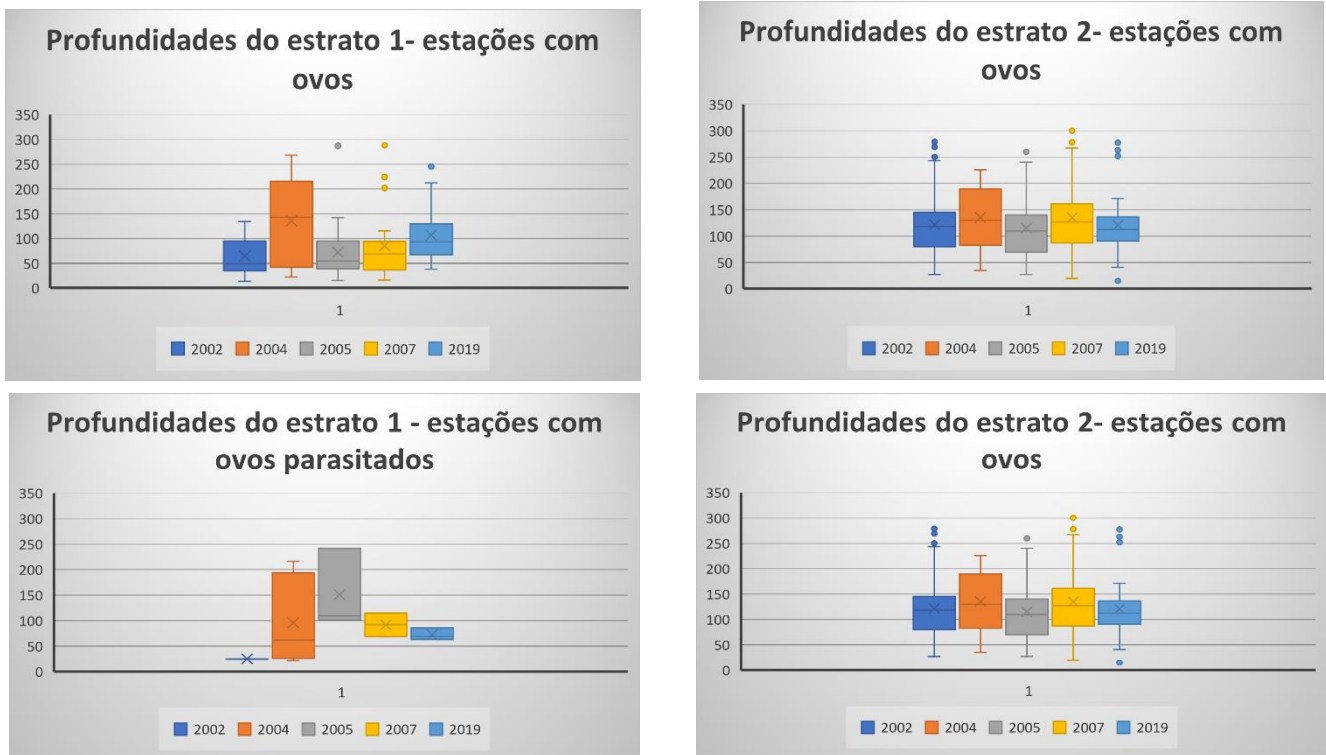


Figura 3. 34- Profundidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de carapau, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra). Nestes gráficos encontram-se representadas as medianas, os máximos e mínimos e o 1º e o 3º quartil dos dados analisados.

Temperatura

As temperaturas variaram, em todas as estações (com e sem ovos), em todos os anos de análise, entre os 12,1 e os 20,5°C, no caso dos ovos de sardinha e entre os 11,6 e 17,2°C no caso dos ovos de carapau (Anexo IV).

Tendo em conta os gráficos que mostram a temperatura a que foram recolhidos ovos de sardinha (fig. 3.35), pode observar-se que o estrato 2 apresenta temperaturas ligeiramente mais baixas. Quando comparadas as temperaturas das estações com todos os ovos (parasitados e não parasitados) e as temperaturas das estações onde se encontraram ovos parasitados, a dissimilaridade mais clara ocorreu no estrato 2, no ano de 2016, quando as temperaturas das estações em que foram encontrados ovos parasitados foram tendencialmente mais elevadas.

Nos gráficos que mostram a temperatura a que foram recolhidos ovos de carapau (fig. 3.36) pode observar-se que os dois estratos apresentaram temperaturas semelhantes, exceto no ano de 2004, quando o estrato 2 apresentou temperaturas relativamente mais baixas. Comparando as temperaturas das estações com todos os ovos e as temperaturas das estações onde se encontraram ovos parasitados, não se detetam variações relevantes.

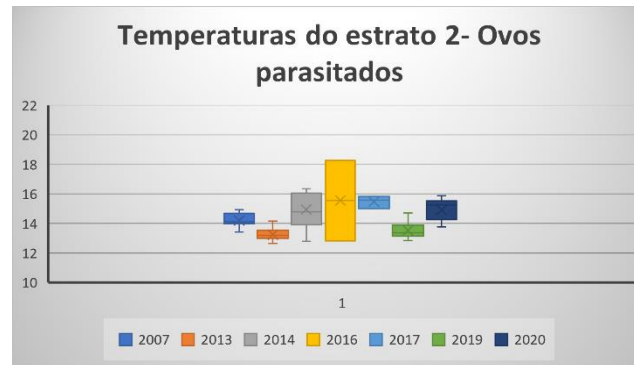
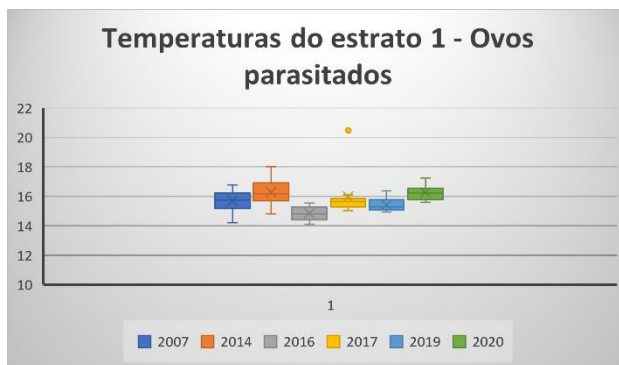
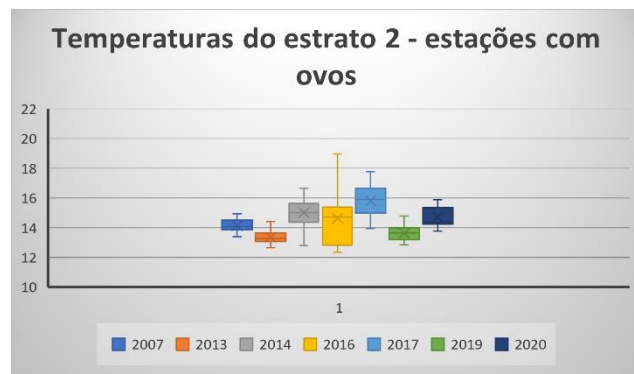
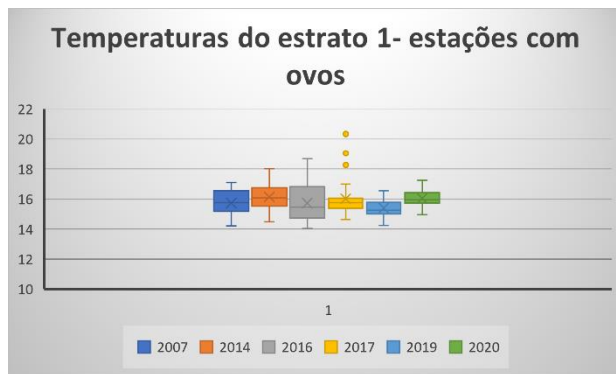


Figura 3. 35- Temperaturas das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de sardinha, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra). Nestes gráficos encontram-se representadas as medianas, os máximos e mínimos e o 1º e o 3º quartil dos dados analisados.

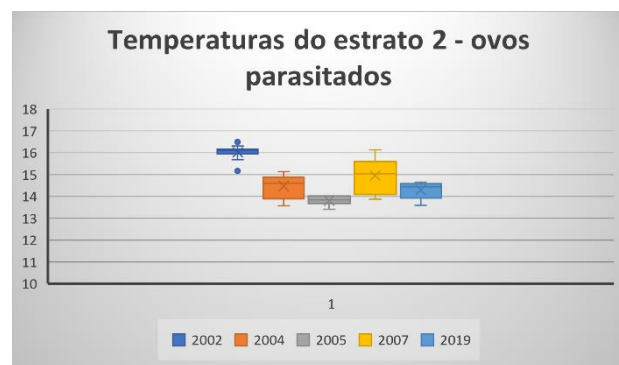
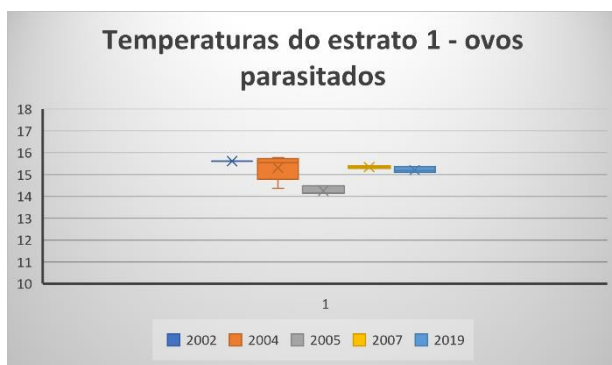
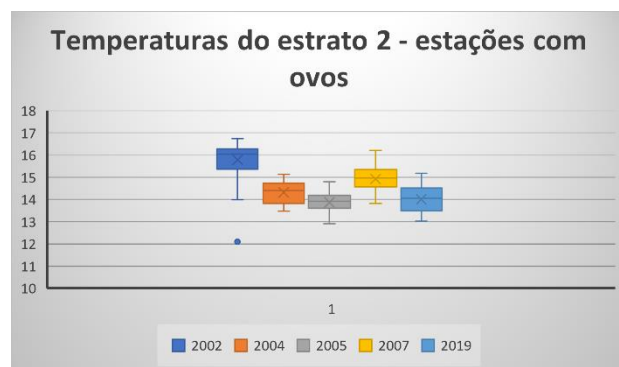
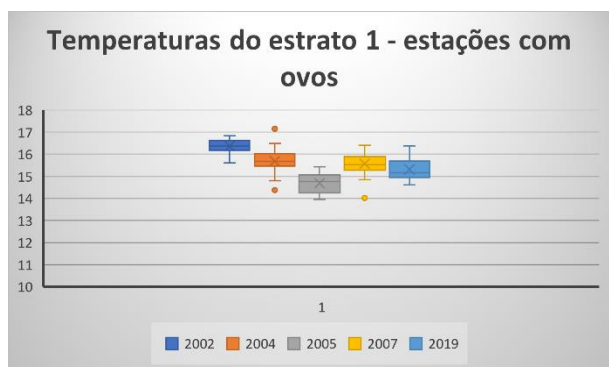


Figura 3. 36- Temperaturas das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de carapau, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra). Nestes gráficos encontram-se representadas as medianas, os máximos e mínimos e o 1º e o 3º quartil dos dados analisados.

Salinidade

As salinidades variaram, em todas as estações (com e sem ovos), em todos os anos de análise, entre os 28,5 e 36,5, no caso dos ovos de sardinha e entre os 28,9 e os 36,5 no caso dos ovos de carapau (Anexo IV).

Para construir diagramas de caixa que mostrassem os resultados de forma mais adequada, foram retirados os valores das estações com salinidades abaixo de 34, pois estes constituíam registos extremos sem particular interesse para as análises a efetuar.

Tendo em conta os gráficos que mostram a salinidade a que foram recolhidos ovos de sardinha (fig. 3.37), pode observar-se que no estrato 2 existiram salinidades ligeiramente mais baixas nos anos de 2019 e 2020. Quando comparadas as salinidades das estações com todos os ovos (parasitados e não parasitados) e as salinidades das estações onde se encontraram ovos parasitados, não se observam variações relevantes.

Nos gráficos que mostram a salinidade a que foram recolhidos ovos de carapau (fig. 3.38) pode observar-se que os dois estratos apresentam salinidades muito semelhantes. Apenas nos anos de 2004 e 2019 se nota um valor ligeiramente menor de salinidade no estrato 2, relativamente ao estrato 1. Comparando as salinidades das estações com todos os ovos e as salinidades das estações onde se encontraram ovos parasitados, uma vez mais, não existem variações relevantes.

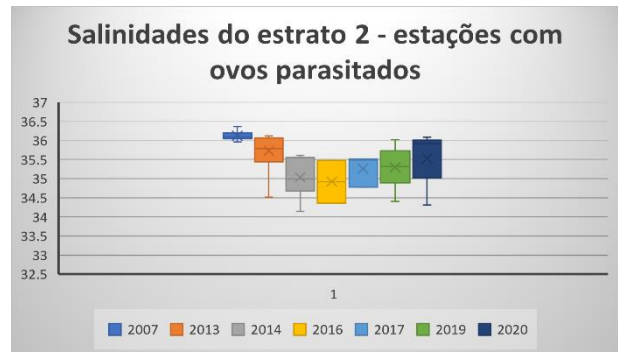
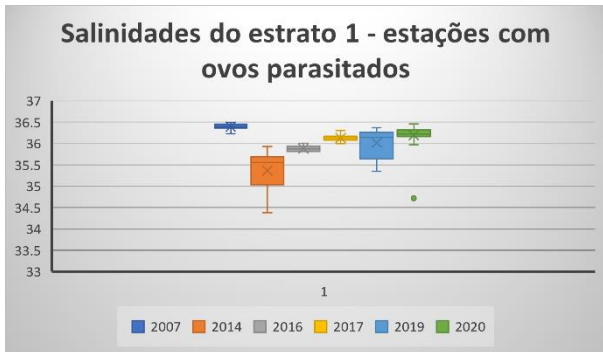
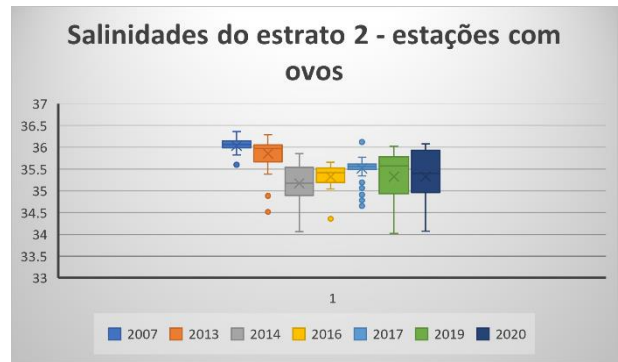
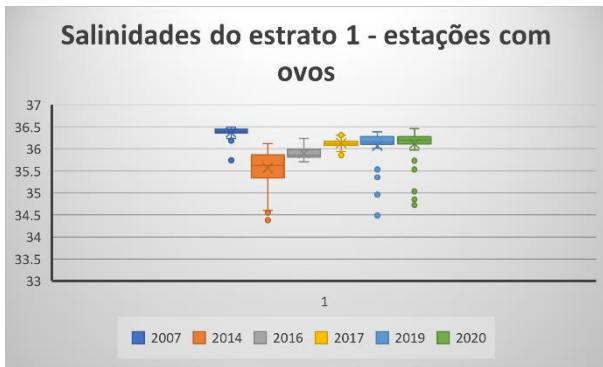


Figura 3. 37- Salinidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de sardinha, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra). Nestes gráficos encontram-se representadas as medianas, os máximos e mínimos e o 1º e o 3º quartil dos dados analisados.

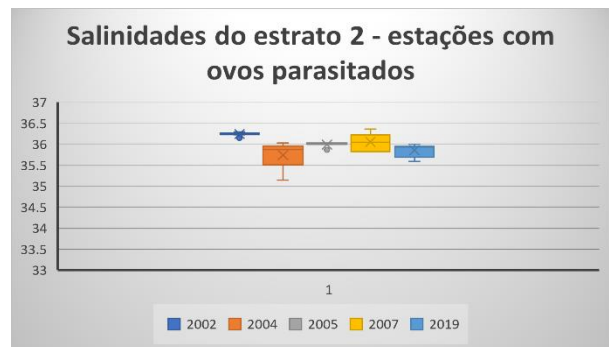
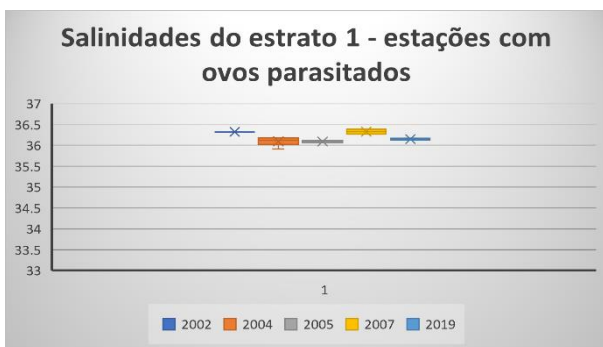
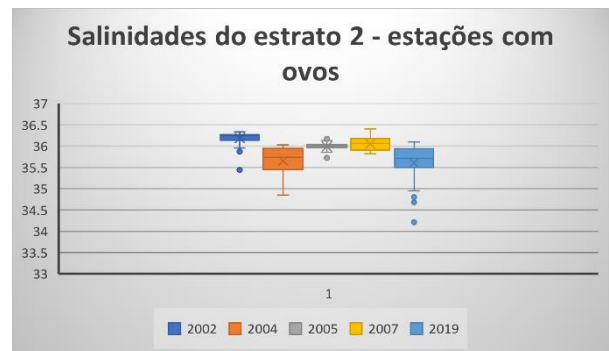
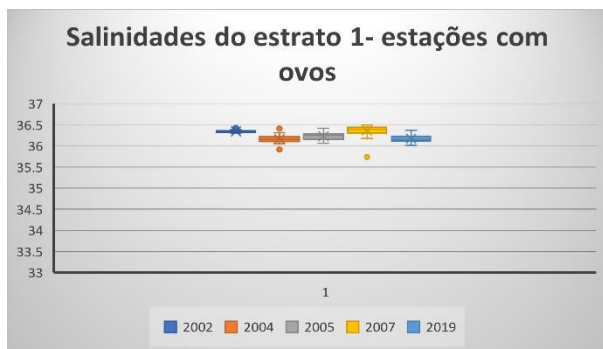


Figura 3. 38- Salinidades das estações onde foram recolhidos ovos (parasitados e não parasitados) e ovos parasitados de carapau, nos dois diferentes estratos (estrato 1 – do Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres; estrato 2 – do Cabo de Sagres a Finisterra). Nestes gráficos encontram-se representadas as medianas, os máximos e mínimos e o 1º e o 3º quartil dos dados analisados.

3.3 Relação entre a distribuição espacial do parasita e fatores ambientais

Para estudar a distribuição espacial dos ovos parasitados e a possível relação com fatores ambientais, foram efetuadas análises com recurso a modelos GLM.

No caso dos ovos de sardinha, a análise GLM (tabela 3.7) revelou que o número de ovos parasitados parece estar negativamente relacionado com a profundidade (quanto menor a profundidade, maior a prevalência de ovos parasitados) e a temperatura (quanto menor a temperatura, maior a prevalência de ovos parasitados), bem como com os estratos (existem mais ovos parasitados no estrato 1- Cabo Trafalgar no Golfo de Cádiz ao Cabo de Sagres e menos no estrato 2- do Cabo de Sagres ao Cabo Finisterra). A equação final do modelo GLM selecionado para os ovos de sardinha tem, portanto, como variável dependente o número de ovos de sardinha parasitados, dependendo das variáveis independentes profundidade, temperatura e estratos e tendo como *offset* o volume de água filtrado (fórmula = $Ovos_Parasit \sim - Profundidade - Temperatura + offset(\log(Vol_filtr)) - Estratos$).

A tabela 3.8, onde se encontram sumarizados os resultados do GLM para ovos de carapau, mostra que o número de ovos parasitados está negativamente relacionado com a profundidade (quanto menor a profundidade, maior a prevalência de ovos parasitados) e positivamente relacionado com os estratos (existem mais ovos parasitados no estrato 2 e menos no estrato 1). Em relação aos ovos de carapau, a equação final do modelo GLM selecionado tem como variável dependente o número de ovos de carapau parasitados, dependendo então das variáveis independentes profundidade e estratos e tendo como *offset* o volume de água filtrado (fórmula = $Ovos_Parasit \sim - Profundidade + offset(\log(Vol_filtr)) + Estratos$).

Com esta análise, foi possível concluir que dois fatores principais se destacaram para ambas as espécies em estudo: a profundidade e os estratos. No entanto, os estratos parecem estar negativamente relacionados com o número de ovos de sardinha parasitados e positivamente relacionados com o número de ovos de carapau parasitados, o que significa que, nos anos analisados, existiu um maior número de ovos de sardinha parasitados entre o Golfo de Cádiz e Sagres (estrato 1), quando comparado com o número existente entre Sagres e Finisterra (estrato 2). Já nos ovos de carapau, existiu um maior número de ovos parasitados entre Sagres e Finisterra (estrato 2) do que entre o Golfo de Cádiz e Sagres (estrato 1), pelo que esta informação não parece mostrar qualquer tipo de padrão na parasitação dos ovos, uma vez que a abundância de ovos é maior, para as duas espécies, no estrato 2. No entanto pode significar que existe algum tipo relação entre a prevalência de ovos parasitados e a zona geográfica.

O único fator que mostra uma relação significativa semelhante nas duas espécies é, então, a profundidade, sendo que, para ambas, o número de ovos parasitados aumenta com a diminuição desta.

Tabela 3. 7- Resultados da análise GLM com os fatores ambientais selecionados para integrar o modelo explicativo final, tomando como variável dependente o número de ovos de sardinha parasitados. A verde estão destacados os fatores ambientais e respectivos valores que demonstraram relevância estatística para a análise em causa (probabilidade<0.05).

Sardinha	Estimativa	Probabilidade
(Intercept)	-1,558	0,733
Profundidade	-0,004	<0,001
Temperatura	-0,304	<0,001
Salinidade	0,144	0,221
Estratos	-1,059	<0,001

Tabela 3. 8- Resultados da análise GLM com os fatores ambientais selecionados para integrar o modelo explicativo final, tomando como variável dependente o número de ovos de carapau parasitados. A verde estão destacados os fatores ambientais e respectivos valores que demonstraram relevância estatística para a análise em causa (probabilidade<0.05).

Carapau	Estimativa	Probabilidade
(Intercept)	-46,689	0,021
Profundidade	-0,007	<0,001
Temperatura	0,318	0,145
Salinidade	0,994	0,102
Estratos	1,236	0,001

3.4 Relação entre a prevalência de infecção e a mortalidade de ovos estimada nas análises do método DEPM

De forma a tentar aferir a eventual relação entre a infecção por *Ichthyodinium chabelardi* e a mortalidade dos ovos, calculada nas análises para a estimação de SSB pelo método DEPM (ICES, 2021), apresentam-se graficamente esses resultados (tabela 3.9). Os resultados apresentados são apenas de ovos de sardinha, pois não estão disponíveis dados para ovos de carapau, nos anos em estudo, exceto para o ano de 2019, por serem campanhas anteriores à implementação da metodologia DEPM para carapau. A título de exemplo, na área de estudo, tem-se então que em 2019 se obteve uma mortalidade de ovos de carapau de 61,06% (documentos internos IPMA).

Tendo em conta a comparação dos dados apresentada na tabela 3.9, para a sardinha, pode observar-se que algumas das maiores mortalidades coincidem com as maiores prevalências de infecção. Por exemplo, a maior mortalidade estimada (51,32% em 2020 na região ICES 9a Sul) coincide também com a maior prevalência de infecção (3,22%).

Tabela 3. 9– Comparação da estimativa de mortalidade total de ovos de sardinha pelo método DEPM e a prevalência de infecção do parasita obtida neste estudo, nos anos em comum.

		Mortalidade/dia (%)	Prevalência de infecção(%)
2005	9a Sul	39,59	-
	9a Oeste	35,08	-
2008	9a Sul	51,32	-
	9a Oeste	43,79	-
2011	9a Sul	48,93	-
	9a Oeste	39,59	-
2014	9a Sul	47,69	2,46
	9a Oeste	42,42	1,70
2017	9a Sul	46,42	0,80
	9a Oeste	46,42	0,65
2020	9a Sul	51,32	3,22
	9a Oeste	42,42	2,40

3.5 Análise molecular para deteção de *Ichthyodinium chabelardi* em gónadas de sardinha

Para confirmar a eficiência dos primers empregues, foram utilizados como controlo ovos de sardinha, que previamente se sabia estarem parasitados (através da observação à lupa no laboratório do IPMA). Foi corrido um PCR para confirmar a presença de ADN do tamanho esperado para o parasita ($\approx 1500\text{bp}$) nos 10 ovos de controlo positivo (fig. 3.39), tendo este sido encontrado nos ovos 1,2,4,5,6 e 10.

Na figura 3.40, onde é apresentado o resultado de um PCR otimizado (foi otimizado o programa de temperaturas) é possível observar-se a presença da amplificação do fragmento de ADN do tamanho esperado para o parasita ($\approx 1500\text{bp}$) também nos ovos 1 e 9. Aquando da análise das gónadas, foi possível detetar a amplificação deste mesmo fragmento nas gónadas 4,5,6,7 e 9, sugerindo a presença de ADN do parasita em algumas das gónadas analisadas. No entanto, após remoção da banda-alvo do gel para as amostras de gónadas 4,6,7 e 9, para sequenciação, não foram obtidas sequências com o tamanho esperado e não foi por isso possível confirmar a amplificação de ADN de *Ichthyodinium chabelardi*.

Posteriormente foram desenvolvidos primers para um fragmento mais curto de ADN e todos os ovos amplificaram a banda-alvo. Foi confirmado que esse fragmento de ADN correspondia ao do parasita através da sequenciação do mesmo. A razão pela qual os ovos não amplificaram todos a banda-alvo na primeira tentativa pode ter-se devido ao facto de os primers não serem tão específicos como esperado ou devido à concentração de ADN de parasita nesses ovos ser muito baixa, ou mesmo pelo facto de o ADN se encontrar degradado.

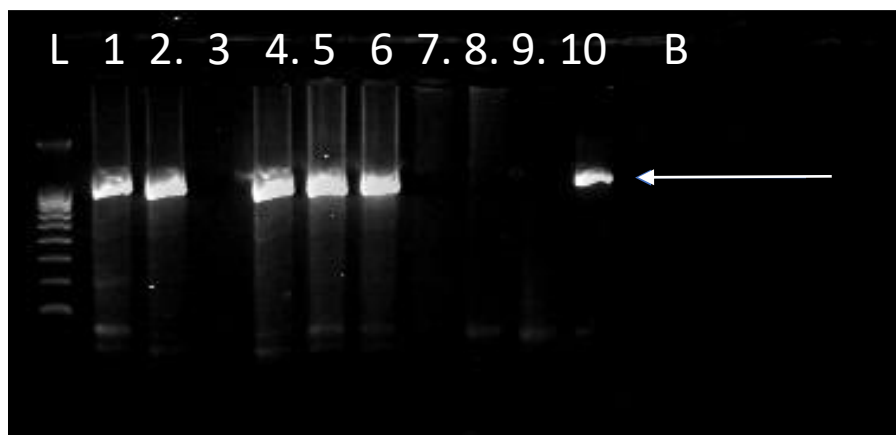


Figura 3. 39- Resultado da eletroforese dos produtos do PCR do ADN de ovos de sardinha. Legenda: L-Lader, B-Branco. A seta azul indica o local onde é possível observar a presença dos fragmentos com o tamanho esperado.

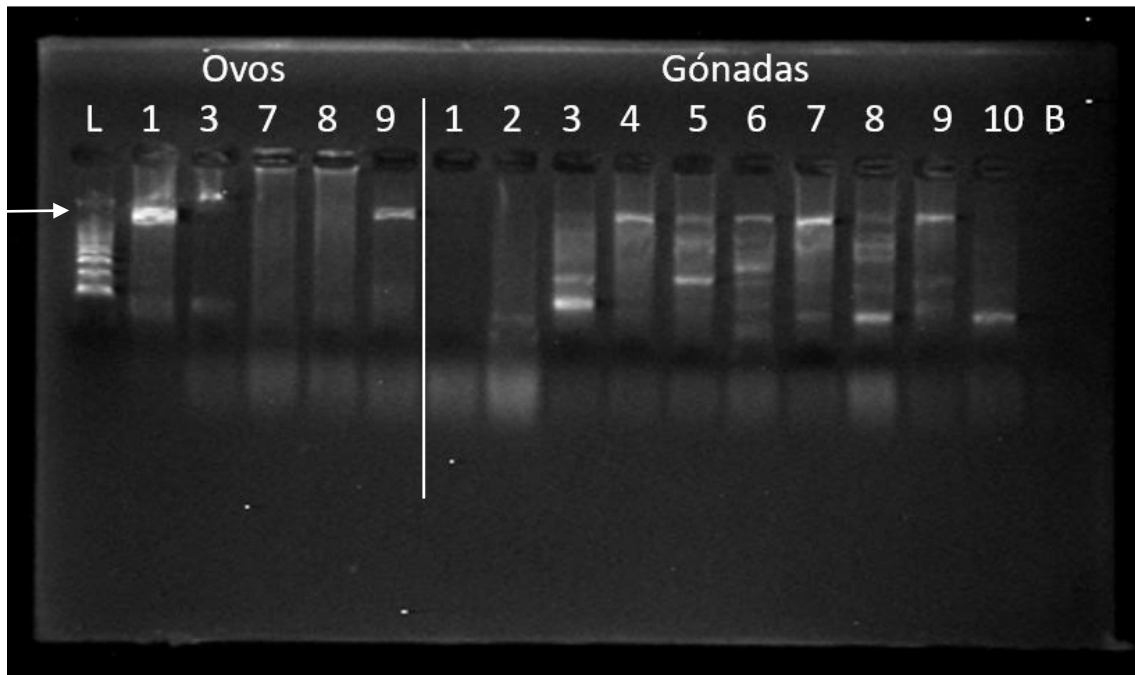


Figura 3. 40- Resultado da eletroforese dos produtos dos PCR do ADN de ovos (esquerda) e gónadas (direita) de sardinha. Legenda: L- Lader, B- Branco. A seta branca indica o local onde é possível observar a presença dos fragmentos com o tamanho esperado.

4. Discussão

Um dos principais objetivos deste estudo foi tentar compreender de que forma *Ichthyodinium chabelardi* se distribui ao longo da área geográfica analisada. Assim, foram efetuados cálculos da prevalência e da PEOP do mesmo nos ovos de sardinha em 2007, 2013, 2014, 2016, 2017, 2019 e 2020, e nos ovos de carapau em 2002, 2004, 2005, 2007 e 2019.

Foi confirmada a presença do parasita em todos os anos analisados, em ambas as espécies, o que revela um carácter não esporádico de infeção. Vários estudos mostram também a presença persistente do parasita em diferentes espécies de peixe e em diferentes regiões do mundo (*e.g* Yuasa *et al.*, 2007, Shadrin *et al.*, 2010).

Quando analisadas as prevalências e as PEOP obtidas para a sardinha e o carapau nos anos em que existiu informação de ambas as espécies (2007 e 2019), pode afirmar-se que não se verificou qualquer tipo de seleção preferencial de hospedeiro pelo parasita para nenhuma destas duas espécies. Este resultado era o esperado, pois está provado que *Ichthyodinium chabelardi* é um parasita generalista (Gleason *et al.*, 2019). O trabalho descrito por Shadrin *et al.*, (2010) demonstra que o parasita foi encontrado em vários grupos taxonómicos de peixes como *Leiognathidae*, *Engraulidae*, *Clupeidae* e *Mugilidae*.

Relativamente às percentagens de ovos infetados obtidas no cálculo da prevalência, pode-se afirmar que não existem grandes flutuações de valores na sardinha ($0,80\% \leq \text{prev.} \leq 4,32\%$) e que o carapau, apesar de tão-pouco apresentar variações muito relevantes, assume valores um pouco mais discordantes ($0,82\% \leq \text{prev.} \leq 10,97\%$). Os resultados obtidos mostram que o número de ovos parasitados é muito inferior ao número de ovos não parasitados. A percentagem de estações com ovos parasitados (PEOP) tem, de uma forma geral, uma relação direta com a prevalência, pelo que quando o valor da prevalência é maior, o PEOP tende a ser também maior, podendo então inferir-se que, num ano em que existe uma baixa prevalência, o número de estações com ovos parasitados tende também a diminuir, existindo uma menor parte da área de estudo com ovos infetados.

Stratoudakis *et al.* (2000) calcularam a percentagem de estações com ovos parasitados (PEOP) pelo parasita *Ichthyodinium chabelardi* em ovos de sardinha em 1997 e 1999 na costa portuguesa, obtendo um resultado de cerca de 30%, bem como uma prevalência de 6,5% e 3,8%, respetivamente. Um outro estudo (Shadrin *et al.*, 2010) calculou a prevalência deste mesmo parasita na Baía de Nha Trang (Vietname), entre os anos de 2002 e 2010, variando os valores entre 11,8% e 57,0% nas amostras recolhidas de fevereiro a abril, e entre 6,3% e 35,8% nas amostras recolhidas de outubro a dezembro, tendo estes cálculos sido efetuados sem distinguir as espécies presentes nas amostras utilizadas. A alteração destes valores nas diferentes épocas de recolha é sugerida pelos autores como sendo o resultado de alterações na estabilidade do ambiente envolvente, sendo a época de chuvas (de outubro a janeiro) caracterizada pela descida da temperatura das águas e aumento da precipitação, causando a alteração das condições, bem como instabilidade causada por tempestades, o que leva a um ambiente menos favorável ao parasita.

No presente trabalho não foi objetivo investigar as diferenças causadas na prevalência do parasita sazonalmente, uma vez que a maioria das campanhas analisadas teve lugar entre janeiro e fins de fevereiro/inícios de março, com exceção dos anos de 2014 e 2016, cujas campanhas se realizaram entre março e maio.

Sendo a infeção pelo parasita de carácter não esporádico, seria de esperar uma prevalência com poucas flutuações em todos os anos analisados, em ambas as espécies, mas apesar de não ocorrerem variações muito marcadas, como explicado nos parágrafos anteriores, a análise estatística efetuada (testes G-de-independência) demonstrou que alguns anos se destacavam, tanto em termos de prevalência como de PEOP, assumindo 2013 o maior destaque no caso da sardinha, devido à elevada fração de ovos parasitados, estando estes bastante bem distribuídos pela área de amostragem. Evidenciaram-se os anos de 2005 e 2019 no caso do carapau, por causa da reduzida proporção de ovos parasitados, quando comparada com a dos restantes anos analisados, apesar destes anos corresponderem àqueles em que mais ovos foram recolhidos. Estas diferenças podem ter um carácter aleatório, como o facto de os ovos capturados nessas mesmas campanhas terem sido mais ou menos afetados pelo parasita, ou podem existir fatores ambientais que favoreçam a proliferação do parasita em determinadas condições.

Na análise GLM efetuada para avaliar a importância que certos fatores ambientais apresentavam na abundância do parasita, o fator explicativo que mais se destacou foi a profundidade a que os ovos se encontravam, tendo-se chegado à conclusão que quanto menor a profundidade, maior o número de ovos parasitados. A nível geográfico, os estratos também evidenciaram determinada importância na distribuição do parasita, embora tenham evidenciado uma relação negativa com os ovos de sardinha e positiva com os ovos de carapau, significando isto que o local onde se encontraram proporcionalmente mais ovos de sardinha parasitados foi entre o Golfo de Cádiz e o Cabo de Sagres (estrato 1) e o local onde se encontraram mais ovos de carapau parasitados foi entre o Cabo de Sagres e Finisterra (estrato 2). A temperatura mostrou uma relação negativa significativa unicamente com o número de ovos de sardinha parasitados, revelando que quanto menor a temperatura, maior o número de ovos parasitados.

De acordo com a distribuição vertical das espécies em estudo faz sentido o que foi descrito na análise GLM relativamente à profundidade, uma vez que a sardinha e o carapau encontram-se preferencialmente em profundidades entre os 100-150m e os 100-250m, respetivamente, e que os ovos e indivíduos mais jovens se encontram a menores profundidades (Parrish *et al.*, 1989, Sousa *et al.*, 2005). No que diz respeito à distribuição geográfica do parasita, Stratoudakis *et al.* (2000) afirmam que a sua presença não é geograficamente restrita, o que é comprovado neste trabalho, uma vez que foi possível encontrar ovos parasitados em toda a extensão da área de estudo, apesar de em alguns dos anos analisados, ter sido possível denotar uma maior proporção de ovos parasitados numa das três regiões em que foi dividida a área de estudo (sub-capítulo 2.1.1), na região Canhão da Nazaré-Finisterra. Relativamente à temperatura, na área de estudo, esta varia com a região, pelo que esta variação na quantidade de ovos parasitados (no caso da sardinha) pode ter um fator geográfico, no entanto, não havendo neste estudo dados sazonais da presença do parasita, torna-se difícil fazer essa interpretação. Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho relativamente à temperatura, outros estudos sugerem que águas com temperaturas mais elevadas são as mais propícias ao desenvolvimento do parasita (Mori *et al.*, 2007; Skovgaard *et al.*, 2009; Skovgaard *et al.*, 2010). No entanto, este parasita é encontrado em águas com condições térmicas bastante distintas, tendo sido detetado em águas com temperaturas entre os 12°C e os 20°C (neste estudo) e em águas com temperaturas entre 26°C e os 30°C (Mori *et al.*, 2007). As diferenças de temperatura encontradas na área de estudo possivelmente não tiveram amplitude suficiente para que se pudesse encontrar um padrão entre a distribuição dos ovos parasitados e a temperatura.

O fator salinidade não apresentou, neste estudo, uma grande relevância para explicar a variação das relações parasitárias em análise, todavia Skovgaard *et al.* (2010) conduziram um estudo para deteção do parasita na espécie *Gadus morhua* no mar Báltico (baixas salinidades) e assumem a possibilidade de *Ichthyodinium chabelardi* depender de altas salinidades para ter a capacidade de proliferar. Uma vez que a salinidade de toda a área de estudo é relativamente elevada, variando geralmente entre 28,6 e 36,5,

é razoável que a análise efetuada não tenha permitido detetar variações na prevalência do parasita em relação a este fator.

No que diz respeito à distribuição do parasita pela área de estudo, quando analisados os mapas da distribuição dos ovos parasitados por *Ichthyodinium chabelardi*, no caso dos ovos do carapau pode atentar-se que na zona sudoeste da área de estudo, entre Sagres e Vila Nova de Milfontes existe uma maior concentração, tanto de ovos não parasitados como parasitados. No caso da sardinha, pode observar-se uma maior concentração de ovos parasitados entre Cádiz e Punta Umbria e entre Aveiro e o Porto. A infeção observada nas duas espécies não tem um padrão regular, no entanto é possível notar que as estações com ovos parasitados tendem a encontrar-se agregadas entre si, parecendo indicar que um foco de parasitismo se alastra para as regiões mais próximas. O trabalho de Stratoudakis *et al.* (2000) teve por base a mesma área de estudo que a analisada neste trabalho e, também este, mostrou que os ovos (de sardinha) infetados pelo parasita parecem distribuir-se sem qualquer tipo de padrão aparente.

Os testes G-de-independência realizados para verificar se ocorriam disparidades na proporção de ovos infetados entre as três regiões em que foi dividida a área de estudo (Golfo de Cádiz-Sagres, Sagres-Canhão da Nazaré, Canhão da Nazaré-Finisterra) mostraram que na maioria dos anos não existiam dissemelhanças na prevalência do parasita. Ocorreram diferenças significativas em três dos sete anos analisados, no caso da sardinha, e em dois dos cinco anos, no caso do carapau. Ora, a maioria destas variações ocorreram na região “Canhão da Nazaré-Finisterra”, no sentido positivo, ou seja, as dissemelhanças denotadas nestes anos e nesta região deveram-se a uma maior percentagem de parasitação relativamente às outras regiões. Estas variações podem ter-se verificado devido a outros fatores bióticos ou abióticos não tidos em conta neste estudo.

Como já referido anteriormente neste trabalho, segundo Borges *et al.* (1996), existem quatro possíveis hipóteses para a infeção pelo parasita:

- 1- O parasita encontra-se na água e consegue entrar para o saco vitelino através do micrópilo, antes do fecho deste, que ocorre após a fecundação;
- 2- O parasita entra no hospedeiro na fase adulta e existe já nas gónadas dos progenitores, logo os gâmetas estão infetados mesmo antes da fecundação ocorrer;
- 3- O parasita encontra-se na água e penetra o ovo através dos poros existentes no córion;
- 4- O parasita encontra-se na água e entra no ovo através de fagocitose, com o auxílio de enzimas.

A forma como o parasita infeta os ovos dos seus hospedeiros ainda não é conhecida, todavia, os resultados da análise molecular obtidos neste estudo sugerem que o mesmo já possa estar presente nas gónadas dos progenitores. No entanto, estes resultados carecem da confirmação de que o fragmento de ADN amplificado nos PCR (apesar de apresentar o tamanho certo) pertence realmente a *Ichthyodinium chabelardi*, nomeadamente através da sequenciação do mesmo.

Posto isto, caso os resultados futuros de sequenciação das bandas-alvo de ADN amplificadas nas gónadas de sardinha comprovem que o ADN do parasita está presente, os oócitos, no momento da postura, já deverão estar contaminados com o parasita. Estes resultados acabam por levantar uma questão pertinente, pois *Ichthyodinium chabelardi* apenas pôde ser detetado, à lupa, a partir do estágio V dos ovos, indicando então que o mesmo, caso esteja presente, permanece indetetável nos estádios primários de desenvolvimento dos ovos (Stratoudakis *et al.*, 2000). Tendo isto em conta, os valores de infeção do parasita podem ser muito maiores do que os apresentados neste estudo, não sendo detetáveis à lupa. Caso se tivesse a oportunidade de realizar análises moleculares a todos os ovos, estes valores de prevalência de infeção poderiam sofrer alterações.

O facto de poderem ser encontrados os 4 níveis de infeção em praticamente todos os estádios de desenvolvimento dos ovos em que é detetável o parasita à lupa, levanta também algumas questões relativamente ao desenvolvimento do parasita dentro do ovo, pois se o parasita infetasse os ovos sempre na mesma altura de vida destes, os níveis de parasitação deveriam ser mais lineares relativamente ao estádio de desenvolvimento dos ovos.

Stratoudakis *et al.* (2000) defendem que a infeção ocorre muito provavelmente através dos gâmetas dos progenitores. Mori *et al.* (2007) discordam desta hipótese, concordando com outros autores, nomeadamente com Yausa *et al.* (2007), que sugerem que o parasita infeta os ovos horizontalmente, utilizando a água como vetor. Yausa *et al.* (2007) afirmam que, na espécie-alvo do seu estudo (atum amarelo – *Thunnus albacares*) foi detetado o parasita através de PCR na água mas não nas gónadas dos indivíduos, o que sugere que a infeção ocorre através da água, penetrando o parasita no ovo através do orifício ocasionado pela entrada do espermatozoide antes de este fechar, uma vez que não foram observadas cicatrizes na sua estrutura, indo esta declaração diretamente contra a hipótese colocada no presente estudo. Apesar de haver indicações de que houve amplificação de um fragmento de tamanho esperado para *Ichthyodinium chabelardi* nas gónadas de sardinha analisadas, os resultados deste estudo não permitem aceitar ou rejeitar qualquer uma das hipóteses colocadas. Por outro lado, é possível que o parasita possa ter mais do que um mecanismo de infeção, podendo esta acontecer antes e depois da expulsão dos oócitos para o exterior.

Compreender o mecanismo de infeção do parasita é importante para que se conheça todo o ciclo de vida de *Ichthyodinium chabelardi* de modo a que se consiga, o mais depressa possível, começar a explorar medidas de mitigação dos seus impactos, antes que este se torne uma ameaça maior para os peixes pelágicos (Gleason *et al.*, 2019).

A variação do recrutamento de peixes pelágicos tem as mais variadas causas, sendo a mortalidade no recrutamento um dos maiores determinantes desta variação (Stratoudakis *et al.*, 2000). A mortalidade nas fases iniciais de vida pode dever-se a várias causas naturais, como o desenvolvimento deficiente do ovo, inanição, predação e canibalismo de ovos e larvas de peixe, entre outras. O aspeto abordado por este trabalho, que potencialmente poderá ter influência na mortalidade na fase inicial de vida dos peixes é o parasitismo, outra causa natural de mortalidade de ovos e larvas. Foi calculada a mortalidade total dos ovos sardinha por dia em 2005, 2008, 2011, 2014, 2017 e 2020, tendo-se obtido valores entre os 35,08% e os 51,32% (ICES, 2021). Através dos resultados obtidos para a prevalência do parasita nos ovos desta espécie, pode afirmar-se que o parasitismo por *Ichthyodinium chabelardi* pode ter algum peso nas taxas de mortalidade dos ovos e larvas de sardinha, não devendo ser ignorado.

Quando comparada a percentagem de mortalidade total diária com a prevalência de infeção para os anos em comum (sub-capítulo 3.4), é possível observar que as percentagens de mortalidade total diária mais elevadas, coincidem, frequentemente, com as prevalências de infeção mais elevadas. Esta informação pode dar alguma indicação de que o parasita afeta, de alguma forma, a mortalidade estimada.

Este parasita, não só é um problema na infeção de peixes pelágicos no seu ambiente natural, como também foi já identificado como sendo uma praga em aquiculturas, existindo dados que sugerem que *Ichthyodinium chabelardi* é uma parasita em ascensão que se está a espalhar por novos ecossistemas, tanto marinhos como, possivelmente, também de água doce (Sørensen *et al.*, 2014, Gleason *et al.*, 2019). Por estas razões e pelo valor económico associado às espécies de peixes pelágicos afetadas pelo parasita, torna-se evidente a importância de conhecer melhor a sua biologia, o seu ciclo de vida e identificar as condições ambientais em que prolifera, de modo a que se consiga fazer uma gestão apropriada das populações das espécies-alvo deste trabalho, de forma a garantir a sustentabilidade das mesmas.

5. Considerações Finais

A sardinha e o carapau, bem como outras espécies de peixes pelágicos (*e.g* biqueirão, verdinho) são peixes com uma elevada importância económica. O parasita *Ichthyodinium chabelardi* é responsável, em parte, pela mortalidade destas espécies nas suas fases iniciais de vida, infectando os ovos das mesmas e levando, em todos os casos conhecidos, à morte do seu hospedeiro.

Um dos objetivos apresentados para este trabalho foi compreender de que forma o parasita se distribui ao longo da área de estudo, tendo em conta fatores ambientais selecionados e qual a percentagem de ovos infectados pelo mesmo. Tendo em conta este objetivo, foram efetuados mapas da área de estudo com a distribuição dos ovos de sardinha e carapau parasitados, tendo-se chegado à conclusão de que não existe um padrão de distribuição aparente, embora ocorram áreas com presença recorrente de ovos parasitados, sendo estas, no caso da sardinha, as regiões entre Cádiz e Punta Umbria e entre Aveiro e o Porto, e no caso do carapau, na zona sudoeste da área de estudo, entre Sagres e Vila Nova de Milfontes. Foram também calculadas a prevalência e a PEOP nos anos analisados, tendo estas variado entre 0,80% e 10,97% e entre 2,00% e 15,32%, respetivamente.

Nas análises GLM efetuadas para compreender se existia uma relação entre os fatores ambientais e a prevalência do parasita, o fator que mais se destacou foi a profundidade dos locais a que os ovos se encontravam, tendo-se chegado à conclusão que quanto menor a profundidade, maior o número de ovos parasitados, estando este resultado de acordo com o que se sabe da distribuição vertical das espécies. O fator temperatura demonstrou uma relação negativa com o número de ovos de sardinha parasitados, o que significa que quanto menor a temperatura, maior o número de ovos parasitados. Na área de estudo, a temperatura varia com a região, pelo que esta variação com a temperatura pode ter um fator geográfico. Já relativamente à localização geográfica também foram encontradas dissemelhanças na prevalência dos ovos parasitados nas diferentes sub-regiões (estratos 1 e 2) em que foi dividida a área de estudo, tendo-se destacado uma maior proporção de ovos de sardinha parasitados no estrato 1 e uma maior proporção de ovos de carapau parasitados no estrato 2. O fator ambiental salinidade não apresentou relevância estatística.

Outro objetivo estabelecido para este trabalho foi compreender o mecanismo de infeção dos ovos. Para esse fim, foram efetuadas análises moleculares a gónadas de sardinha, de modo a compreender se o parasita se encontrava já presente nos oócitos antes da sua libertação, ou se a parasitação acontecia apenas no exterior. Os resultados obtidos, ainda que preliminares, sugerem que o mesmo já possa estar presente nas gónadas dos progenitores, no entanto, estes resultados carecem de confirmação, através da sequenciação do segmento de ADN amplificado, apesar de este apresentar o tamanho esperado para *Ichthyodinium chabelardi*.

Os resultados demonstraram que a percentagem de indivíduos das espécies em estudo infectados por este parasita, embora com valores entre 0,80% e 4,32% nos ovos de sardinha e entre 0,82% e 10,97% nos ovos de carapau, não deve ser ignorada como contribuindo para a mortalidade, pelo que devem ser efetuados esforços para conhecer melhor este parasita e o seu mecanismo de infeção, e projetar possíveis distribuições futuras e explorar medidas de mitigação para a infeção por *Ichthyodinium chabelardi* nos mananciais de peixes pelágicos.

Para dar continuidade a este trabalho e de forma a preencher as lacunas observadas relativamente ao conhecimento existente sobre *Ichthyodinium chabelardi*, futuras pesquisas poderão recair sobre:

- Desenvolver primers específicos para o parasita em questão, diferentes dos usados neste trabalho, de forma a constatar a existência de genoma do parasita nas gónadas de peixes afetados por este, e posterior sequenciação do mesmo para confirmação, para que se consiga compreender melhor o mecanismo de infeção e o ciclo de vida completo deste;
- A análise continuada da prevalência do parasita (nas campanhas regulares de larga escala geográfica), de modo que seja possível avaliar a tendência de infeção ao longo dos anos, e implementar amostragens ao longo do ano cobrindo as épocas de desova de várias espécies para estudar a presença do parasita nas mesmas;
- Abranger diferentes ecossistemas e espécies de peixes neste tipo de estudos para que se compreenda a distribuição do parasita a nível global e quais as espécies afetadas por este.

6. Referências Bibliográficas

- Abaunza, P., Gordo, L., Karlou-Riga, C., Murta, A., Eltink, A. T. G. W., Santamaría, M.T.G., Zimmermann, C., Hammer, C., Lucio, P., Iversen, S.A., Molly, J. & Gallo, E. (2003). Growth and reproduction of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Carangidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(1), 27-61.
- Afilal, M. A., Daoudi, H., Jdani, S., Asehraou, A., & Bouali, A. (2006). Study of the histamine production in a red flesh fish (*Sardina pilchardus*) and a white flesh fish (*Dicentrarchus punctatus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6(1).
- Afonso, M.H. (1991). Estudo de uma área de postura de Sardinha, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) na Costa Continental Portuguesa. *Boletim do Instituto Nacional de Investigação das Pescas* (Lisboa), 16: 23-52.
- Ahlstrom, E. (1943). Studies on the Pacific pilchard or sardine (*Sardinops carulea*).4.-Influence of Temperature on the Rate of Development of Pilchard Eggs in Nature. Department of the interior Harold L. Ickes, Secretary. Special Scientific Report No.23
- Bode, A., Alvarez-Ossorio, M. T., Carrera, P., & Lorenzo, J. (2004). Reconstruction of trophic pathways between plankton and the North Iberian sardine (*Sardina pilchardus*) using stable isotopes. *Scientia Marina*, 68(1), 165-178.
- Borges, R., Ré, P., & Azevedo, C. (1996). Ichtyodinium chabelardi (Hollande & Cachon, 1952), dinoflagelado parasita dos ovos de sardinha. *Ciê. Biol. Ecol.Syst. (Portugal)*, 16(1/2): 245-258.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 52-70.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *The Journal of parasitology*, 575-583.
- Cabral, H. N., & Murta, A. G. (2002). The diet of blue whiting, hake, horse mackerel and mackerel off Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(1), 14-23.
- Coombs, S. H., Smyth, T. J., Conway, D. V. P., Halliday, N. C., Bernal, M., Stratoudakis, Y., & Alvarez, P. (2006). Spawning season and temperature relationships for sardine (*Sardina pilchardus*) in the eastern North Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(5), 1245-1252.
- Costa, A. M. (2009). Macroscopic vs. microscopic identification of the maturity stages of female horse mackerel. *ICES Journal of Marine Science*, 66(3), 509-516.
- Cunha, M. E., Vendrell, C., & Goncalves, P. (2008). Experimental study of the dependence of embryonic development of *Trachurus trachurus* eggs on temperature. *ICES Journal of Marine Science*, 65(1), 17-24.
- Flint, A. L., & Flint, L. E. (2002). 2.2 Particle Density. *Methods of soil analysis: Part 4 physical methods*, 5, 229-240.

- Garrido, S., Silva, A., Marques, V., Figueiredo, I., Bryère, P., Mangin, A., & Santos, A. M. P. (2017). Temperature and food-mediated variability of European Atlantic sardine recruitment. *Progress in Oceanography*, 159, 267-275.
- Garrido, S., Marçalo, A., Zwolinski, J., & Van der Lingen, C. D. (2007). Laboratory investigations on the effect of prey size and concentration on the feeding behaviour of *Sardina pilchardus*. *Marine Ecology Progress Series*, 330, 189-199.
- Gamulin, T., & Hure, J. (1955). Contribution à la connaissance de l'écologie de la ponte de la sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) dans l'Adriatique. Institut za oceanografiju i ribarstvo – Split FNR Jugoslavia, Vol.VII.No.8.
- Giannoulaki, M., Machias, A., & Tsimenides, N. (1999). Ambient luminance and vertical migration of the sardine *Sardina pilchardus*. *Marine ecology progress series*, 178, 29-38.
- Gleason, F. H., Nagarkar, M., Chambouvet, A., & Guillou, L. (2019). A review of the characteristics of the dinoflagellate parasite *Ichthyodinium chabelardi* and its potential effect on fin fish populations. *Marine and Freshwater Research*, 70(9), 1307-1316.
- Gonçalves, P., Costa, A. M., & Murta, A. G. (2009). Estimates of batch fecundity and spawning fraction for the southern stock of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in ICES Division IXa. *ICES Journal of Marine Science*, 66(4), 617-622.
- Hollande, A. and J. Cachon (1952): Un parasite des oeufs de sardine: l'*Ichthyodinium chabelardi*, nov. gen., nov. sp. (peridinien parasite). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, Paris (Ser. D)*, 235, 976–977
- Hollande, A. and J. Cachon (1953): Morphologie et evolution d un peridinien parasite des oeufs de sardine (*Ichthyodinium chabelardi*). *Bulletin Station d'Aquiculture et de Peche de Castiglione*, 4, 321–331.
- ICES (2014). Manual for the mackerel and horse mackerel egg surveys (MEGS): sampling at sea. Series of ICES Survey Protocols. SISP 6 - MEGS V1.3. 62 pp.
- ICES (2020) Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy and Sardine (WGHANSA). ICES Scientific Reports. 2:41. 655 pp. <http://doi.org/10.17895/ices.pub.5977>
- ICES (2021). Daily Egg Production Estimates for the Atlantic Iberian Sardine in 2020, (ICES areas 9a and 8c). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10508/11635>
- ICES (2021). 05 Section 3: WGHANSA Report 2021 – Sardine in 8c9a. *Ices Scientific Reports Issue 55*.
- ICES (2021). 06 Section 4: WGHANSA Report 2021 – Southern Horse Mackerel in 9a. *Ices Scientific Reports Issue 55*.
- ICES (2021). Working Group on Acoustic and Egg Surveys for small pelagic fish in NE Atlantic (WGACEGG; outputs from 2020 meeting) *ICES Scientific Reports*. 3:76. 706 pp. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.8234>,
- Lockwood, S.J. & Johnson, P.O. (1977) Horse Mackerel *Trachurus trachurus*. Lab. Leaflet, MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft (38), 17p.

- Longhurst, A. (2007). *Ecological Geography of the Sea* (2nd ed., pp. 224-233). Academic Press.
- Longshaw, M., Frear, P. A., Nunn, A. D., Cowx, I. G., & Feist, S. W. (2010). The influence of parasitism on fish population success. *Fisheries Management and Ecology*, 17(5), 426-434.
- Mason, E., Coombs, S. H., & Oliveira, P. B. (2005). An overview of the literature concerning the oceanography of the eastern North Atlantic region. *Relatórios Científicos e Técnicos IPIMAR Serie Digital*, 33, 59.
- May, R. C. (1974). Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. In *The early life history of fish* (pp. 3-19). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Meneses, I. (2003). *Estimação de factores que Condicionam a Variabilidade do Recrutamento de Peixes na Costa Atlântica da Península Ibérica* (Doctoral dissertation, PhD Thesis, Portuguese Institute for Fisheries and Sea Research (IPIMAR), Lisbon, Portugal).
- Meneses, I., Ré, P. (1991). Infection of sardine eggs by a parasitic dinoflagellate *Ichthyodinium chabelardi* off Portugal. *Boletim do Instituto Nacional de Investigação das pescas*, 16: 63-72.
- Meneses, I., Vendrell, C., & Stratoudakis, Y. (2003). Mackerel (*Scomber scombrus*) eggs parasitized by *Ichthyodinium chabelardi* in the north-east Atlantic: an overlooked source of mortality. *Journal of plankton research*, 25(9), 1177-1181.
- Mertz, G., & Myers, R. A. (1996). Influence of fecundity on recruitment variability of marine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(7), 1618-1625.
- Miranda, A., Cal, R. M., & Iglesias, J. (1990). Effect of temperature on the development of eggs and larvae of sardine *Sardina pilchardus* Walbaum in captivity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 140(1-2), 69-77.
- Mori, K. I., Yamamoto, K., Teruya, K., Shiozawa, S., Yoseda, K., Sugaya, T., ... & Ogawa, K. (2007). Endoparasitic dinoflagellate of the genus *Ichthyodinium* infecting fertilized eggs and hatched larvae observed in the seed production of leopard coral grouper *Plectropomus leopardus*. *Fish Pathology*, 42(1), 49-57.
- Muino, R., Carrera, P., & Iglesias, M. (2003). The characterization of sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum) schools off the Spanish-Atlantic coast. *ICES Journal of Marine Science*, 60(6), 1361-1372.
- Munk, P., Nielsen, J.G, 2005 - Eggs and larvae of North Sea fishes. bifolia, Denmark.
- Murta, A. G., Abaunza, P., Cardador, F., & Sánchez, F. (2008). Ontogenic migrations of horse mackerel along the Iberian coast. *Fisheries Research*, 89(2), 186-195.
- Nunes, C., Silva, A., Marques, V., & Gantias, K. (2011a). Integrating fish size, condition, and population demography in the estimation of Atlantic sardine annual fecundity. *Ciencias Marinas*, 37(4B), 565-584.
- Nunes, C., Silva, A., Soares, E., & Gantias, K. (2011b). The use of hepatic and somatic indices and histological information to characterize the reproductive dynamics of Atlantic Sardine *Sardina pilchardus* from the Portuguese coast. *Mar. Coast. Fish.* 3: 127-144.

- Parrish, R. H., Serra, R., & Grant, W. S. (1989). The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(11), 2019-2036.
- Pauly, D., Christensen, V., Guénette, S., Pitcher, T. J., Sumaila, U. R., Walters, C. J., ... & Zeller, D. (2002). Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, 418(6898), 689-695.
- Peliz, Á., Dubert, J., Santos, A. M. P., Oliveira, P. B., & Le Cann, B. (2005). Winter upper ocean circulation in the Western Iberian Basin—Fronts, Eddies and Poleward Flows: an overview. *Deep sea research Part I: Oceanographic research papers*, 52(4), 621-646.
- Peliz, Á., Rosa, T. L., Santos, A. M. P., & Pissarra, J. L. (2002). Fronts, jets, and counter-flows in the Western Iberian upwelling system. *Journal of marine systems*, 35(1-2), 61-77.
- Relvas, P., Barton, E. D., Dubert, J., Oliveira, P. B., Peliz, A., Da Silva, J. C. B., & Santos, A. M. P. (2007). Physical oceanography of the western Iberia ecosystem: latest views and challenges. *Progress in Oceanography*, 74(2-3), 149-173.
- Ré, P., Meneses, I., 2008 – Early Stages of Marine Fishes Occurring in the Iberian Peninsula. IPIMAR, Lisboa, 283p.
- Santos, A. M. P., de Fátima Borges, M., & Groom, S. (2001). Sardine and horse mackerel recruitment and upwelling off Portugal. *ICES Journal of Marine Science*, 58(3), 589-596.
- Santos, A. M. P., Chicharo, A., Dos Santos, A., Moita, T., Oliveira, P. B., Peliz, A., & Ré, P. (2007). Physical–biological interactions in the life history of small pelagic fish in the Western Iberia Upwelling Ecosystem. *Progress in Oceanography*, 74(2-3), 192-209.
- Santos, F., Gomez-Gesteira, M., Decastro, M., & Alvarez, I. (2012). Variability of coastal and ocean water temperature in the upper 700 m along the Western Iberian Peninsula from 1975 to 2006. *PLoS One*, 7(12), e50666.
- Santos, M. B., González-Quirós, R., Riveiro, I., Cabanas, J. M., Porteiro, C., & Pierce, G. J. (2012). Cycles, trends, and residual variation in the Iberian sardine (*Sardina pilchardus*) recruitment series and their relationship with the environment. *ICES Journal of Marine Science*, 69(5), 739-750.
- Shadrin, A.M., Pavlov, D.S. & Kholodava, M.V. (2010). Long-term dynamics of infection of fish eggs and larvae with the endoparasite *Ichthyodinium* sp. (Dinoflagellata) in Nha Trang Bay, Vietnam. *Fish Pathology* 45(3), 103-108.
- Silva, A., Carrera, P., Massé, J., Uriarte, A., Santos, M. B., Oliveira, P. B., ... & Stratoudakis, Y. (2008). Geographic variability of sardine growth across the northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea. *Fisheries Research*, 90(1-3), 56-69.
- Silva, A., Santos, M. B., Caneco, B., Pestana, G., Porteiro, C., Carrera, P., & Stratoudakis, Y. (2006). Temporal and geographic variability of sardine maturity at length in the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, 63(4), 663-676.
- Skovgaard, A., Meneses, I., & Angélico, M. M. (2009). Identifying the lethal fish egg parasite *Ichthyodinium chabelardi* as a member of Marine Alveolate Group I. *Environmental microbiology*, 11(8), 2030-2041.

- Skovgaard, A., Meyer, S., Overton, J. L., Støttrup, J., & Buchmann, K. (2010). Ribosomal RNA gene sequences confirm that protistan endoparasite of larval cod *Gadus morhua* is *Ichthyodinium* sp. *Diseases of aquatic organisms*, 88(2), 161-167.
- Smith, P. E., & Hewitt, R. P. (1985). Sea survey design and analysis for an egg production method of anchovy biomass assessment. *An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the northern anchovy, *Engraulis mordax**, 36, 17-26.
- Smith-Vaniz, W.F., Sidibe, A., Nunoo, F., Lindeman, K., Williams, A.B., Quartey, R., Camara, K., Carpenter, K.E., Montiero, V., de Morais, L., Djiman, R., Sylla, M. & Sagna, A. 2015. *Trachurus trachurus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T198647A43157137. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T198647A43157137.en>
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1995) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd Edition, W.H. Freeman and Co., New York.
- Sørensen, S. R., Tomkiewicz, J., & Skovgaard, A. (2014). *Ichthyodinium* identified in the eggs of European eel (*Anguilla anguilla*) spawned in captivity. *Aquaculture*, 426, 197-203.
- Sousa, P., Azevedo, M., & Gomes, M. C. (2005). Demersal assemblages off Portugal: mapping, seasonal, and temporal patterns. *Fisheries Research*, 75(1-3), 120-137.
- Stratoudakis, Y., Barbosa, A., & Meneses, I. (2000). Infection of sardine eggs by the protistan endoparasite *Ichthyodinium chabelardi* off Portugal. *Journal of fish biology*, 57(2), 476-482.
- Stratoudakis, Y., Bernal, M., Gantias, K., & Uriarte, A. (2006). The daily egg production method: recent advances, current applications and future challenges. *Fish and Fisheries*, 7(1), 35-57.
- Tous, P., Sidibé, A, Mbye, E., de Morais, L., Camara, Y.H., Adeofe, T.A., Munroe, T., Camara, K., Cissoko, K., Djiman, R., Sagna, A. & Sylla, M. 2015. *Sardina pilchardus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T198580A15542481. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T198580A15542481.en>
- Yuasa, K., Kamaishi, T., Mori, K. I., Hutapea, J. H., Permana, G. N., & Nakazawa, A. (2007). Infection by a protozoan endoparasite of the genus *Ichthyodinium* in embryos and yolk-sac larvae of yellowfin tuna *Thunnus albacares*. *Fish Pathology*, 42(1), 59-66.
- Zwolinski, J., Morais, A., Marques, V., Stratoudakis, Y., & Fernandes, P. G. (2007). Diel variation in the vertical distribution and schooling behaviour of sardine (*Sardina pilchardus*) off Portugal. *ICES Journal of Marine Science*, 64(5), 963-972.

7. Anexos

Anexo I- Descrição e fotografia da classificação em estádios de desenvolvimento dos ovos de sardinha (*Sardina pilchardus*). Fonte: Documentos internos IPMA.

Estádio I

O ovo apresenta dimensões mais reduzidas do que nos outros estádios (entre 1,02 e 1,38 mm de diâmetro) apesar das dimensões do vitelo se manterem iguais. Isto deve-se ao espaço perivitelino ser reduzido.

Neste estágio pode observar-se a concentração de citoplasma no pólo animal, sem contudo haver divisão celular.

Também estão incluídos neste estado os ovos que não foram fecundados.

Estádio II

O ovo já apresenta dimensões maiores (ente 1,30 e 1,90 mm de diâmetro) – as dimensões do vitelo mantêm-se mas o espaço perivitelino já é maior.

No pólo animal, dá-se o início da divisão celular em que no início os blastómeros são grandes, visíveis e contáveis – a mórula apresenta-se em forma de amora – e tornam-se cada vez menores e impossíveis difíceis de contar no fim do estado – a mórula perde o aspecto de amora e torna-se mais plana, mesmo que já se comece a distinguir alguma concavidade no seu interior.

Estádio III

A mórula deixa de ter o aspecto de amora devido às sucessivas divisões e começa a aparentar um tecido mais do que de uma coleção de células (mesmo que ainda não se note alguma concavidade da sua base) – fase de blástula.

Forma-se o blastocélio (ou cavidade blastocélica) entre o vitelo e a blastoderme. A blastoderme do blastodisco começa a estender-se sobre o vitelo formando a capa blastodérmica que pode cobrir até ao final deste estado cerca de $\frac{1}{2}$ do vitelo. Já no fim do estado forma-se o escudo embrionário no bordo espesso da capa blastodérmica.

Estádio IV

Ao nível do escudo embrionário é visível o esboço do eixo embrionário. A capa blastodérmica continua a cobrir o vitelo e atinge os $\frac{4}{5}$ do vitelo (quase atinge a gota de óleo).

O eixo embrionário pode ocupar até $\frac{2}{5}$ da circunferência do vitelo, apresentando-se a zona cefálica mais acentuada do que a zona caudal.

Nota: Se for bem visível o efeito “cueca” ou se estiver bem visível a “careca/clareira”, então é seguramente um estado IV.

Estádio V

Ocorre o fecho do blastóporo, ficando o vitelo completamente revestido pela capa blastodérmica.

Dá-se o engrossamento para dentro da zona cefálica enquanto que o fim da zona caudal não se distingue tão bem.

Neste estado não se observam os sómitos nem as vesículas ópticas.

Nota: É possível ver-se a formação de um “bico” na zona encefálica do embrião quando visto no plano frontal.

Estádio VI

Neste estágio tornam-se visíveis as vesículas ópticas assim bem como os sómitos na região média do embrião. Este ocupa até ao final do estágio $\frac{2}{3}$ do vitelo, não atingindo a gota de óleo.

O embrião começa a engrossar para fora e a cauda ainda está agarrada ao vitelo.

No fim do estágio já se começam a observar as pupilas nas vesículas ópticas.

Estádio VII

A cauda começa a separar-se do vitelo, formando um ângulo inferior a 90° . A cauda já atinge a gota de óleo, mas ainda não a ultrapassa.

Forma-se a barbatana primitiva à volta do embrião, sendo mais perceptível na cauda. Os sómitos estendem-se até à base da parte solta da cauda e começa a pigmentação do corpo. Este estágio permanece até à parte solta da cauda atingir o tamanho da cabeça.

Nota: No início deste estado, pode verificar-se uma acumulação ligeira de material entre a ponta da cauda e o vitelo, embora possa parecer que o ângulo ainda seja de 90 °.

Estádio VIII

A parte livre da cauda é maior que o comprimento da cabeça e ultrapassa a gota de óleo, atingindo 1/3 do comprimento do embrião.

A barbatana primordial já é mais visível chegando a ter 1/2 da largura do embrião, no fim deste estado. É visível o tracto digestivo ao longo da parte ventral e o ânus aparece na barbatana primordial.

Os sómitos aparecem até ao ânus.

A ponta da cauda começa a ficar mais pontiaguda e eventualmente a desviar-se em relação ao eixo embrionário, no fim deste estado.

A pigmentação do embrião torna-se mais acentuada.

Estádio IX

A cauda livre forma um ângulo relativamente ao plano do embrião e apresenta uma curva para um dos lados. O vitelo já não se apresenta tão esférico e adquire uma forma mais oval uma vez que a parte livre é maior que 1/3 do comprimento do embrião e atinge 2/5 no final.

Neste estado a barbatana primitiva ventral é mais larga que a dorsal sendo que a dorsal é maior que 1/2 da largura do embrião.

Estádio X

A parte livre do embrião mede mais que 2/5 do comprimento total do embrião formando um “U” mas a ponta da cauda não excede a base da cabeça.

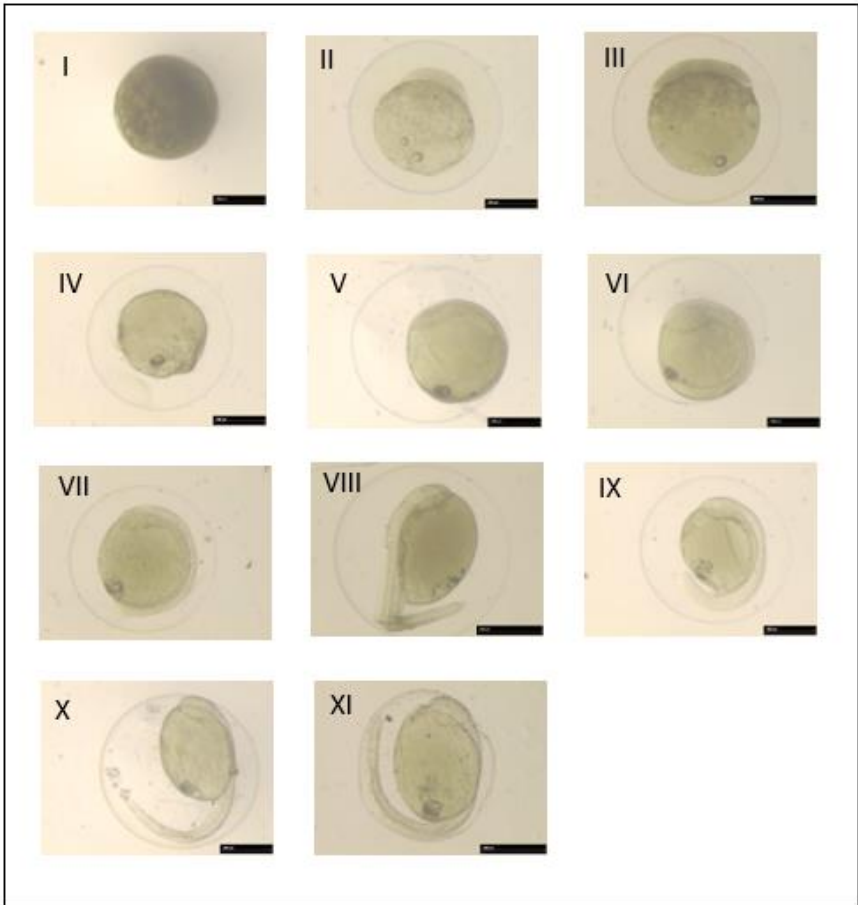
A barbatana primordial na sua parte dorsal é tão larga como o embrião e na sua parte ventral é mais larga ainda.

Nota: A barbatana ventral pode apresentar desde o início um ligeiro engelhamento que se vai pronunciando ao longo da sua evolução.

Estádio XI

Este estado inicia com a ponta da cauda a exceder a base da cabeça até à eclosão do embrião.

A barbatana primordial chega a ter 2 vezes a largura do embrião.



Anexo II- Descrição e fotografias da classificação em estádios de desenvolvimento dos ovos de carapau (*Trachurus trachurus*). Fonte: Documentos internos IPMA.

Estádio I

Primeira segmentação, o ovo apresenta no pólo animal um espessamento inicial muito superficial, proveniente da divisão das células. Estas são em pequeno número mas de grandes dimensões. O número de células visíveis é contável (+32 células).

Incluem-se também neste estágio os ovos não fecundados (estes são no entanto difíceis de distinguir e muito raros).

Estádio II

No pólo animal as células vão-se dividindo cada vez mais e neste estágio já não se conseguem contar, apesar de visíveis.

O ovo apresenta por vezes a forma de pêra, sendo o pólo animal mais saliente (em forma de amora). Esta “amora” é formada pelas células que se dividem progressivamente – fase de mórula.

Estádio III

Formação do blastodisco em que o bordo apresenta-se mais espessado podendo-se ver um “anel” tanto de topo como de lado.

Estádio IV

É visível o esboço do embrião apesar de não se conseguir distinguir a cabeça nem a cauda. Visto de lado, o ovo apresenta um contorno que se assemelha a uma cueca.

O blastóporo é ainda muito grande.

Estádio V

O corpo do embrião está bem delineado e a cabeça e a cauda bem visíveis.

O corpo do embrião apresenta-se colado ao vitelo sem haver engrossamento para fora.

As vesículas ópticas aparecem de forma muito ténue e por vezes já se conseguem observar sómitos, embora muito pouco nítidos.

O blastóporo é pequeno e pode começar a aparecer a pigmentação do embrião.

Estádio VI

O embrião está engrossado para fora, o ângulo formado entre a cauda e o vitelo é $\geq 90^\circ$. As vesículas ópticas encontram-se visíveis.

Ocorre o fecho do blastóporo.

Os sómitos estão mais ou menos nítidos.

Estádio VII

Este estágio inicia-se com o início da cauda a soltar-se do vitelo (o ângulo formado é $< 90^\circ$ e vai até à fase em que a parte livre da cauda é igual ao tamanho da cabeça).

Estádio VIII

Este estágio começa quando a parte livre da cauda é maior que o tamanho da cabeça e prolonga-se até o embrião atingir $\frac{3}{4}$ da circunferência do ovo (quando visto lateralmente).

Estádio IX

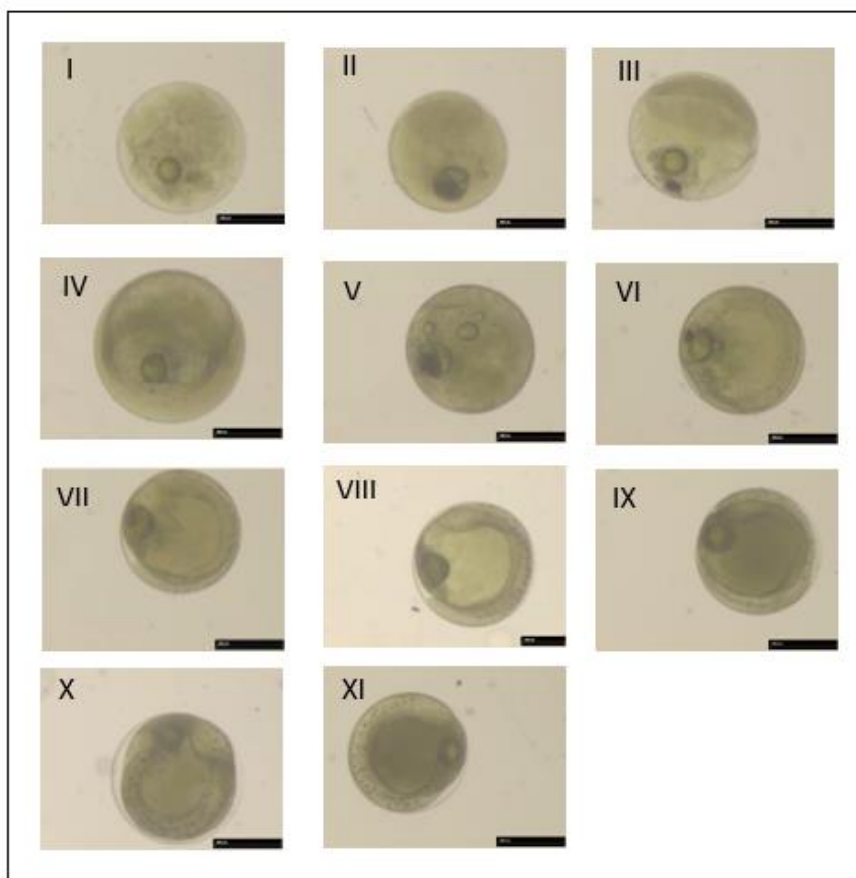
Este estágio tem início com o embrião a ocupar os $\frac{3}{4}$ da circunferência do ovo e decorre até atingir os $\frac{7}{8}$.

Estádio X

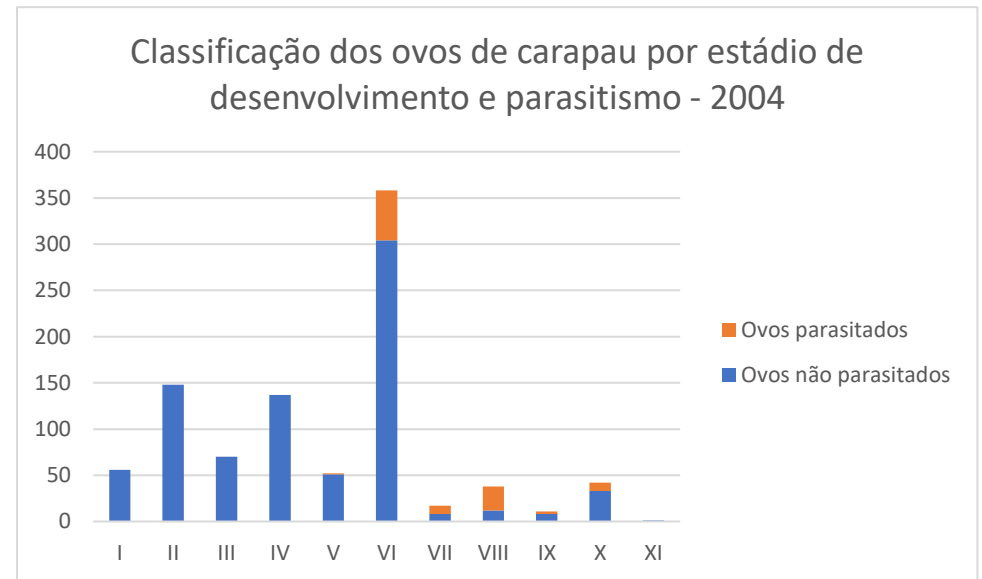
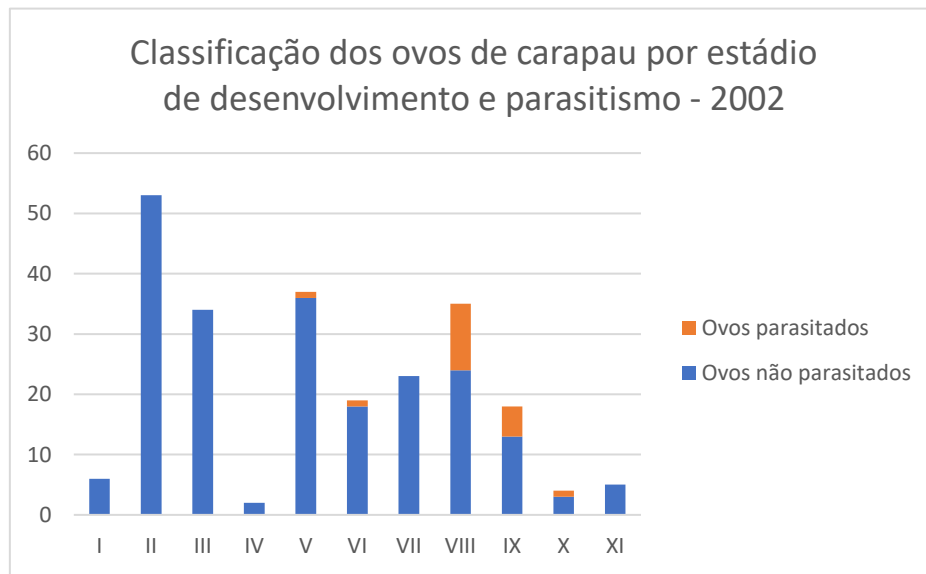
Este estágio compreende o desenvolvimento do embrião desde o momento em que este ocupa $\frac{7}{8}$ da circunferência do ovo até a cauda alcançar a cabeça, sem contudo a tocar.

Estádio XI

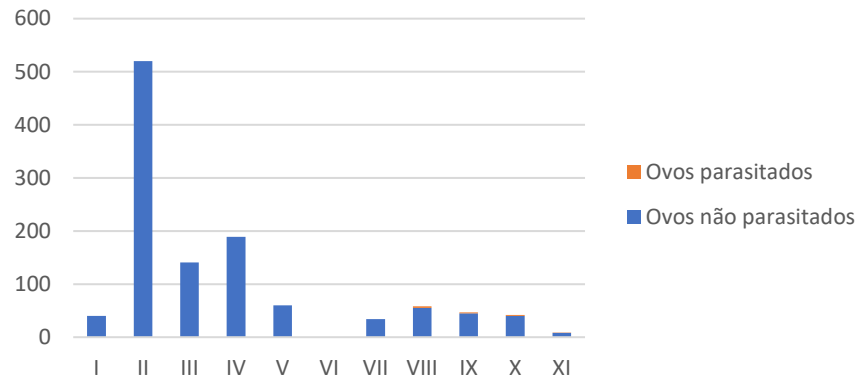
Neste estágio, a cauda do embrião toca a cabeça podendo ultrapassá-la.



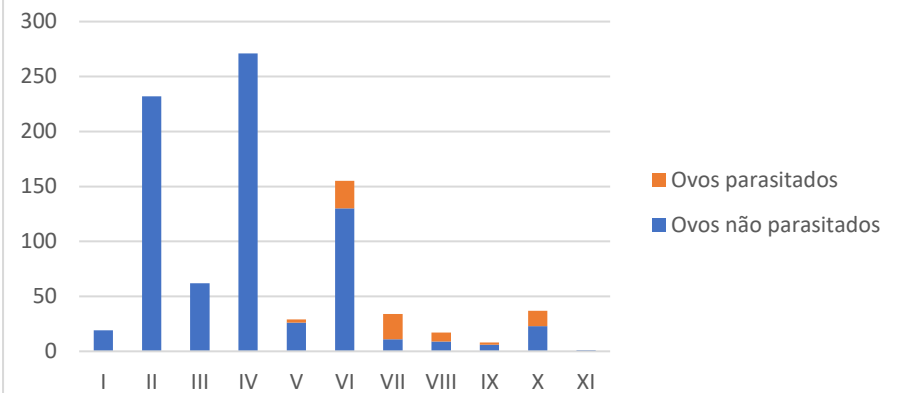
Anexo III- Gráficos resumos de abundâncias de ovos parasitados e não parasitados, nos anos em estudo, nas duas espécies analisadas.



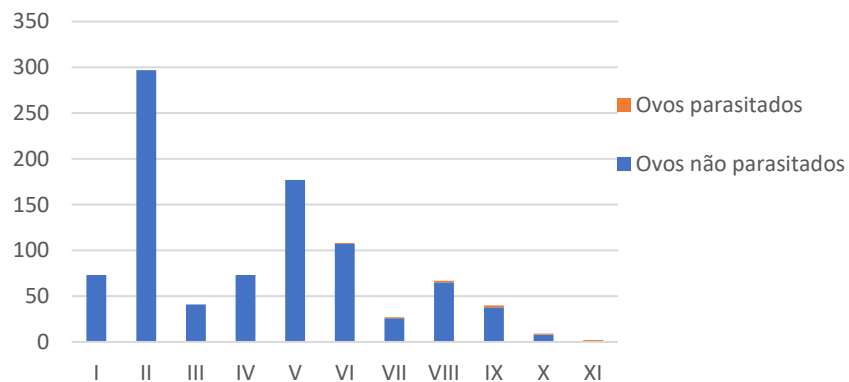
Classificação dos ovos de carapau por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2005



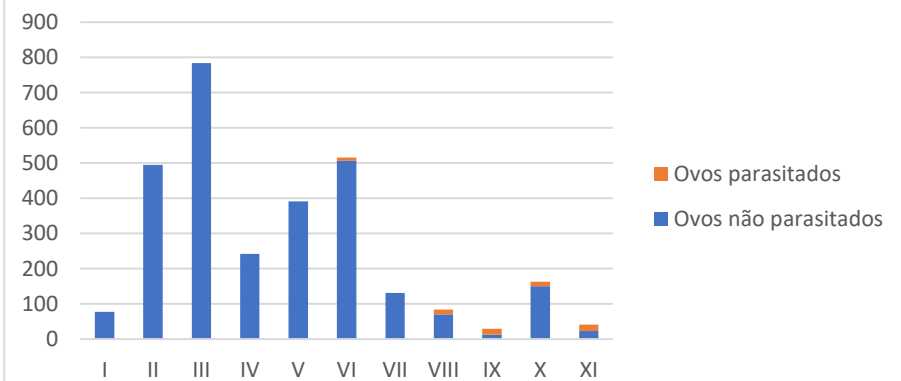
Classificação dos ovos de carapau por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2007



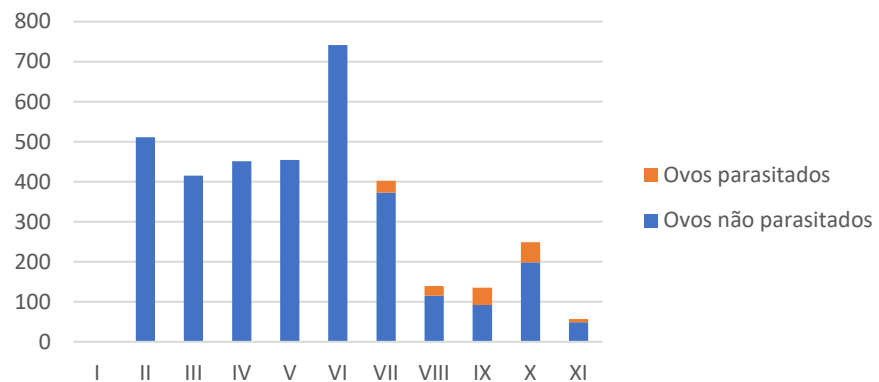
Classificação dos ovos de carapau por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2019



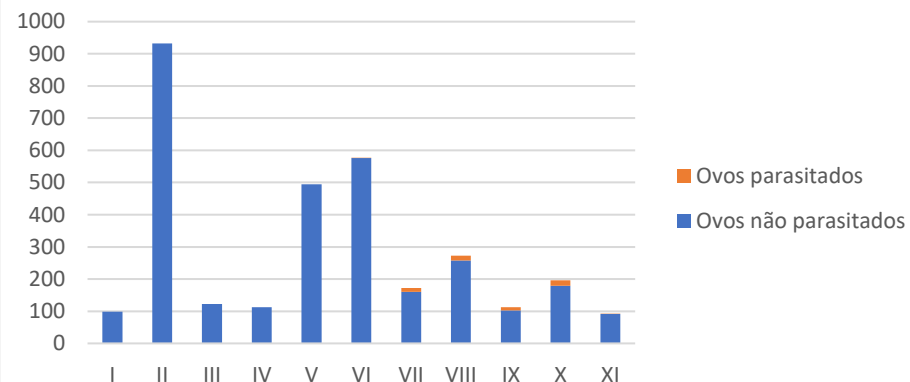
Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2007



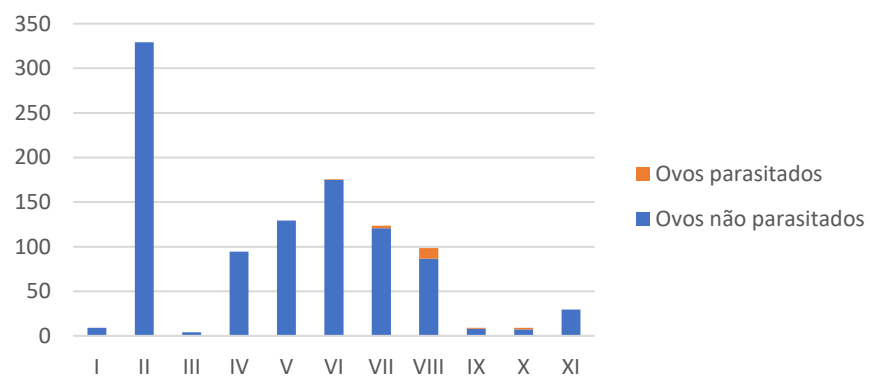
Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2013



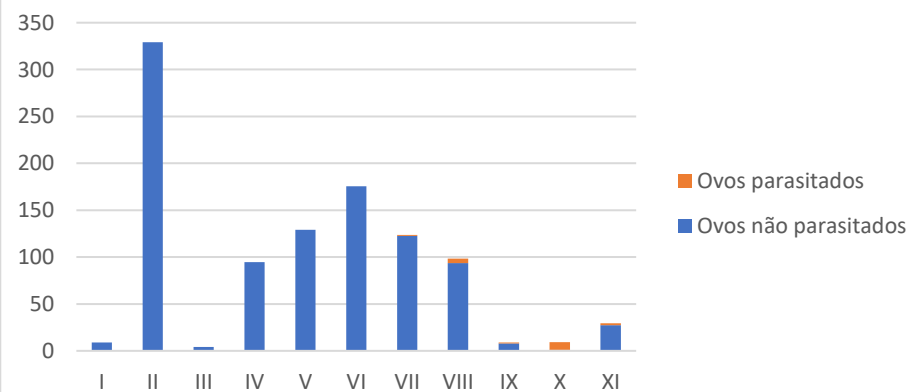
Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2014



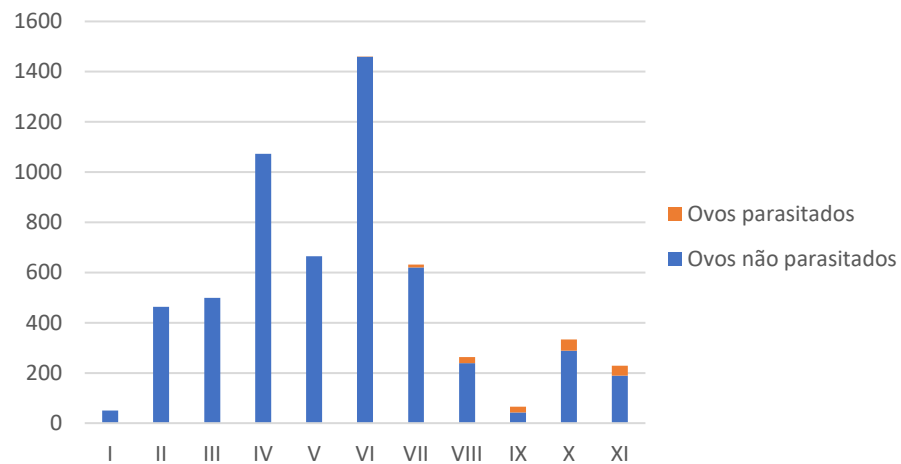
Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2016



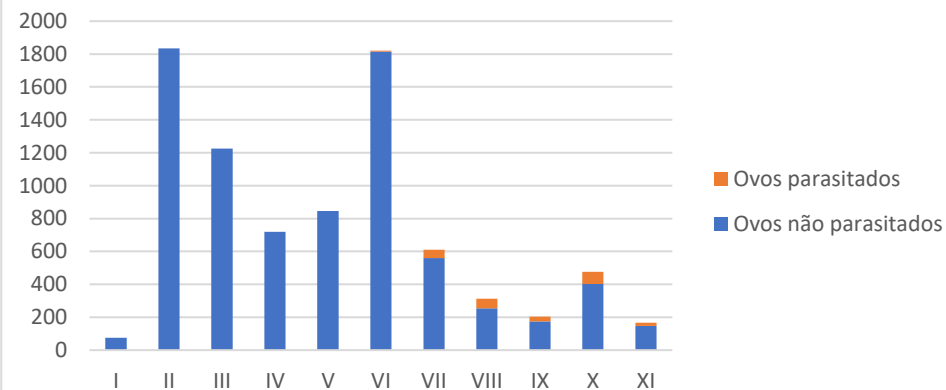
Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2017



Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2019

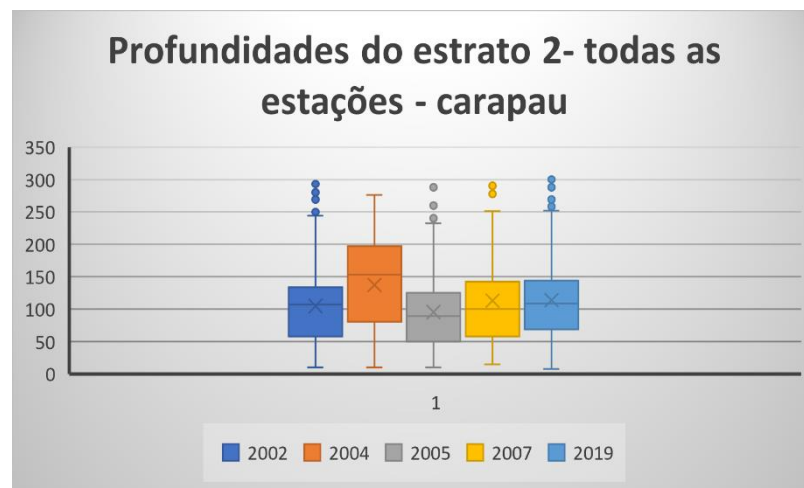
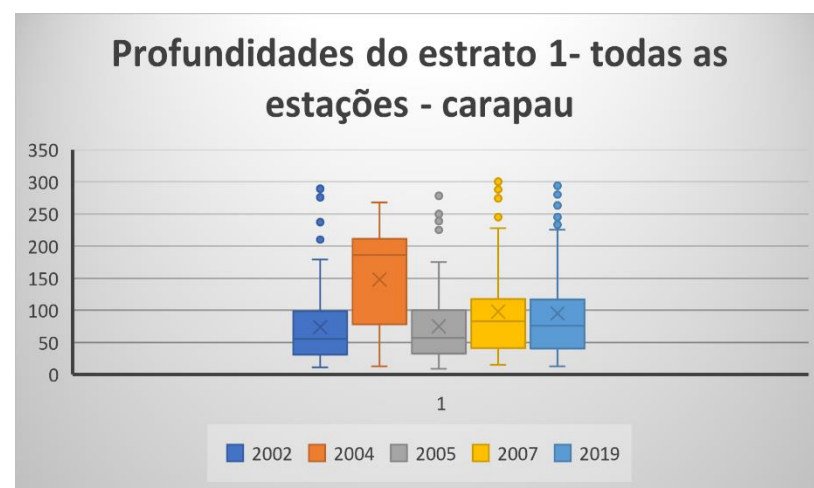
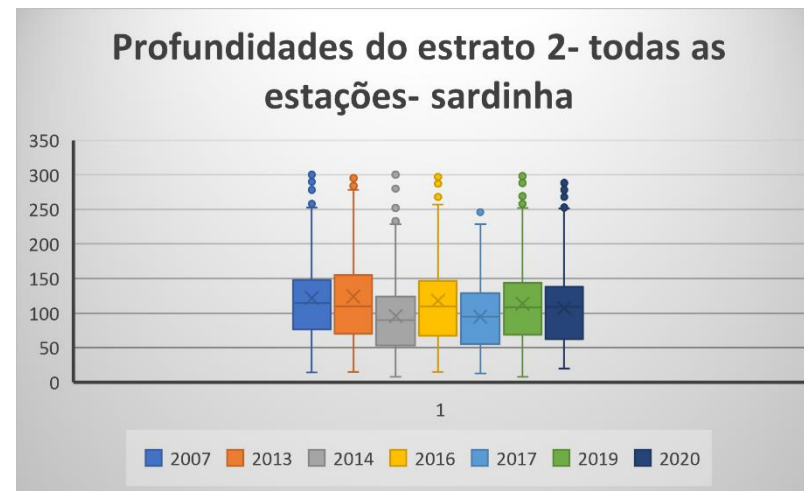
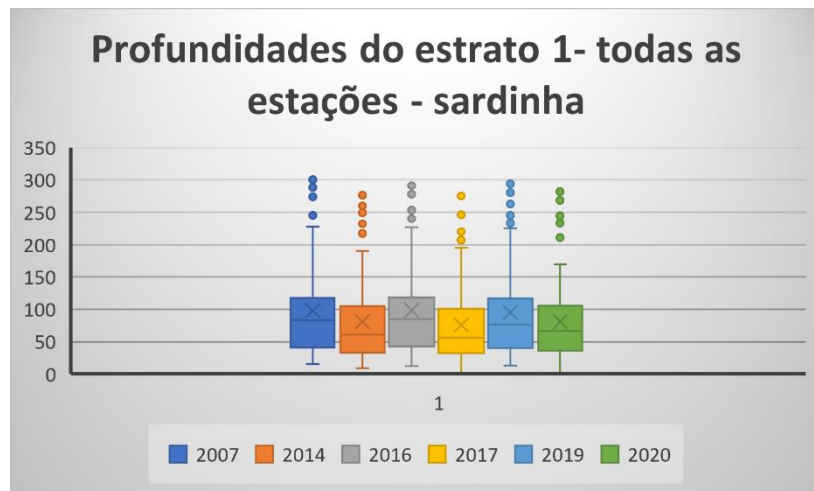


Classificação dos ovos de sardinha por estágio de desenvolvimento e parasitismo - 2020

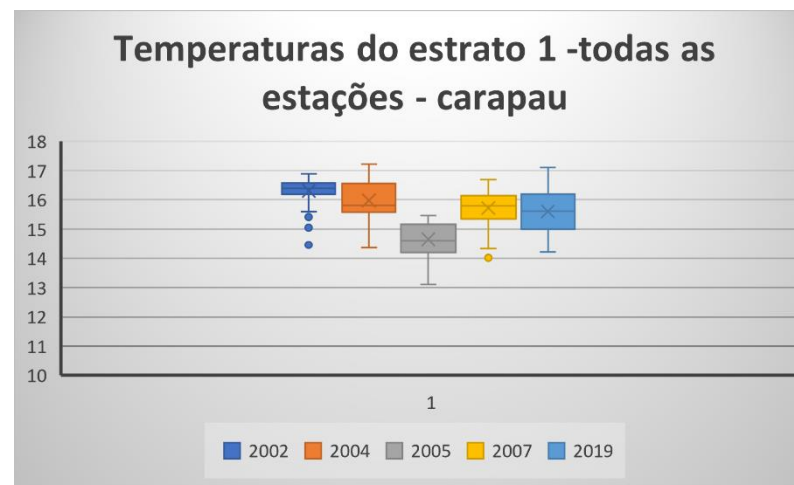
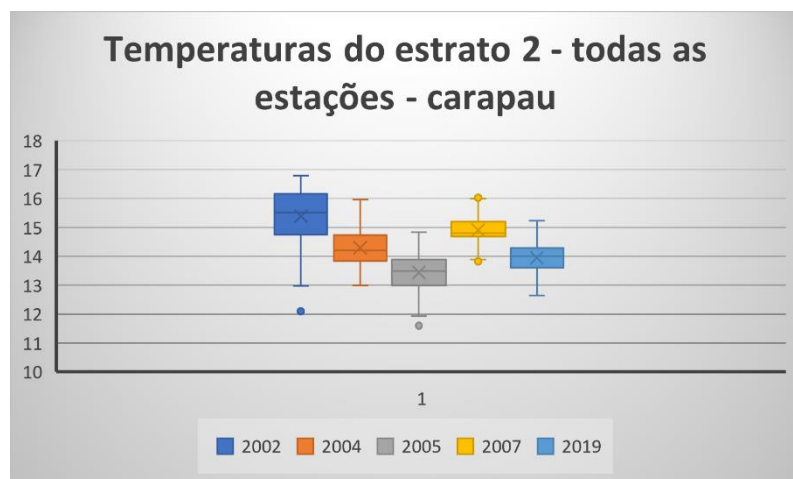
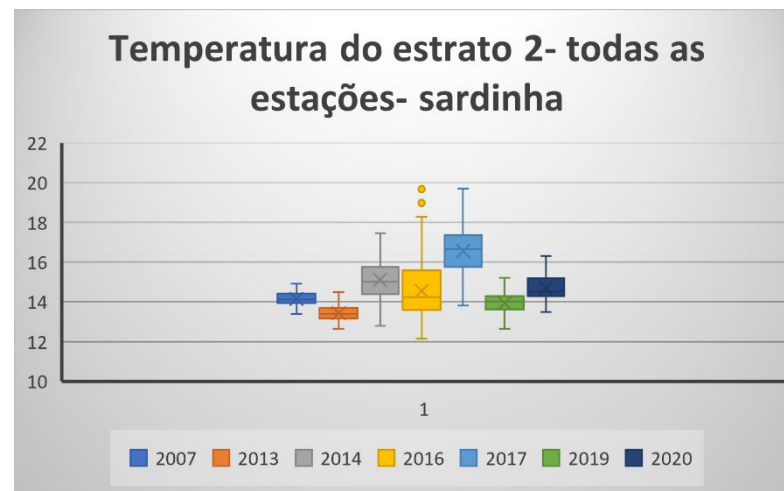
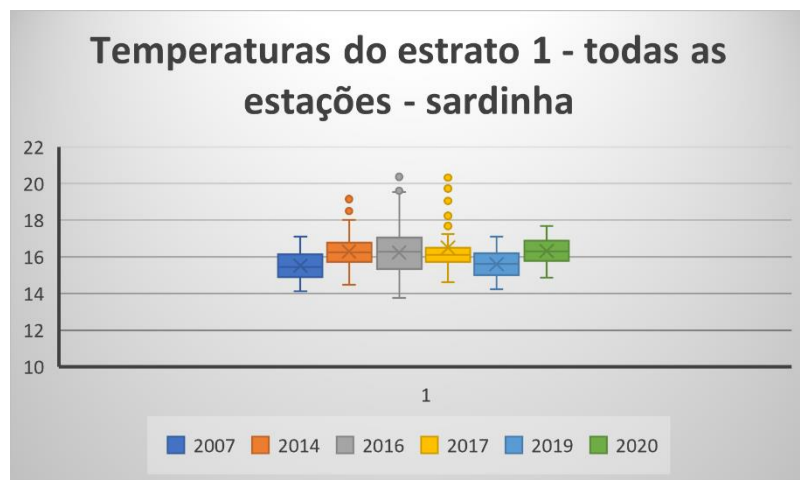


Anexo IV- Síntese dos valores fatores ambientais selecionados (profundidade, temperatura e salinidade) em todas as estações de amostragem, por espécie e estrato, em todos os anos de estudo.

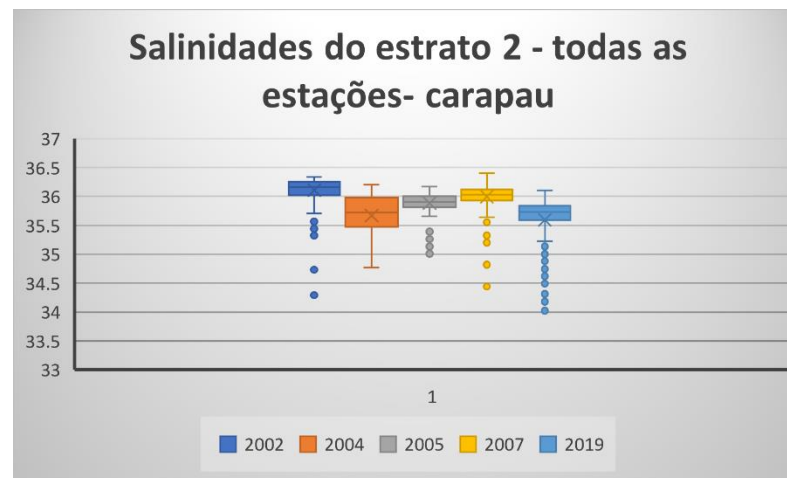
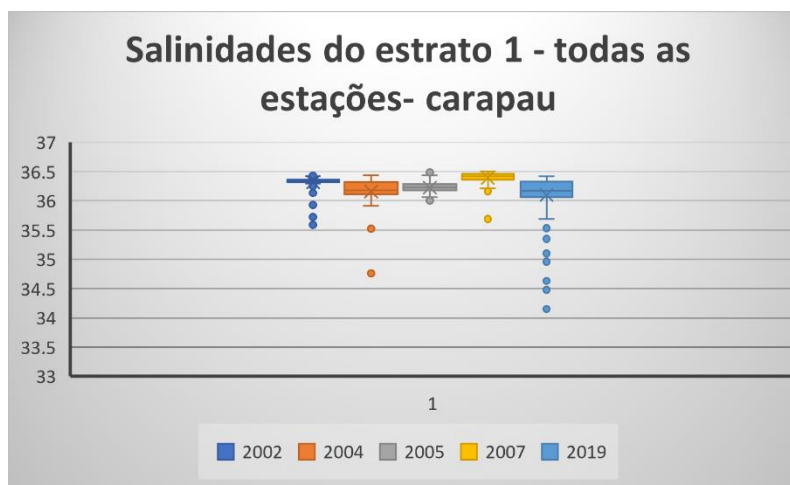
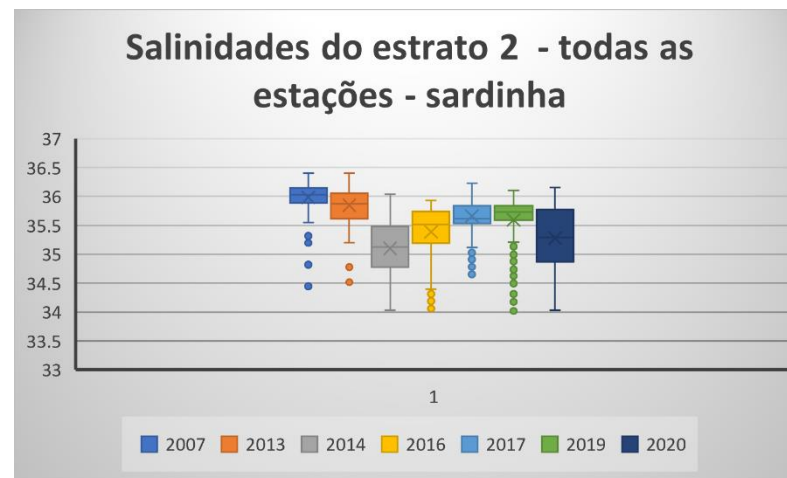
Profundidades – as profundidades superiores a 300m foram retiradas na construção destes gráficos.



Temperaturas



Salinidades- as salinidades inferiores a 34 foram retiradas na construção destes gráficos.



Anexo V – Informações dos indivíduos e gónadas de sardinha utilizados para análises moleculares para deteção de *Ichthyodinium chabelardi*.

Arrasto Pelágico	Observação	Comprimento (cm)	Peso (g)	Estado de maturação	Latitude	Longitude	Profundidade
AP2 04/03/2021	10	12,9	17	4	36,63	-6,58	68
	20	13,2	17	4	36,63	-6,58	68
	26	13,8	18	3	36,63	-6,58	68
	32	13,9	20	4	36,63	-6,58	68
	34	14,3	23	4	36,63	-6,58	68
	47	14,8	23	4	36,63	-6,58	68
	48	14,7	23	4	36,63	-6,58	68
	51	14,9	27	4	36,63	-6,58	68
	54	15,4	27	4	36,63	-6,58	68
	57	15	27	4	36,63	-6,58	68
	63	15,8	28	4	36,63	-6,58	68
	66	15,6	28	4	36,63	-6,58	68
	68	15,5	27	4	36,63	-6,58	68
	70	15,8	31	4	36,63	-6,58	68
AP4 05/03/2021	52	15,4	26	3	36,80	-6,79	59
	57	15,5	27	3	36,80	-6,79	59
	98	18,2	46	3	36,80	-6,79	59
	106	18,5	43	3	36,80	-6,79	59
	111	18,8	45	3	36,80	-6,79	59
	119	19	50	3	36,80	-6,79	59
AP7 06/03/2021	23	13,9	18	3	37,10	-7,12	30
	31	13,6	18	3	37,10	-7,12	30
	73	16,1	30	3	37,10	-7,12	30
	87	17,4	37	3	37,10	-7,12	30
	88	17,4	36	3	37,10	-7,12	30
AP9 06/03/2021	37	15,5	28	3	37,09	-7,44	38
	43	15,6	27	3	37,09	-7,44	38
	60	16,7	34	3	37,09	-7,44	38
	66	17	35	3	37,09	-7,44	38
	78	17,9	41	3	37,09	-7,44	38
	81	17,7	39	3	37,09	-7,44	38
	87	18,4	45	3	37,09	-7,44	38
	90	18,2	42	3	37,09	-7,44	38
	101	18,7	45	4	37,09	-7,44	38
	105	19,3	60	4	37,09	-7,44	38
	109	19,2	50	4	37,09	-7,44	38
	42	16	29	3	37,02	-7,57	81

AP10 07/03/2021	44	16,1	27	3	37,02	-7,57	81
	49	16,2	32	3	37,02	-7,57	81
	50	16,1	29	3	37,02	-7,57	81
	53	16,5	33	3	37,02	-7,57	81
	55	16,6	32	3	37,02	-7,57	81
	56	16,8	34	3	37,02	-7,57	81
	61	16,8	36	3	37,02	-7,57	81
	67	17	39	3	37,02	-7,57	81
	69	17,3	40	3	37,02	-7,57	81
	71	17,2	37	3	37,02	-7,57	81
	72	17,5	35	3	37,02	-7,57	81
	76	17,7	42	3	37,02	-7,57	81
AP11 - 07/03/2021	17	16,3	33	3	36,94	-7,83	94
AP18 10/03/2021	13	18,4	47	3	37,37	-8,86	43
	26	18,8	48	3	37,37	-8,86	43
	34	19,2	48	3	37,37	-8,86	43
	59	20,3	55	3	37,37	-8,86	43
	69	20,8	58	3	37,37	-8,86	43
	85	21,8	74	3	37,37	-8,86	43
AP19 10/03/2021	41	20,6	63	3	37,55	-8,93	140
	42	20,6	66	3	37,55	-8,93	140
	46	20,7	78	4	37,55	-8,93	140
AP20 11/03/2021	17	18,8	50	3	37,66	-8,91	122
	19	19,4	59	3	37,66	-8,91	122
	31	19,8	54	3	37,66	-8,91	122
	36	19,9	63	3	37,66	-8,91	122
	44	20,1	62	3	37,66	-8,91	122
AP22 12/03/2021	76	22,6	79	3	38,23	-8,80	30
	84	23,1	89	3	38,23	-8,80	30
AP29 16/03/2021	4	15,2	26	4	39,92	-9,03	41
	103	20,3	61	3	39,92	-9,03	41
	105	20,2	61	3	39,92	-9,03	41
	106	20,3	60	3	39,92	-9,03	41
	107	20,2	60	3	39,92	-9,03	41
	113	20,8	73	3	39,92	-9,03	41
AP31 17/03/2021	4	14,9	23	3	40,25	-8,91	33
	26	15,7	28	4	40,25	-8,91	33
	37	16,3	30	3	40,25	-8,91	33
	43	16,5	33	3	40,25	-8,91	33

	45	16,7	32	3	40,25	-8,91	33
	55	17,4	36	3	40,25	-8,91	33
AP32 18/03/2021	1	14,1	18	3	40,64	-8,88	48
	8	14,8	23	3	40,64	-8,88	48
	35	16	29	3	40,64	-8,88	48
	40	16,3	31	3	40,64	-8,88	48
	48	16,5	33	3	40,64	-8,88	48
	51	16,8	34	3	40,64	-8,88	48
AP33 18/03/2021	13	16,1	30	3	40,79	-8,90	46
	22	16,6	35	3	40,79	-8,90	46
	24	16,9	37	3	40,79	-8,90	46
	26	16,7	34	3	40,79	-8,90	46
	27	16,8	34	3	40,79	-8,90	46
	35	17,4	41	3	40,79	-8,90	46
	41	17,5	39	3	40,79	-8,90	46
CER109 11/03/2021	29	20	70	4	37,08	-8,85	41
	33	20,3	71	4	37,08	-8,85	41
	35	20,8	73	4	37,08	-8,85	41
	41	20,6	70	4	37,08	-8,85	41
	47	21,1	79	4	37,08	-8,85	41
	57	21,9	89	4	37,08	-8,85	41
	60	21,7	82	4	37,08	-8,85	41
	66	22,6	85	4	37,08	-8,85	41
	67	21,5	83	3	37,08	-8,85	41

Colunas

Protocolo de extração: Tecido/Sangue

1. Cortar cerca de 30mg/150ml de tecido/sangue e colocar num eppendorf de 1.5ml.
2. Adicionar 300 µl de *ACL Solution* ao eppendorf de 1.5ml e 20 µl de *Proteinase K*.
3. Incubar a 55 °C durante a noite ou (1-3 horas). Agitar ocasionalmente os tubos.
4. Vortexar durante 20 segundos e centrifugar a 14.000rpm durante 5 minutos.
5. Pipetar 300 µl de sobrenadante para as colunas de EasySpin e adicionar 300 µl de *AB Solution*. Misturar suavemente invertendo os tubos. Deixar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
6. Centrifugar a 4.000rpm durante 2 minutos e descartar o líquido do tubo colector.
7. Adicionar 500 µl de *Wash Solution* e centrifugar a 8.000rpm durante 1 minuto. (Repetir-2X)
8. Descartar o líquido do tubo colector. Centrifugar a 14.000rpm durante 5 minutos de forma a remover algum resíduo de *Wash Solution*.
9. Colocar a coluna num eppendorf definitivo de 1.5ml (marcado a preto – 1ª Eluição) e adicionar 50 µl de *Elution Buffer*. Incubar na estufa a 55 °C durante 10 minutos.
10. Centrifugar a 14.000rpm durante 5 minutos de forma a retirar o ADN da coluna.
11. Repetir o passo 9, marcando a vermelho o tubo definitivo (2ª Eluição).
12. Centrifugar a 14.000rpm durante 5 minutos de forma a retirar o ADN da coluna.

Anexo VII – Condições e programa de temperaturas para os PCR's de ampliação de ADN extraído das gónadas de sardinha.

Primeiro PCR:

- Passo inicial de desnaturação: 95°C por 3 minutos;
- 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, ligação de primers a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos;
- Extensão final: 72°C por 6 minutos. (Skovgaard *et al.*, 2010)

Segundo PCR:

- Passo inicial de desnaturação: 95°C por 10 minutos;
- 9 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, ligação de primers a 60°C por 1 minuto (a cada um destes 9 ciclos, a temperatura de anelamento desceu 1°C até atingir os 52°C, de modo a que ocorresse um aumento da especificidade do ADN amplificado) e extensão a 72°C por 2 minutos;
- 31 ciclos de de desnaturação a 95°C por 1 minuto, annealing a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos;
- Extensão final: 72°C por 10 minutos.