



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 1 • p 54-66

Comunicação química em sistemas predador-presa alterados: um contributo para a controvérsia

Bruno B Castro^{*}
Susana Consciência
Fernando Gonçalves

O efeito de infoquímicos produzidos por duas espécies de peixes (gambúzia e perca-sol) foi avaliado em ensaios de reprodução com uma das suas presas preferenciais (o microcrustáceo *Daphnia*, ou pulga-de-água). Em comparação com um controlo sem infoquímicos, *Daphnia longispina* respondeu de forma similar aos sinais de ambos os predadores, produzindo ninhadas mais numerosas e mais cedo, bem como reduzindo o tamanho corporal das primíparas e dos neonatos. Este decréscimo de tamanho corporal foi proporcional ao aumento na densidade de peixe (medida indirecta da concentração dos infoquímicos). A redução do tamanho corporal (quer nas primíparas, quer nos neonatos) constitui uma resposta adaptativa à predação selectiva exercida pelos peixes (preferem os exemplares de maiores dimensões). Por outro lado, o incremento da fecundidade representa um mecanismo compensatório para fazer face à mortalidade causada por predadores. Dado que ambas as espécies de peixe foram introduzidas apenas durante o século XX na fauna Europeia, era expectável que *Daphnia* não respondesse aos sinais químicos destes predadores, ao contrário do que sucedeu. Isto suporta a teoria de um infoquímico inespecífico, independente da espécie de predador. Mais, todas as evidências apontam para que a natureza do infoquímico esteja relacionada com a ingestão prévia da presa.

Palavras-chave

comunicação química;
interacção predador-presa;
resposta adaptativa;
peixes;
Daphnia;
espécies alienígenas.

CESAM e Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro.

^{*}brunocastro@ua.pt

INTRODUÇÃO

A comunicação entre seres vivos (entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes) é, em grande parte, mediada por substâncias químicas que adquiriram um valor adaptativo ao longo do processo evolutivo (Agosta, 1992; Blum, 1996; Vet, 1999). Aos sinais químicos que constituem agentes de comunicação entre organismos dá-se o nome de infoquímicos ou semioquímicos. Este último termo deriva do étimo grego *semion*, que significa sinal ou marca. Os infoquímicos desempenham um papel fulcral nas interações intra- e inter-específicas e o seu valor adaptativo está particularmente bem estudado nas interações entre insectos (Agosta, 1992; Blum, 1996; Suckling e Karg, 1999), e entre plantas e insectos (Raven et al., 1992). Consoante o tipo de relação específica que medeiam, os infoquímicos são normalmente classificados em dois grandes grupos: feromonas e aleloquímicos. As feromonas são substâncias produzidas por determinado organismo com o intuito de despoletarem reacções comportamentais ou fisiológicas específicas em conspécificos (indivíduos da mesma espécie) que detectem o sinal químico (Agosta, 1992; Blum, 1996). As feromonas sexuais, por exemplo, promovem a atracção entre machos e fêmeas (inclusive em humanos); outras feromonas podem induzir reacções de alarme em conspécificos ou sinalizar um trilho entre a colónia e uma potencial fonte de alimento, entre outros comportamentos (ver Agosta, 1992). Os aleloquímicos, por seu turno, são substâncias que estabelecem comunicação química entre indivíduos de espécies diferentes (Blum, 1996; Ruther et al., 2002). A emissão destes sinais pode beneficiar a espécie emissora (alomonas), a receptora (cairomonas), ou ambas (sinomonas)¹ (Dicke e Sabelis, 1988). O valor adaptativo dos aleloquímicos (alomonas, cairomonas, e sinomonas) nas relações inter-específicas tem sido alvo de destaque na literatura especializada (ver Vet, 1999). Destacam-se, por exemplo, os mensageiros moleculares (sobretudo cairomonas) que medeiam relações predador-presa (predação) ou hospedeiro-parasita (parasitismo) (Ruther et al., 2002).

No contexto da Ecologia de água doce, o modelo predador-presa envolvendo os peixes e as pulgas-de-água (um grupo de microcrustáceos que ocorre em todo o tipo de *habitats* de água parada, desde charcos a lagos e albufeiras) tem recebido substancial atenção no âmbito da comunicação química (ver Burks e Lodge, 2002; Lass e Spaak, 2003). As pulgas-de-água (*Daphnia* spp., ver Figura 1A) são pequenos herbívoros (tamanho corporal do adulto 2-4 mm) que vivem na coluna de água (pertencem ao grupo de organismos denominado de plâncton, por não possuírem movimentos natatórios suficientemente fortes para resistir à deslocação das massas de água). Aí, estes consumidores primários alimentam-se de seres fotossintéticos microscópicos (microalgas) e constituem uma fonte de alimento importante para os peixes, ocupando por isso uma posição de charneira na transferência de energia na teia alimentar (Hebert, 1978; Alonso, 1996; Castro, 2007). O seu modo de reprodução principal é a partenogénese, onde fêmeas dão origem a uma prole de fêmeas (neonatos), de forma cíclica; ocasionalmente, as pulgas-de-água produzem também ovos sexuais e machos para os fecundar. Na presença de regimes de predação intensos, as pulgas-de-água reagem à presença de peixes (sinalizada por cairomonas) através de defesas morfológicas ou comportamentais (assim reduzindo a mortalidade) e defesas reprodutivas (incrementando a sua fecundidade). Deste modo, é-lhes possível contrabalançar, até um certo nível, as perdas causadas pelos predadores. Estas respostas a predadores são mediadas por sinais químicos hipoteticamente libertados

¹ Na ausência de literatura em Língua Portuguesa sobre o tema, a nomenclatura aqui apresentada – e sua tradução do Inglês – seguiram a usada na disciplina de Química dos Produtos Naturais (Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa), cujos conteúdos estão disponíveis em <http://www.dqb.fc.ul.pt/cu/44361.htm> (acedido em Junho de 2009).

pelos peixes planctívoros (Burks e Lodge, 2002; Lass e Spaak, 2003) e todas têm custos para o indivíduo, à escala metabólica, fisiológica, e reprodutiva. Não sendo mutuamente exclusivas, qualquer combinação de respostas (morfológicas, comportamentais, reprodutivas) é possível mediante um compromisso entre a estratégia defensiva menos dispendiosa do ponto de vista energético e a mais eficaz, consoante a situação (Boersma et al., 1998; De Meester e Weider, 1999; Sakwinska e Dawidowicz, 2005). À semelhança de outros casos de comunicação química (ver Dicke e Sabelis, 1988), subsistem ainda dúvidas quanto à origem, natureza, e percepção do sinal químico que medeia a reacção anti-predador das pulgas-de-água (Burks e Lodge, 2002; Lass e Spaak, 2003).

Em *Daphnia*, as alterações morfológicas induzidas pela presença de peixes envolvem normalmente uma diminuição do volume corporal da presa, como resposta adaptativa a predadores visuais, que se alimentam preferencialmente dos indivíduos com maior tamanho corporal, mais visíveis na coluna de água (Lass e Spaak, 2003; Stabell et al., 2003). As defesas comportamentais são induzidas numa escala temporal muito curta e envolvem mecanismos de evitamento, fototaxia (deslocamento em função da luz) ou agregação; estes mecanismos constituem a base de comportamentos mais complexos como, por exemplo, a migração vertical na coluna de água para as zonas mais profundas, durante as horas de luz, onde se tornam menos visíveis (Lass e Spaak, 2003). As respostas reprodutivas produzem efeitos a médio prazo e têm implicações na dinâmica populacional das pulgas-de-água. O padrão mais habitual de resposta à presença de predadores (ou à presença de um infoquímico que assinala a sua presença) é a diminuição da idade e tamanho das primíparas², normalmente a par com a produção de ninhadas com maior número de neonatos de menores dimensões (e.g. Engelmayer, 1995; Weber, 2003; Hülsmann et al., 2004). O tamanho e a idade das primíparas são considerados os caracteres mais afectados pela presença de predadores (Hülsmann et al., 2004), e este cenário representa claramente uma resposta adaptativa à predação selectiva (em termos de tamanho corporal) exercida pelos peixes. Apesar de comumente aceite, esta teoria não está livre de controvérsia, gerada por evidências inconsistentes presentes na literatura. Por exemplo, nos trabalhos de Sakwinska (1998) e Michels e De Meester (2004) não foram observados quaisquer efeitos de infoquímicos de peixes, sobre as suas presas. Outros autores relataram, inclusivamente, redução ou atraso na reprodução das pulgas-de-água na presença de predadores (Burks et al., 2000; Hanazato et al., 2001), o que é contraditório com a teoria vigente.

Com o intuito de contribuir para reduzir a controvérsia sobre este tema, levámos a cabo uma experiência simples num modelo predador-presa, tendo como base a teia trófica de um lago eutrófico e pouco profundo (Lagoa da Vela, Figueira da Foz). Para tal, avaliámos as respostas reprodutivas e morfológicas de *Daphnia longispina* na presença indirecta (via infoquímicos) dos seus predadores mais importantes neste sistema lacustre: a gambúzia (*Gambusia holbrooki*) e a perca-sol (*Lepomis gibbosus*). Nenhuma destas espécies é nativa da Europa, e a sua introdução na Península Ibérica ocorreu em momentos distintos (Almaça, 1995b). Na Lagoa da Vela, crê-se que a gambúzia (em inglês, “mosquitofish”) terá sido introduzida no início do século XX com o propósito de controlar as populações de mosquitos (vector da malária); já a perca-sol foi registada pela primeira vez no final do mesmo século (J. Vingada, comunicação pessoal), sendo na actualidade a principal espécie de peixe da Lagoa (Castro, 2007). A perca-sol representa um evidente

² Este termo é aqui aplicado para designar as fêmeas que carregam a sua primeira ninhada de ovos (resultantes de reprodução assexuada). Os ovos das pulgas-de-água (*Daphnia*) são produzidos nos ovários e lançados num espaço próprio entre a massa visceral e a carapaça (exosqueleto), denominado câmara de incubação (ver Figura 1A).

problema de conservação em vários lagos e albufeiras da Península Ibérica, onde desempenha o papel de principal espécie planctívora, tendo conduzido ao desaparecimento da comunidade indígena de ciprinídeos em muitos locais (e.g. ver Almaça, 1995a). Acrescente-se ainda que a gambúzia é um peixe mais pequeno do que a perca-sol, e apresenta uma evidente limitação no tamanho da sua boca quando pretende ingerir pulgas-de-água de maiores dimensões; o seu impacto sobre o plâncton é, por isso, necessariamente diferente.

Este estudo foi conduzido com o objectivo de avaliar se a gambúzia e a perca-sol eram capazes de despoletar respostas de uma presa (as pulgas-de-água) através da produção e libertação de infoquímicos (requer um processo adaptativo), apesar de não serem originalmente nativos da região. Mais, a nossa experiência visava descobrir se as diferenças ecológicas entre as espécies de predador justificariam diferente percepção do sinal e resposta por parte das pulgas-de-água (*D. longispina*).



MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e manutenção dos organismos

As culturas de *D. longispina* (Figura 1A) foram estabelecidas a partir de um único ovo sexuado da Lagoa da Vela (Antunes et al., 2003), por eclosão e subsequente reprodução assexuada. Deste modo, fica garantida a identidade única do genótipo em estudo, assim como a repetibilidade (variabilidade das medições efectuadas pelo mesmo experimentador ao longo do tempo) e reprodutibilidade (variabilidade das medições efectuadas por vários experimentadores) dos estudos conduzidos com esta linhagem. A ausência de variabilidade genética entre os organismos experimentais é conveniente para o experimentador, já que lhe permite esperar respostas semelhantes, quando estes são expostos ao mesmo factor e nas mesmas condições. A estratégia reprodutiva e a facilidade de manutenção em laboratório de *Daphnia* conferiram-lhe um papel de destaque neste tipo de estudos (ver De Meester, 1996).

As pulgas-de-água foram cultivadas numa câmara fitoclimática, com fotoperíodo (16 h de luz e 8 h de escuridão) e temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados. Os animais foram cultivados (Figura 1B) em grupos de 30-40 indivíduos, em frascos de 1 L com água reconstituída (192 mg L^{-1} de NaHCO_3 , 120 mg L^{-1} de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 120 mg L^{-1} de MgSO_4 , e 8 mg L^{-1} de KCl) (USEPA, 2002), enriquecida com 4 mL L^{-1} de um aditivo orgânico³ (Baird et al., 1989). O meio era renovado cada segunda-, quarta-, e sexta-feira, e os organismos alimentados diariamente com uma suspensão de micro-algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*, $1,5 \times 10^5$ células mL^{-1}), cultivada em meio próprio (Figura 1C). O cultivo de micro-algas para alimentação de crustáceos requer alguns recursos laboratoriais de difícil acesso, apesar de existirem algumas receitas em *websites* de aquarofilia; outras alternativas estão disponíveis, como o uso de alimento seco (e.g. levedura de padeiro liofilizado). Em qualquer dos casos, a padronização da quantidade de alimento fornecida é importante, podendo ser feita em função da biomassa (fermento, ou seja, levedura) fornecida ou da densidade celular (microalgas). Os juvenis nascidos entre a terceira e a quinta ninhada, produzidas assexuadamente (por partenogénese), foram utilizados para renovar a cultura (descartando as mães adultas) ou nas experiências (ver abaixo).

³ Este aditivo orgânico não é mais do que um extracto de uma alga marinha (*Ascophyllum nodosum*), que funciona como suplemento nutritivo, fornecendo alguns elementos essenciais para o crescimento e reprodução das pulgas-de-água. É um suplemento padronizado, comercializado como fertilizante.

Os peixes (Figura 2A-B) foram capturados na Lagoa da Vela com redes de mão e de cerco para terra, e mantidos em aquários com água reconstituída (ver acima) até à realização das experiências. Os aquários foram colocados sob as mesmas condições de luz e fotoperíodo indicadas acima. Durante o período de quarentena (1-2 semanas), os animais foram alimentados com uma dieta que incluía pulgas-de-água e larvas de mosquito vivas, alternando com flocos artificiais.



FIGURA 1: Cultura e experimentação com pulgas-de-água (*Daphnia* spp.): **A**) fêmea adulta de *Daphnia longispina* carregando ovos assexuados na câmara de incubação (ampliada por estereoscopia); **B**) frascos de cultura de *Daphnia* em sala com temperatura e fotoperíodo controlados; **C**) cultura de micro-alga verde (alimento para *Daphnia*); **D**) ensaio de reprodução com *Daphnia* a decorrer.

Obtenção da cairomona (infoquímico)

No dia anterior ao início das experiências (dia -1), prepararam-se 3 aquários de 10 L (Figura 2C) nas mesmas condições indicadas para as culturas (água reconstituída, luz, e temperatura). Num dos aquários, foram colocadas 10 gambúzias adultas (correspondente a uma densidade de 1 peixe L⁻¹; tamanho total médio: 35 mm; peso fresco médio: 0,34 g); noutra, introduzimos 5 juvenis de perca-sol (densidade de 0,5 peixe L⁻¹; tamanho total médio: 45 mm; peso fresco médio: 1,1 g). Estes aquários destinavam-se a obter os infoquímicos de gambúzia e perca-sol, respectivamente (Figura 2A-C). Experiências preliminares haviam confirmado que 24 h constituíam um período de tempo adequado para produzir infoquímicos em concentração suficiente para induzir respostas em *Daphnia*, apesar da origem das cairomonas de peixe (bactérias, muco, produtos de digestão) ser ainda desconhecida. O terceiro aquário permaneceu sem adição de qualquer peixe, funcionando como tratamento livre de infoquímico (controlo negativo).

No início da experiência (dia 0), retirámos 2 L de água de cada aquário; essa água foi filtrada em vácuo através de filtros de fibra de vidro (diâmetro 47 mm; poro 1,2 µm) para remover impurezas e restos de fezes, e foi utilizada como fonte de infoquímicos para a experiência (ver abaixo). Para compensar a água retirada, foi sempre adicionada igual quantidade de água reconstituída, preparada de fresco, a cada um dos aquários. Antes da remoção de água para a experiência, os peixes foram transferidos para um aquário mais pequeno, onde lhes foi permitido alimentarem-se durante 5-10 min (enquanto se procedia à troca de água dos aquários). De forma a simular a sua dieta habitual, o alimento fornecido consistiu em pulgas-de-água e larvas de mosquito vivas. É importante isolar os peixes na altura da alimentação, de forma a minimizar a potencial formação de infoquímicos (sinais de alarme) libertados pelas presas (Pijanowska e Kowalczewski, 1997; Slusarczyk e Rygielska, 2004), e que poderiam interagir com o infoquímico do predador.

Ao longo do tempo, procedemos à monitorização do teor de oxigénio (com oxímetro portátil, WTW) dos aquários e da concentração de amónia (com um kit de fotometria, Hach-Lange). Este procedimento

justificou-se face às densidades (carga) de peixe utilizadas, que poderiam traduzir-se na acumulação de produtos de excreção e comprometimento da qualidade da água dos aquários.

A água do aquário controlo foi usada como tratamento CTL e também para diluir os meios com infoquímicos (ver abaixo). No tratamento com maior concentração de infoquímico, a água dos aquários com peixes foi utilizada sem diluição (1,0 gambúzia L⁻¹ e 0,50 perca-sol L⁻¹); noutro tratamento, foi misturada com igual quantidade (250 mL + 250 mL) de água do aquário CTL (0,50 gambúzia L⁻¹ e 0,25 perca-sol L⁻¹); no tratamento com menor concentração de infoquímico, a água dos aquários com peixes foi diluída 5 vezes (0,20 gambúzia L⁻¹ e 0,10 perca-sol L⁻¹), misturando 100 mL com 400 mL de água CTL.



FIGURA 2: Predadores de pulgas-de-água: A) gambúzias adultas (*Gambusia holbrooki*); B) percas-sol juvenis (*Lepomis gibbosus*); C) monitorização do oxigénio dissolvido nos aquários onde se obteve os infoquímicos para cada uma das espécies de peixe e controlo.

Ensaios de reprodução em *Daphnia*

As experiências foram conduzidas durante 14 dias sob as mesmas condições de luz e temperatura descritas acima. Cada tratamento experimental consistiu na exposição de pulgas-de-água, individualmente (1 organismo por frasco), a sucessivas diluições da água de cada um dos aquários (ver acima), do seguinte modo: ausência de infoquímico ou controlo negativo (CTL); infoquímico de gambúzia (0,20; 0,50; 1,0 peixe L⁻¹); infoquímico de perca-sol (0,10; 0,25; 0,50 peixe L⁻¹). Isto totalizou 7 tratamentos x 10 réplicas (repetições do tratamento) = 70 frascos (Figura 1D). O início do ensaio (dia 0) ocorreu com a introdução das pulgas-de-água; para garantir as mesmas condições à partida em todos os frascos, a experiência foi iniciada com neonatos (juvenis com idade inferior a 24 h, obtidos a partir das culturas laboratoriais). O conteúdo de cada frasco (50 mL de água do tratamento respectivo) foi renovado diariamente com soluções frescas, sendo as pulgas-de-água transferidas com uma pipeta de plástico. É importante escolher um intervalo de renovação curto, já que a degradação dos infoquímicos pode ocorrer apenas algumas horas após a sua libertação (Dodson, 1988). Aquando da renovação da água dos frascos, foram também adicionadas as doses pré-definidas de aditivo orgânico e alimento (suspensão algal), conforme descrito acima.

Diariamente, acompanhámos o estado dos organismos, aquando da sua transferência para novos frascos. Ao fim de alguns dias, foi possível observar a presença de ovos na câmara de incubação (Figura 1A); para cada fêmea portadora da primeira ninhada de ovos (primípara), mediu-se o tamanho da carapaça (desde o topo da cabeça à base do espinho caudal). Para determinar o tamanho corporal das fêmeas primíparas, estas foram retiradas dos frascos (com pipeta de plástico) e colocadas numa caixa de Petri em apenas uma gota de água, sendo posteriormente medidas à lupa (estereoscópio) com o auxílio de ocular micrométrica; logo após a medição, as fêmeas foram devolvidas ao frasco respectivo. Estes procedimentos foram

realizados o mais rápido possível para minimizar danos nas fêmeas ou sua descendência. O acompanhamento diário das fêmeas prosseguiu, com o número de juvenis produzidos nas várias ninhadas a ser contabilizado em cada frasco individual. Para a primeira ninhada, efectuaram-se ainda medições do tamanho corporal dos neonatos, usando um procedimento similar ao empregue no caso das primíparas. No final do ensaio, foi possível produzir uma tabela de vida (McCallum, 2000) com registos diários de sobrevivência e reprodução. Daqui resultaram estimativas do número total de neonatos produzidos por fêmea, o número total de ninhadas produzidas por fêmea, e a idade à primeira reprodução.

Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados obtidos é um passo fulcral para suportar de forma objectiva (recorrendo à matemática) as conclusões da experiência. A partir do resultado estatístico observado, são depois retiradas as devidas inferências quanto ao seu significado biológico. Em terminologia estatística (e ao longo deste artigo), o uso da palavra “significância” e seus derivados (“significativo”, “significativamente”, etc) subentende uma associação entre variáveis ou uma diferença entre tratamentos experimentais que, para além de serem eventualmente observáveis em gráfico, têm significado estatístico.

Os parâmetros obtidos no final do ensaio foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) para averiguar se as diferentes concentrações de infoquímicos (expressas em densidade de peixe L^{-1}) alteraram significativamente algum desses parâmetros, comparativamente com o tratamento controlo (CTL). De forma a avaliar se a resposta de determinada variável (ou parâmetro) era dependente da concentração de infoquímico de peixe, utilizou-se uma análise de correlação. A associação entre duas variáveis, que pode ser positiva ou negativa, é tanto mais forte quanto mais perto de 1 ou -1 estiver o coeficiente de correlação.

RESULTADOS

Durante a experiência, não se registou mortalidade dos peixes no aquário e apenas se registou a morte ocasional de 2 pulgas-de-água fêmeas, de um total de 70. O teor em oxigénio dissolvido e a concentração de amónia nos aquários de obtenção de infoquímicos mantiveram-se sempre em níveis satisfatórios.

No final dos 14 dias de ensaio, foi possível observar diferenças subtis entre os tratamentos com infoquímicos de peixes e o tratamento CTL (ausência de infoquímicos). Regra geral, a estratégia das pulgas-de-água observada ao longo do ensaio foi semelhante na presença de infoquímicos de ambas as espécies de peixes. A Figura 3 ilustra a fecundidade cumulativa registada ao longo do ensaio, onde é perceptível que a presença de infoquímicos de ambas as espécies induziu a produção de maior número de juvenis, independentemente da concentração do infoquímico (não foram encontradas correlações significativas entre nenhum dos parâmetros reprodutivos e a densidade de peixe). De facto, registou-se uma produção significativamente maior de neonatos e de ninhadas na presença de infoquímicos (quando comparado com o CTL), para todas as densidades de predador (Figura 4; as diferenças estatísticas relativamente ao tratamento CTL estão devidamente assinaladas com um asterisco). Mais, foi também possível observar que a primeira ninhada foi libertada por quase todas as fêmeas expostas a infoquímicos ao 7º dia, ao passo que no tratamento CTL o nascimento decorreu entre os dias 7-9 (Figura 3). Isto traduziu-se numa idade à primeira reprodução significativamente menor nas pulgas-de-água expostas a infoquímicos de predadores, quando comparadas com o tratamento CTL (Figura 4).

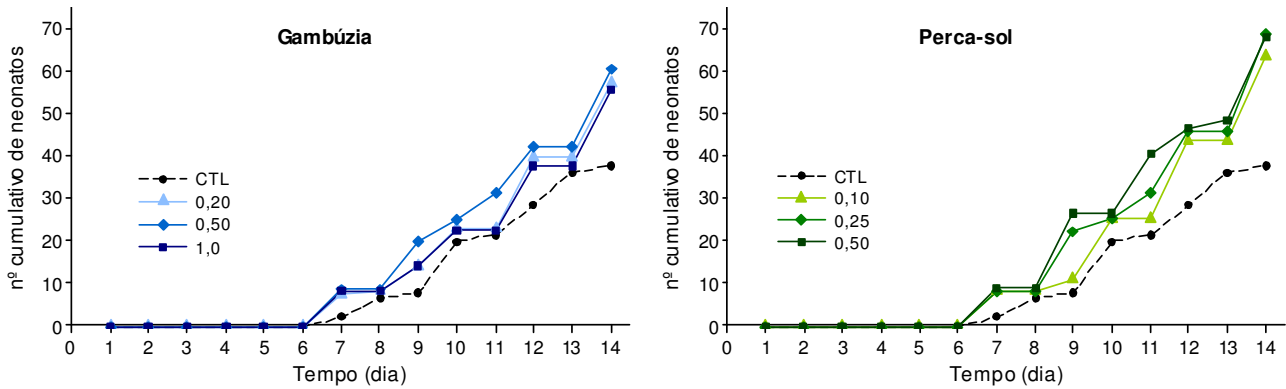


FIGURA 3: Fecundidade cumulativa (nº cumulativo de neonatos produzidos por fêmea) ao longo do tempo de *Daphnia longispina* exposta a infoquímicos dos seus predadores (gambúzia e perca-sol). Cada linha representa um tratamento experimental, representando a ausência (CTL) ou a presença de infoquímicos (a densidade de predador está indicada na legenda em peixe L⁻¹).

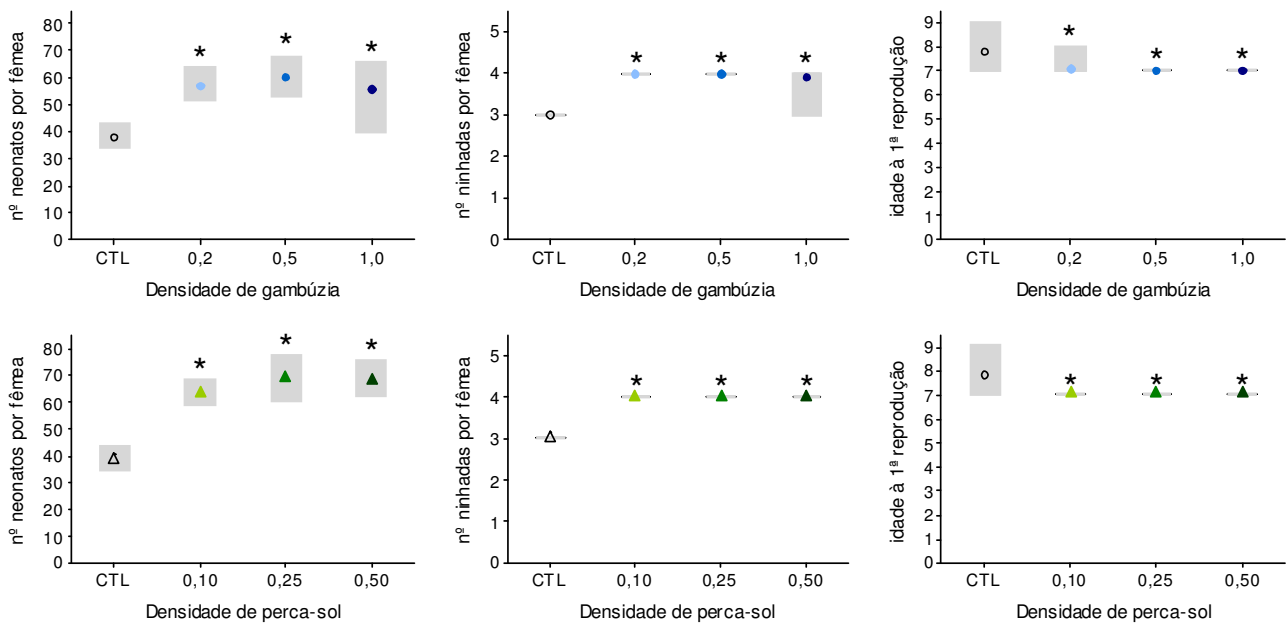


FIGURA 4: Variação dos parâmetros reprodutivos (nº de neonatos por fêmea, nº ninhadas por fêmea, e idade à primeira reprodução) de *Daphnia longispina* exposta a infoquímicos dos seus predadores (gambúzia – em cima; perca-sol – em baixo). A concentração de infoquímico é traduzida pela densidade dos seus predadores, em peixe L⁻¹ (ver eixo dos abcissas), e a ausência de infoquímico é representada pelo tratamento CTL. Para cada parâmetro, é apresentado o valor médio (gambúzia – círculos; perca-sol – triângulos) de cada tratamento e o intervalo (mínimo-máximo) das observações individuais (rectângulo a cinza). Os asteriscos assinalam diferenças estatísticas relativamente ao tratamento CTL (ver texto).

O tamanho corporal das primíparas foi significativamente menor do que CTL para todas as densidades de gambúzia e para as duas maiores densidades de perca-sol (Figura 5; as diferenças estatísticas relativamente ao tratamento CTL estão devidamente assinaladas com um asterisco). A redução no tamanho corporal das pulgas-de-água expostas a infoquímicos de peixe foi também perceptível nos neonatos produzidos; o tamanho corporal dos neonatos da primeira ninhada foi significativamente menor nos tratamentos com infoquímicos (apenas nas concentrações mais altas – ver Figura 5) quando comparado com o tratamento CTL. Quer este parâmetro, quer o tamanho corporal das primíparas, diminuíram significativamente (correlações indicadas na Figura 5) com o aumento da densidade de ambos os

predadores (gambúzia e perca-sol). Os elevados coeficientes de correlação significam que, à medida que a densidade de peixes aumenta (e subsequentemente a concentração de infoquímico aumenta), as pulgas-de-água libertam os ovos para a câmara de incubação com um tamanho corporal proporcionalmente menor, e produzem neonatos também progressivamente menores (Figura 5).

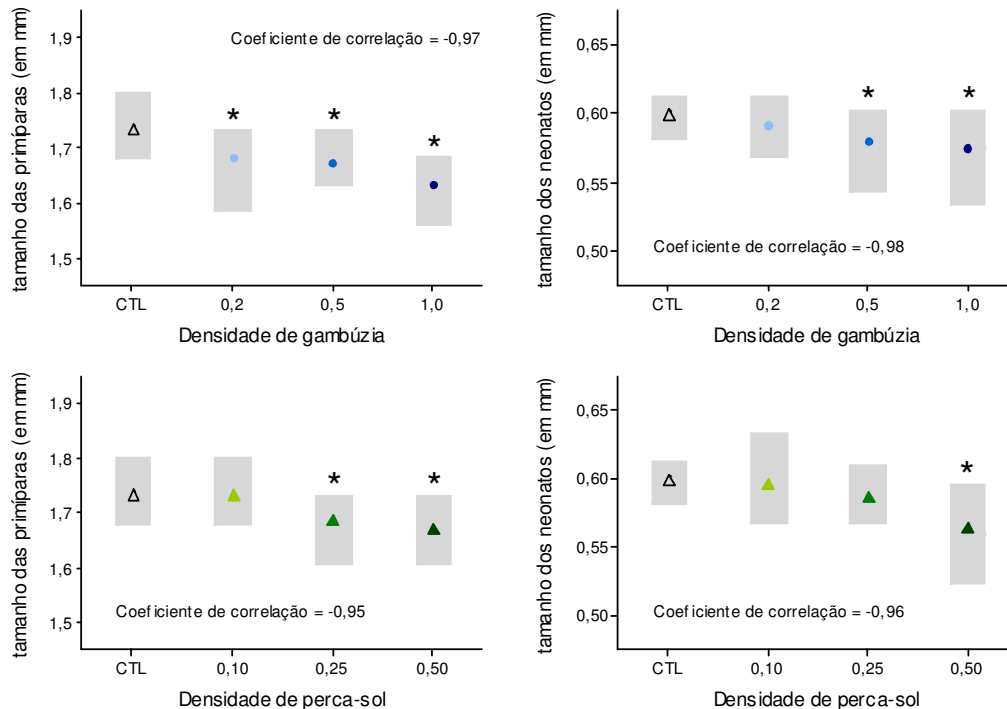


FIGURA 5: Variação do tamanho corporal das primíparas e dos neonatos (da primeira ninhada) de *Daphnia longispina* exposta a infoquímicos dos seus predadores (gambúzia – em cima; perca-sol – em baixo). A concentração de infoquímico é traduzida pela densidade dos seus predadores, em peixe L^{-1} (ver eixo dos abcissas), e a ausência de infoquímico é representada pelo tratamento CTL. Para cada parâmetro, é apresentado o valor médio (gambúzia – círculos; perca-sol – triângulos) de cada tratamento e o intervalo (mínimo-máximo) das observações individuais (rectângulo a cinza). Os asteriscos assinalam diferenças estatísticas relativamente ao tratamento CTL (ver texto). É também apresentado o valor da correlação entre os parâmetros da tabela de vida de *Daphnia* e a concentração de infoquímico.

DISCUSSÃO

A exposição a infoquímicos de peixes (gambúzia e perca-sol) resultou na antecipação da reprodução e num aumento da fecundidade de *Daphnia longispina*. Estas respostas enquadram-se naquilo que Hanazato et al. (2001) chamou de “resposta positiva”, que é corroborado pela maioria dos autores que se dedicaram a esta temática (e.g. Engelmayer, 1995; Sakwinska, 2000; Weber, 2003; Hülsmann et al., 2004). Este fenómeno parece representar um mecanismo compensatório para fazer face à mortalidade induzida pelos predadores (Gliwicz et al., 2004). No nosso caso de estudo, o aumento da fecundidade e a antecipação da reprodução estão interligados; a antecipação da reprodução (para o 7º dia) parece ter resultado de uma aceleração do seu desenvolvimento, despoletada pela percepção da presença de predadores. Deste modo, no final dos 14 dias, as pulgas-de-água expostas a infoquímicos produziram uma ninhada adicional (a 4ª), quando comparadas com as do CTL (ver Figuras 3 e 4). Numa análise posterior (não mostrada aqui), foi demonstrado que o incremento da fecundidade (n^o neonatos produzidos) não se deveu unicamente à produção da ninhada adicional. De facto, o número de neonatos produzidos nas 3 primeiras ninhadas pelas pulgas-de-água expostas a infoquímicos foi significativamente superior do que no CTL (este efeito foi mais evidente nas pulgas de água expostas a infoquímicos de perca-sol).

Para além dos efeitos na fecundidade, a exposição a infoquímicos originou que o tamanho corporal das fêmeas aquando da libertação dos ovos para a câmara de incubação fosse menor. Muito provavelmente, isto resulta de um desinvestimento energético no crescimento somático (aumento de biomassa); esta energia ficaria assim disponível para ser canalizada para o aceleração do desenvolvimento e incremento da reprodução (ver acima). Tal resulta em fêmeas mais precoces na reprodução, de menor comprimento, mas mais fecundas. Também nos neonatos produzidos pelas fêmeas expostas a infoquímicos se observou menor tamanho corporal médio. A redução do tamanho corporal (quer das primíparas, quer dos neonatos) constitui uma resposta adaptativa à predação selectiva exercida pelos peixes, na medida em que estes exibem uma clara preferência pelos exemplares de maiores dimensões (Gliwicz, 2001; Gliwicz et al., 2004). Estas observações são corroboradas por vários autores (Engelmayer, 1995; De Meester e Weider, 1999; Sakwinska, 2000; Weber, 2003; Sakwinska e Dawidowicz, 2005; von Elert e Stibor, 2006). No presente trabalho, inclusivamente, quanto maior a densidade de peixe (e, subsequentemente, a concentração dos infoquímicos libertados), maior o decréscimo de tamanho corporal das pulgas-de-água (progenitoras e juvenis). Contudo, nos restantes parâmetros (fecundidade, idade à primeira reprodução), as alterações ocorreram independentemente da concentração dos infoquímicos.

Dado que ambas as espécies de peixe (gambúzia e perca-sol) foram introduzidas durante o século XX na fauna Europeia, provenientes do continente norte-americano, era expectável que *Daphnia* não respondesse aos sinais químicos destes predadores. Dado que estas respostas são adaptativas, seria expectável que fosse necessário algum tempo (várias gerações) de coexistência entre presa e predador para o estabelecimento de uma ligação mediada quimicamente. Pelo contrário, as nossas experiências demonstraram um evidente valor adaptativo na resposta ao infoquímico de duas espécies não nativas (com diferentes *timings* de introdução no nosso país); tal evidência suporta a teoria de um infoquímico generalista, não específico da espécie de predador.

Por serem predadores visuais selectivos, os peixes exibem preferência por itens alimentares de maior dimensão (Gliwicz, 2001; Gliwicz et al., 2004). Contudo, alguns peixes têm limitações quanto ao tamanho da sua boca, como é o caso da gambúzia, e são por isso incapazes de capturar presas de maiores dimensões; não obstante, os nossos resultados e os de Hülsmann et al. (2004) demonstraram que a resposta de *Daphnia* aos infoquímicos destes peixes se equipara à dada na presença de outros predadores. Isto poderá ser interpretado como um contra-senso adaptativo, na medida em que as pulgas-de-água não têm qualquer vantagem em reduzir o seu tamanho na presença de peixes com limitação bucal. As respostas similares (redução do tamanho corporal) entre predadores capazes e incapazes de engolir presas de maiores dimensões são mais uma evidência suportando a teoria de que o infoquímico deve ser comum a todas as espécies de predador (i.e. generalista); através de um processo de selecção natural, as pulgas-de-água adquiriram a capacidade de identificar o sinal químico dos peixes e modificar as suas respostas comportamentais, morfológicas, e reprodutivas.

Várias evidências recentes suportam a teoria do infoquímico universal. Weber (2003), por exemplo, observou ligeiras diferenças nas respostas de pulgas-de-água a predadores distintos. Todavia, a hipótese de se tratar de infoquímicos específicos de cada predador tem de ser rejeitada face à capacidade que as pulgas-de-água exibem em responder a peixes alienígenas (ver acima). Recentemente, o trabalho de von Elert e Stibor (2006) demonstrou que a natureza química dos infoquímicos é similar entre várias espécies de peixe, mas não esclareceu a sua origem. Contudo, este estudo trouxe um importante contributo para a

temática: estes autores (von Elert e Stibor, 2006) provaram que o infoquímico de *Leuciscus idus* (escalo) é um conjunto heterogéneo de substâncias, em que cada fracção induz diferentes respostas anti-predador (comportamento e reprodução) em *Daphnia*. Deste modo, a interpretação das respostas da presa à presença de predadores reveste-se de maior complexidade.

O debate em torno do infoquímico generalista tem-se centrado na origem do sinal. Os resultados de Stabell et al. (2003) deram indicações prometedoras de que os infoquímicos de peixes poderão ser sinais de alarme latentes emitidos pelas próprias presas (pulgas-de-água), quando ingeridas e digeridas pelo predador, surgindo por isso nos produtos de excreção. Aqueles autores observaram alterações morfológicas em *Daphnia* apenas quando o predador utilizado nos ensaios (um peixe alienígena), havia sido alimentado com pulgas-de-água vivas. Um estudo posterior (Slusarczyk e Rygielska, 2004) deu nova força a esta teoria, demonstrando que a fonte primordial de infoquímicos eram as fezes do predador (peixe), que mostraram ser capazes de induzir diapausa⁴ em *Daphnia*. Estas evidências e as nossas (aqui apresentadas) suportam a teoria de um sinal químico universal (ou uma mistura de sinais); mais ainda, tudo parece indicar que o infoquímico resulta da activação de um sinal de alarme latente de presas (pulgas-de-água) previamente ingeridas, durante a passagem no tracto digestivo. Desta forma, as diferenças registadas nas respostas de *Daphnia* a infoquímicos de diferentes predadores poderão ser devidas à variabilidade no comportamento do peixe, aos seus hábitos alimentares, ou fisiologia (e.g. tempo de passagem no intestino) e metabolismo; estes factores poderão ser importantes na maior ou menor capacidade do infoquímico em induzir uma resposta nas presas. O desenho experimental por nós usado não permite tirar conclusões acerca deste aspecto, na medida em que lhe falta um tratamento onde os peixes não fossem alimentados com *Daphnia*. Contudo, os resultados demonstram claramente o valor adaptativo da comunicação química em sistemas de sinalização predador-presa, que é mantido mesmo com um predador recentemente introduzido.



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

As defesas anti-predador são um exemplo da importância da predação como força selectiva, impulsionadora dos caracteres comportamentais, morfológicos e reprodutivos da presa. Nas pulgas-de-água, estes caracteres apresentam considerável plasticidade (i.e. variabilidade e adaptabilidade), o que permite a estes minúsculos seres adaptarem-se às mudanças no seu ambiente. Os sinais químicos, como os produzidos pelos peixes, desempenham um papel crucial como promotores de mudanças adaptativas nas suas presas (pulgas-de-água). As respostas de *Daphnia* a sinais químicos são complexas e parecem representar um compromisso entre os diferentes tipos de defesas (Boersma et al., 1998; De Meester e Weider, 1999; Sakwinska e Dawidowicz, 2005). Ademais, a interpretação dos efeitos dos infoquímicos de peixes é complicada pela sua interacção com factores adicionais, como o nível alimentar (Sakwinska, 1998; Weber, 2001) ou a temperatura (e.g. Sakwinska, 1998). A investigação deverá agora centrar-se nestas interacções, assim como nos custos directos e indirectos associados com as mudanças reprodutivas aqui relatadas. Por exemplo, é importante levar em linha de conta que os neonatos de menores dimensões (produzidos na presença de predadores) são menos resistentes à fome (Gliwicz e Guisande, 1992) e à

⁴ Diapausa é um estado de dormência fisiológica, um estado de animação suspensa, em que mergulham alguns seres vivos face a condições ambientais adversas. No caso das pulgas-de-água, esta ocorre nos ovos sexuais, após fecundação, sendo que os ovos fecundados permanecem num invólucro resistente a seca, digestão, e congelamento. A eclosão é despoletada (dias, meses, ou anos depois) por condições ambientais favoráveis.

exposição de contaminantes (Enserink et al., 1990). Por outro lado, existem evidências experimentais de que a presença de predadores reduz também directamente a tolerância das pulgas-de-água à escassez de alimento (Hanazato et al., 2001; Weber, 2001) e aos contaminantes (Rose et al., 2001).

Do ponto de vista laboratorial, a simplicidade das metodologias aqui apresentadas tornam-nas um objecto de estudo muito interessante e uma ferramenta para o Ensino Experimental das Ciências ao nível do 3º Ciclo do Ensino Básico e Secundário. A produção de infoquímicos é facilmente reprodutível e a cultura de pulgas-de-água é pouco exigente em termos de recursos laboratoriais (alternativamente, as escolas poderão solicitá-las num centro de investigação), colocando os alunos em contacto directo com modelos biológicos (peixes e pulgas-de-água). Para além da compreensão de um fenómeno evidente de comunicação química, fica em aberto a concepção de novas hipóteses e desenhos experimentais, envolvendo os alunos em todas as fases do método experimental.

agradecimentos • Bruno B. Castro agradece o apoio financeiro providenciado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia para a prossecução deste trabalho. Uma versão mais detalhada deste artigo, orientada para a especialidade, pode ser encontrada em <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-9074-5>.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosta WC (1992). Chemical Communication: the Language of Pheromones. Scientific American Library, Nova Iorque, 179 pp.
- Almaça C (1995a). Freshwater fish and their conservation in Portugal. *Biological Conservation* 72: 125-127.
- Almaça C (1995b). Fish Species and Varieties Introduced into Portuguese Inland Waters. Museu Nacional de História Natural, Lisboa, Portugal, 29 pp.
- Alonso M (1996). Crustacea, Branchiopoda. Fauna Ibérica - vol. 7. Museo Nacional de Ciencias Naturales y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, 486 pp.
- Antunes SC, Castro BB, Gonçalves F (2003). Chronic responses of different clones of *Daphnia longispina* (field and *ephippia*) to different food levels. *Acta Oecologica* 24: S325-S332.
- Baird DJ, Soares AMVM, Girling A, Barber I, Bradley MC, Calow P (1989). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: H Lokke, H Tyle, F Bro-Rasmussen (eds.), Proceedings of the first European Conference on Ecotoxicology, SECOTOX, Technical University, Lyngby, Denmark, pp. 144-148.
- Blum MS (1996). Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Annual Review of Entomology* 41: 353-374.
- Boersma M, Spaak P, De Meester L (1998). Predator-mediated plasticity in morphology, life history, and behavior of *Daphnia*: the uncoupling of responses. *American Naturalist* 152: 237-248.
- Burks RL, Jeppesen E, Lodge DM (2000). Macrophyte and fish chemicals suppress *Daphnia* growth and alter life-history traits. *Oikos* 88: 139-147.
- Burks RL, Lodge DM (2002). Cued in: advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1901-1917.
- Castro BB (2007). Ecologia e selecção de *habitat* em crustáceos zooplanctónicos de lagos pouco profundos. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Aveiro, Aveiro, 168 pp.
- De Meester L (1996). Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes. *Ecoscience* 3: 385-399.
- De Meester L, Weider LJ (1999). Depth selection behaviour, fish kairomones, and the life histories of *Daphnia hyalina* x *galeata* hybrid clones. *Limnology and Oceanography* 44: 1248-1258.
- Dicke M, Sabelis MW (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology* 2: 131-139.
- Dodson SI (1988). The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: predator-avoidance behavior in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 33: 1431-1439.
- Engelmayer A (1995). Effects of predator-released chemicals on some life-history parameters of *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 307: 203-206.
- Enserink L, Luttmer W, Maas-Diepeveen H (1990). Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 17: 15-26.

- Gliwicz ZM, Guisande C (1992). Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia* 91: 463-467.
- Gliwicz ZM (2001). Species-specific population-density thresholds in cladocerans? *Hydrobiologia* 442: 291-300.
- Gliwicz ZM, Jawinski A, Pawlowicz M (2004). Cladoceran densities, day-to-day variability in food selection by smelt, and the birth-rate-compensation hypothesis. *Hydrobiologia* 526: 171-186.
- Hanazato T, Fueki K, Yoshimoto M (2001). Fish-induced life-history shifts in the cladocerans *Daphnia* and *Simocephalus*: are they positive or negative responses? *Journal of Plankton Research* 23: 945-951.
- Hebert PDN (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Review* 53: 387-426.
- Hülsmann S, Vijverberg J, Boersma M, Mooij WM (2004). Effects of infochemicals released by gape-limited fish on life history traits of *Daphnia*: a maladaptive response? *Journal of Plankton Research* 26: 535-543.
- Lass S, Spaak P (2003). Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-239.
- McCallum H (2000). Population Parameters: Estimation for Ecological Models. Blackwell Science, UK, 348 pp.
- Michels E, De Meester L (2004). Inter-clonal variation in phototactic behaviour and key life-history traits in a metapopulation of the cyclical parthenogen *Daphnia ambigua*: the effect of fish kairomones. *Hydrobiologia* 522: 221-233.
- Pijanowska J, Kowalczewski A (1997). Predators can induce swarming behaviour and locomotory responses in *Daphnia*. *Freshwater Biology* 37: 649-656.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1992). Biology of Plants (6ª Edição). W. H. Freeman & Co., Nova Iorque.
- Rose RM, Warne MSJ, Lim RP (2001). The presence of chemicals exuded by fish affects the life-history response of *Ceriodaphnia* cf. *dubia* to chemicals with different mechanisms of action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2892-2898.
- Ruther J, Meiners T, Steidle JLM (2002). Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* 12: 161-167.
- Sakwinska O (1998). Plasticity of *Daphnia magna* life history traits in response to temperature and information about a predator. *Freshwater Biology* 39: 681-687.
- Sakwinska O (2000). Trimethylamine does not trigger antipredatory life history shifts in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 45: 988-990.
- Sakwinska O, Dawidowicz P (2005). Life history strategy and depth selection behavior as alternative antipredator defenses among natural *Daphnia hyalina* populations. *Limnology and Oceanography* 50: 1284-1289.
- Slusarczyk M, Rygielska E (2004). Fish faeces as the primary source of chemical cues inducing fish avoidance diapause in *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 526: 231-234.
- Stabell OB, Ogbeto F, Primicerio R (2003). Inducible defences in *Daphnia* depend on latent alarm signals from conspecific prey activated in predators. *Chemical Senses* 28: 141-153.
- Suckling DM, Karg G (1999). Pheromones and other semiochemicals. In: JE Rechcigl, NA Rechcigl (eds.), Biological and biotechnological control of insect pests, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 63-99.
- USEPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms - 5ª edição. US Environmental Protection Agency, Washington.
- Vet LEM (1999). From chemical to population ecology: infochemical use in an evolutionary context. *Journal of Chemical Ecology* 25: 31-49.
- von Elert E, Stibor H (2006). Predator-mediated life history shifts in *Daphnia*: enrichment and preliminary chemical characterisation of a kairomone exuded by fish. *Archiv für Hydrobiologie* 167: 21-35.
- Weber A (2001). Interactions between predator kairomone and food level complicate the ecological interpretation of *Daphnia* laboratory results. *Journal of Plankton Research* 23: 41-46.
- Weber A (2003). More than one 'fish kairomone'? Perch and stickleback kairomones affect *Daphnia* life history traits differently. *Hydrobiologia* 498: 143-150.