

**Marta Sofia Rocha
Lourenço**

**Dinâmica populacional de *Hyalodaphnia* sp. num
período de transição ambiental**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, Biodiversidade e Gestão dos Ecossistemas, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando José Mendes Gonçalves, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e do Doutor Bruno Branco Castro, investigador de pós-doutoramento do CESAM e da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutor Carlos Manuel Martins Santos Fonseca
professor auxiliar convidado da Universidade de Aveiro

Doutor Fernando José Mendes Gonçalves
professor auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
professor auxiliar convidado da Universidade de Aveiro

Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira
investigadora auxiliar do CESAM

Doutor Bruno Branco Castro
investigador de pós-doutoramento do CESAM e da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Fernando Gonçalves por me ter proporcionado esta oportunidade de pertencer ao seu grupo de trabalho e por toda a sua ajuda e dedicação, de modo a tornar o meu trabalho cada vez melhor.

Agradeço especialmente ao Doutor Bruno Castro por toda a sua ajuda, amizade e pela sua enorme paciência comigo, pela sua constante disponibilidade e sabedoria.

Agradeço também todo o apoio da equipa coordenada pelo Professor Doutor António Correia, em particular pelo acompanhamento mais próximo proporcionado pelo Doutor Artur Alves. Este trabalho também não teria sido possível sem o suporte técnico do laboratório coordenado pela Professora Doutora Maria da Conceição Santos, a quem também agradeço toda a ajuda.

Agradeço a todos os meus colegas do LEAD por todo o apoio, simpatia e amizade.

Agradeço em particular às minhas companheiras de palhaçada dentro do laboratório e fora dele: Joana, Nini e Inês. Não esquecendo, claro, um grande obrigado à Elisabete, Maria João, Teresa, Helena, Joana, Maria e Michelle, por toda a amizade e cumplicidade e por estarem sempre lá.

E, apesar de nunca vir a ter palavras suficientes para isso, quero agradecer aos meus grandes pais e irmã por me aturarem (e que grande tarefa é essa), por me apoiarem em tudo e por me terem feito a pessoa que sou hoje. Sem vocês não sou nada e com vocês sou tudo.

resumo

Os cladóceros, em particular o género *Daphnia*, são importantes reguladores do equilíbrio de sistemas aquáticos de água doce. A lagoa da Vela (Figueira da Foz, Portugal) é um pequeno lago pouco profundo em avançado estado de eutroficação, tal como muitos outros reservatórios de água doce. Ainda não se conhece completamente a dinâmica populacional do complexo *Daphnia longispina* nesta lagoa, nomeadamente durante a transição primaveril onde ocorre a fase de água transparente e estes zooplânctons ocorrem em maior abundância. Este trabalho teve como objectivo estudar a dinâmica populacional do complexo *D. longispina*, durante o período de transição Primavera-Verão, na lagoa da Vela, e averiguar se esta população apresenta uma sucessão de *taxa* ao longo desse gradiente temporal.

Neste trabalho, além de estudados os factores físico-químicos da lagoa, assim como os dados populacionais de *Daphnia*, foi também efectuada uma diferenciação genética das espécies do complexo *Daphnia longispina* através da amplificação da região ITS do genoma nuclear por reacção em cadeia de polimerase (PCR) e sujeitando os produtos a cortes com enzimas de restrição (RFLP). O progressivo aumento da transparência da água foi atribuído à redução da clorofila *a* para níveis muito baixos, devido ao seu consumo pelo zooplâncton, num período transiente. Durante este período de amostragem, a redução da disponibilidade dos recursos alimentares e o aumento da predação por peixes planctívoros, contribuíram para um abrupto decréscimo na densidade populacional de *Daphnia*. Verificou-se também uma redução de tamanho corporal médio dos dafnídeos, havendo uma diminuição no tamanho à maturidade e na fecundidade das fêmeas ovígeras, originados por predação dos peixes e pela forte plasticidade fenotípica que *Daphnia* exhibe para evitar os predadores. Os resultados da análise genética demonstraram que esta população, presente na lagoa da Vela, é constituída quase unicamente por indivíduos da espécie *Daphnia galeata*. Estas evidências revelam uma população com forte plasticidade fenotípica e bastante adaptada ao seu *habitat*. Fica em aberto a hipótese de existir variabilidade clonal dentro da população, podendo esta exibir alteração na frequência de génotipos no decorrer do período de transição ambiental.

abstract

Cladocerans, particularly those belonging to the genus *Daphnia*, are very important on equilibrium regulation in freshwater ecosystems. Lake Vela (Figueira da Foz, Portugal) is a small shallow lake facing eutrophication, like many other freshwater reservoirs. Some doubts still subsist on the population dynamics of the *Daphnia longispina* complex in this lake, especially, during the April-July period, where the clear water phase occurs and zooplankton occurs in its highest abundance. This study aimed at understanding the population dynamics of the *D. longispina* complex during the transition period of Spring-Summer, in lake Vela, and assessing if this population presents a succession of taxa through this environmental transition.

In this work, apart from physical and chemical parameters of the lake and *Daphnia* populational data, genetic distinction of species within the *D. longispina* complex was also made, through the amplification of the ITS region by PCR and subsequent diagnostic restriction patterns (RFLP). The progressive increase of water transparency was related to the reduction of chlorophyll concentrations to very low levels, due to its transient consumption by zooplankton. During this period, the reduction of available food and the increase of fish predation, led to a strong reduction on *Daphnia* densities. We also observed a reduction of average body size of *Daphnia* and a decrease of size at maturity and fecundity, due to strong fish predation and anti-predator phenotypic plasticity. The results of the genetics analysis showed that this population, present in lake Vela, is mainly formed by individuals of *Daphnia galeata* species. These evidences show a population displaying strong phenotypic plasticity and well adapted to its local habitat. We cannot exclude the hypothesis that a high genetic variation within individuals (clonal lineages) exists and that a change in genotype frequencies could occur during the environmental transition period.

Índice

Introdução Geral	13
Bibliografia	27
Capítulo 1	31
Dinâmica populacional de <i>Hyalodaphnia</i> sp. na lagoa da Vela na transição Primavera-Verão	
Introdução	33
Material e métodos	35
Resultados	41
Discussão	48
Bibliografia	60
Conclusão Geral	67
Bibliografia	71

Introdução Geral

Introdução geral

Os ecossistemas de água doce permanentes são muito importantes devido à biodiversidade de seres vivos que sustentam, assim como pela influência nos ciclos naturais do meio aquático e do meio terrestre. Os lagos pouco profundos são ecossistemas de elevada importância ecológica e económica aos quais, porém, tem sido dada pouca atenção (Scheffer 1998; Caramujo & Boavida 2000). Constituem um recurso natural de água para consumo e utilização na agricultura, além de proporcionarem condições de alimentação e *habitat* a inúmeras espécies aquáticas e terrestres, contribuindo de forma significativa para a biodiversidade da área (Antunes *et al.* 2003; Castro 2007). A escassez destes sistemas aquáticos e a ameaça de uma possível extinção fazem deles um importante alvo de estudo, principalmente nas áreas de clima quente. Existem diversos estudos em lagos pouco profundos existentes nas regiões temperadas do Norte da Europa, devido à sua abundância nesses locais (Hewitt 2000), mas o mesmo não acontece em lagos de regiões Mediterrâneas temperadas, onde esses locais húmidos rareiam (Pereira *et al.* 2002; Schwenk *et al.* 2004; Castro & Goncalves 2007). Os lagos pouco profundos distinguem-se de todos os outros devido à sua forte interacção entre o sedimento e a coluna de água e pela maior influência da vegetação aquática no funcionamento do sistema, relativamente aos lagos profundos, o que leva a que os seus mecanismos de regulação sejam consideravelmente diferentes dos lagos profundos (Scheffer 1998).

Um caso de estudo na zona Mediterrânica

A lagoa da Vela, local de estudo desta dissertação, é um lago pouco profundo que se encontra num processo de eutroficação bastante avançado devido, principalmente, à acção directa ou indirecta dos humanos, tal como acontece em muitos outros ecossistemas de água doce (Pereira *et al.* 2002; Antunes *et al.* 2003). A eutroficação (ver em baixo) é um fenómeno que afecta inúmeros lagos, albufeiras, rios e mesmo zonas marinhas costeiras de todo o mundo, alterando o equilíbrio do ecossistema e deteriorando a qualidade da água, o que limita assim a sua utilização (Wetzel & Likens 1983; Caramujo & Boavida 2000). Este processo acarreta também inúmeras perdas de biodiversidade em

lagos, represas e albufeiras. O enriquecimento excessivo em nutrientes das massas de água e a consequente degradação dos sistemas aquáticos é um fenómeno cada vez mais comum. A entrada de constituintes químicos em excesso em lagos provém de efluentes industriais, descargas de campos agrícolas (muito ricos em nutrientes devido à utilização de fertilizantes) e de áreas urbanas (Carpenter *et al.* 1995; Carpenter 2005)

A eutroficação caracteriza-se pela acumulação excessiva de nutrientes inorgânicos e/ou matéria orgânica num ecossistema aquático, o que induz um elevado crescimento de algas fitoplanctónicas e macrófitas e, portanto, a uma maior produtividade primária e, geralmente, a uma diminuição do volume total do ecossistema (Wetzel & Likens 1983; Carpenter *et al.* 1995). Esse aumento de nutrientes disponíveis, principalmente fósforo e azoto, faz com que se tornem comuns as algas verdes e as cianobactérias. Os “blooms” destas últimas podem provocar efeitos nocivos em outros organismos. O crescimento descontrolado de macrófitas e de fitoplâncton leva a uma diminuição da transparência da água e, por isso, a uma redução na penetração da luz na coluna de água, afectando assim toda a comunidade aquática que aí se encontra (Carpenter 2005).

A actividade humana acelera o processo de eutroficação, podendo os ciclos biológicos e químicos serem interrompidos e, muitas vezes, o sistema pode progredir para um estado essencialmente morto (Wetzel & Likens 1983). Deste modo, a diversidade do habitat litoral diminui deixando de haver refúgios e/ou alimentos para muitos organismos, o que leva ao empobrecimento das comunidades de invertebrados e vertebrados. Outra consequência do aumento da biomassa algal é a diminuição da capacidade de auto-purificação do sistema, ou seja, o poder de reciclar a matéria orgânica diminui, levando à acumulação de detritos e sedimentos. Num estado mais avançado de eutroficação, a concentração de oxigénio decresce e a profundidade de compensação (profundidade à qual o consumo de oxigénio iguala a sua produção) diminui, o que leva a que as espécies que não conseguem tolerar baixas concentrações de oxigénio tenham tendência a desaparecer, havendo uma nova redução na biodiversidade (Wetzel & Likens 1983; Carpenter *et al.* 1995; Carpenter 2005). Estudos recentes, efectuados na lagoa da Vela, demonstraram a ocorrência temporária de anóxia durante períodos quentes, dando azo à ocorrência da morte em massa de peixes (Antunes *et al.* 2003).

A Lagoa da Vela está localizada perto da costa da zona centro de Portugal, a norte da Figueira da Foz, sendo uma das quatro pequenas lagoas que ali se encontram (Braças, Salgueira, Teixoeiros e Vela) (Figura 1). Esta lagoa é um pequeno lago natural com profundidade, largura e comprimento máximos de 2,4m, 500m, e 2000m, respectivamente. Os seus 700 000 m³ de volume máximo armazenável são limitados por campos agrícolas de utilização humana (a Este) e por um pinhal (*Pinus pinaster*) e uma área de acácias (*Acacia* spp.) na margem Oeste. A sua água é caracterizada por um estado permanentemente turvo, não apresentando uma fase primaveril de água transparente muito acentuada (Castro 2007).



Figura 1. Fotografia de satélite da localização da Lagoa da Vela (Figueira da Foz, Portugal). [www.earth.google.com]

A comunidade fitoplanctónica deste sistema aquático é dominada por cianobactérias (*Microcystis aeruginosa*), diatomáceas (*Cyclotella* spp.) e clorófitas (*Coelastrum* sp., *Pediastrum* sp. e *Scenedesmus* sp.), apesar de algumas flutuações na sua composição terem sido observadas (Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006a; Abrantes *et al.* 2006b). A comunidade de macrófitas presente é sobretudo emergente, sendo composta por *Cladium mariscus*, *Myriophyllum verticillatum*, *Nymphaea alba* e espécies da família Poaceae. No entanto, o leito da lagoa não apresenta qualquer tipo de vegetação submersa,

excepto durante os meses de Verão e apenas em algumas áreas da lagoa (Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006b).

A comunidade íctica é muito abundante sendo constituída principalmente por peixes omnívoros. Inclui várias espécies piscívoras de origem exótica, tais como a perca-sol (*Lepomis gibbosus*), a gambúsia (*Gambusia holbrooki*), a carpa (*Cyprinus carpio*) e o achigã (*Micropterus salmoides*). A comunidade ictiológica tem sofrido alterações ao longo do tempo, o que levou à extinção de espécies nativas da lagoa como o verdemã (*Cobitis maroccana*) ou o ruivaco (presumivelmente *Achondrostoma oligolepis*) (Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006b; Castro & Goncalves 2007).

O zooplâncton não apresenta muita diversidade, sendo claramente dominado por rotíferos (especialmente *Keratella* spp.), apesar dos cladóceros serem também importantes em termos de abundância, especialmente durante os períodos da Primavera e Outono. Os cladóceros são os maiores compositores de biomassa do zooplâncton e o maior grupo de filtradores, juntamente com os copépodes. As espécies de cladóceros presentes em maior abundância, na lagoa da Vela, são *Daphnia longispina*, *Ceriodaphnia pulchella* e *Bosmina longirostris*, estando *Daphnia* praticamente ausente durante as estações do Verão e Outono (Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006b; Castro & Goncalves 2007). *Daphnia longispina* é o cladóceros de maior dimensão que ocorre na Lagoa da Vela e o único com capacidade filtradora para controlar efectivamente o crescimento fitoplanctónico, dando origem a uma fase transiente de alguma transparência (Castro & Goncalves 2007). A importância desta e de outras espécies de *Daphnia* reside igualmente no seu papel central na transferência de massa e energia ao longo da teia trófica pelágica dos lagos (Scheffer 1998).

O papel central de *Daphnia* e a sua dinâmica populacional

Os organismos do género *Daphnia* têm sido objectos de estudo em numerosos bioensaios de laboratório e de campo desde os últimos 100 anos, tendo-se tornado importantes organismos-modelo em ecotoxicologia, limnologia e genética ecológica e, recentemente, em genómica (Billiones *et al.* 2004). Isto deve-se principalmente às suas características particulares: apresentam uma distribuição geográfica ubíqua, representam espécies chave em cadeias tróficas e ocorrem em todos os *habitats* de água doce; são fáceis de criar em laboratório e,

devido ao seu modo reprodutivo principal (reprodução assexuada por partenogénese cíclica), representam animais experimentais ideais (Brede *et al.* 2006). O facto de estas espécies constituírem um dos maiores componentes da comunidade zooplanctónica de águas doce em todo o mundo aumenta também a sua importância para os limnologistas (Hebert 1978).

A importância dos dafnídeos nos sistemas aquáticos deve-se à sua elevada taxa de crescimento populacional e também à sua posição central na cadeia alimentar (Hebert 1978; Lampert & Sommer 1997; De Meester *et al.* 2006). Estes organismos apresentam dois tipos de reprodução: assexuada (partenogénese cíclica) e sexuada, sendo a sua população constituída maioritariamente por fêmeas. Quando as condições ambientais tendem a tornar-se desfavoráveis para estes organismos, a população altera o seu modo reprodutivo para reprodução sexual. Os machos surgem na população (por reprodução assexuada) e as fêmeas produzem ovos sexuados (via meiose) que necessitam de ser fertilizados pelo esperma masculino (Wetzel & Likens 1983; De Meester *et al.* 2006). Quando ocorre reprodução sexuada, as fêmeas produzem apenas dois ovos sexuados de cada vez, designados por ovos de resistência, que ficam protegidos por várias membranas protectoras, sendo o conjunto designado por *ephippium*. Os ovos de resistência são resistentes à dessecação, enzimas digestivas e ao congelamento, sendo cruciais para assegurar a sobrevivência das populações residentes (Hebert 1978; De Meester *et al.* 2006). Normalmente, estes ovos entram em diapausa mas alguns desenvolvem-se imediatamente, dando todos eles origem a fêmeas (Hebert 1978; Lampert & Sommer 1997). A eclosão das *ephippia* dá-se quando as condições lhes são favoráveis, nomeadamente no final do Inverno, com o aumento da temperatura e da duração do dia. Cada indivíduo que eclode de um ovo de dormência é geneticamente único porque resulta de reprodução sexuada. Se as condições se mantiverem favoráveis, os indivíduos reproduzem-se assexualmente dando então origem a várias linhagens clonais. No entanto, a existência de reprodução sexuada não leva necessariamente à interrupção da reprodução assexuada, pois ambas podem ocorrer ao mesmo tempo, especialmente se o ambiente em redor for imprevisível (De Meester *et al.* 2006).

Daphnia é um excelente filtrador que se alimenta de algas, bactérias, fungos, protozoários e restos orgânicos (Hebert 1978). Em adição à sua condição

de filtrador, *Daphnia* ocasionalmente também se alimenta directamente do sedimento do fundo do lago (Hebert 1978). Estes organismos zooplanctónicos são o grupo mais importante no que respeita ao controlo *top-down* da cadeia alimentar, isto é, a influência e alterações que os níveis tróficas superiores têm sobre os níveis tróficos inferiores. O género *Daphnia* é especialmente bem conhecido pela sua elevada potencialidade de controlo sobre o fitoplâncton. São também muito eficientes em reduzir os níveis de alimento disponível de tal forma baixo que os seus competidores não conseguem sobreviver a níveis tão baixos (Scheffer 1998). Esta eficiência é tanto maior quanto maior forem as dimensões corporais dos indivíduos, pelo que as espécies de maior tamanho têm um impacto maior na clorofila *a* e na transparência da água (Gliwicz 1994; Scheffer 1998).

A dinâmica populacional de *Daphnia*, em lagos temperados, segue frequentemente um determinado padrão, explicado pelo modelo PEG (Plankton Ecology Group): após apresentarem uma baixa densidade no Inverno, as populações aumentam largamente as suas densidades durante a Primavera, reduzindo assim a quantidade de fitoplâncton existente. Este crescimento populacional deve-se, principalmente, ao aumento da temperatura e ao estabelecimento progressivo de condições favoráveis à eclosão de ovos de resistência, levando então à formação de novas populações. Nesta estação, verifica-se também um “bloom” de algas verdes que permite que *Daphnia* atinja o seu pico de densidade populacional, fornecendo bastante quantidade e qualidade de alimento disponível, permitindo assim uma elevada taxa de crescimento individual e de reprodução. A população de *Daphnia* expande-se em pouco tempo até uma densidade em que a capacidade de filtração excede a produção algal. Como consequência, a comunidade de algas colapsa para um nível reduzido, o que se reflete também na redução de tamanho da população de *Daphnia* (Scheffer 1998). Após este período, em que a água se torna bastante transparente, as densidades de *Daphnia* diminuem drasticamente durante alguns meses até ao Verão, havendo uma redução na fecundidade (Hulsmann 2003).

No início do Verão, as densidades dos dafnídeos diminuem devido à competição por alimento, mas também por uma maior predação pelos peixes planctívoros com o aquecimento da temperatura da água (Luecke *et al.* 1990; Boersma *et al.* 1996; Carpenter *et al.* 2001). Reduz-se o número de ovos produzido por fêmeas e a reprodução torna-se praticamente inexistente.

Finalmente, a população de *Daphnia* colapsa e a comunidade de algas recupera (Scheffer 1998). *Daphnia* utiliza todas as suas reservas energéticas para a sobrevivência, isto é, quando o alimento se encontra em falta os indivíduos interrompem a sua capacidade de reprodução, limitando-se apenas a utilizar toda a sua energia na sua sobrevivência. O número de ovos produzido por fêmeas também se encontra relacionado com a quantidade de alimento disponível, assim como pelo tamanho corporal da própria *Daphnia*, sendo tanto maior o número de ovos quanto maior for o indivíduo. Vários factores ambientais, tais como o pH e a concentração de oxigénio afectam igualmente a produção dos ovos (Hebert 1978). A predação visual por peixes planctívoros e a falta de alimento disponível têm como consequência o desaparecimento de *Daphnia* no Verão, levando também a uma redução na dimensão média do tamanho corporal dos restantes crustáceos (*Bosmina*, *Chydorus*, copépodes ciclopóides e rotíferos), que são menos eficientes no controlo da biomassa algal (Sommer *et al.* 1986; Tessier *et al.* 1992; Scheffer 1998; Castro 2007). A predação por selecção de tamanho é um dos processos mais compreendidos de influência na dinâmica populacional e na estrutura da comunidade zooplanctónica. Os predadores planctívoros escolhem as suas presas tendo em conta o seu tamanho corporal, embora a forma, a pigmentação e a forma de nadar sejam também importantes (Tessier *et al.* 1992).

Plasticidade fenotípica e sistemática em *Daphnia*

O tamanho corporal de *Daphnia* está em muito relacionado com aspectos da sua história de vida, ecologia e comportamento, e reflecte alterações ambientais. Entre os crustáceos, a fecundidade, sucesso de maturação e capacidades defensivas estão todas positivamente relacionadas com o tamanho do corpo, e a maioria destes processos variam com o *habitat*. O tamanho à maturação é um factor chave no crescimento da população. A plasticidade fenotípica de *Daphnia*, quanto ao tamanho à maturação, demonstra a sua importância adaptativa (Giessler 2001). *Daphnia* é capaz de exibir alterações morfológicas corporais como resposta a condições ambientais que lhes são desfavoráveis, como quando na presença de potenciais predadores, como os peixes planctívoros. Os dafnídeos evoluíram de forma a conseguirem detectar sinais químicos que denunciam a presença de peixes predadores, respondendo com alterações no seu comportamento (curto prazo), morfologia e história de vida

(Lass & Spaak 2003). As alterações morfológicas podem ir desde a expansão dorsoventral da cabeça de modo a que uma crista laminada seja formada, a redução da largura do corpo, ou o aumento do comprimento do espinho caudal, conforme o estímulo e a espécie considerada; esta plasticidade pode levar a uma drástica alteração na sua aparência (Hebert 1978). A plasticidade fenotípica tem sido frequentemente assumida como um limitador da selecção natural por não permitir os efeitos da selecção, mas recentes estudos demonstraram que esta plasticidade representa uma componente fundamental das alterações evolucionárias (Behera & Nanjundiah 2004). Aliás, a plasticidade fenotípica é o principal mecanismo que contribui para a persistência das populações em *habitats* com flutuações temporárias (Silva 1999).

Recentes dados filogenéticos revelaram que o género *Daphnia* consiste em três grupos, *Daphnia sensu stricto* (grupo *D. pulex*), *Ctenodaphnia* (grupo *D. magna*) e *Hyalodaphnia* (Billiones *et al.* 2004; Schwenk *et al.* 2004). Este último grupo (grupo *D. longispina*) é constituído por oito espécies, as quais frequentemente produzem híbridos inter-específicos (*D. galeata*, *D. longispina*, *D. cucullata*, *D. rosea*, *D. mendotae*, *D. thorata*, *D. hyalina* e *D. dentifera*). Dados recentes apontam para que *D. longispina*, *D. rosea* e *D. hyalina* sejam a mesma espécie, daqui em diante referida como *D. longispina* (*vide* Petrusek *et al.* 2005). Embora os dafnídeos sejam os microcrustáceos melhor estudados, as suas relações filogenéticas e a sua taxonomia são ainda bastantes controversas (Billiones *et al.* 2004; Schwenk *et al.* 2004).

A hibridação é um fenómeno comum tanto em *habitats* aquáticos como terrestres, o que pode influenciar a capacidade de adaptação a novos ambientes assim como a especiação dos sistemas animais e vegetais. Os cladóceros do género *Daphnia* apresentam a capacidade de produzir híbridos inter-específicos, retrocruzamentos (i.e. cruzamentos entre híbrido e espécie parental) e híbridos F2 (várias classes recombinantes) (Billiones *et al.* 2004), através de reprodução sexuada. As três principais espécies de *Hyalodaphnia* (*D. longispina*, *D. cucullata* e *D. galeata*) são encontradas normalmente em ambiente simpátrico com as suas espécies parentais (Keller *et al.* 2007). A hibridação pode levar à extinção de uma ou ambas as espécies na coexistência das espécies parentais com híbridos. Flutuações nos factores abióticos ou bióticos alteram a predação selectiva de *taxa* específicos e modificam a composição taxonómica. No entanto, os híbridos

muitas vezes combinam traços da história de vida dos seus progenitores de uma forma benéfica, levando a uma dominância de híbridos F1 (e.g., Schwenk & Spaak 1995), também conhecida por “superioridade híbrida temporária” (Keller *et al.* 2007). A coexistência por longos períodos entre as espécies parentais e híbridos só é possível em condições que não só favoreçam as espécies parentais mas também reforcem as suas capacidades competitivas (Ringelberg *et al.* 2004; Keller *et al.* 2007). A selecção natural, via predação ou resistência a recursos alimentares insuficientes, determinará o genótipo que será favorecido em cada momento (Silva 1999; Giessler 2001). Alguns estudos recentes, sugerem que os clones que diferem no tamanho à primeira reprodução estão adaptados a diferentes pressões de predação (Stibor & Lampert 2000; Giessler 2001). As populações são caracterizadas por uma diversidade genética muito elevada no início da fase de crescimento (quando as populações são re-estabelecidas a partir do “pool” de ovos de dormência) mas durante a reprodução partenogénica, essa diversidade clonal diminui devido à selecção de alguns clones. Esta erosão clonal produz um forte impacto na estrutura genética da população (De Meester *et al.* 2006).

A inexistência de alguns traços morfológicos estáveis tem sido desde há muito a principal razão da confusa identificação de indivíduos do complexo *Daphnia longispina* (Skage *et al.* 2007). A identificação de espécies do género *Daphnia* torna-se especialmente difícil devido à sua plasticidade fenotípica, formação de híbridos e retrocruzamentos (o que implica fluxo de genes entre espécies – introgressão). Visto as espécies parentais e os seus híbridos diferirem nas suas características ecológicas e história de vida, a identificação dos *taxa* torna-se muito importante para ser possível perceber a dinâmica das populações e a estrutura e o comportamento da comunidade (Billiones *et al.* 2004; Schwenk *et al.* 2004). É observado que a divergência fenotípica em *Daphnia* é inferior do que a divergência genotípica quando estudadas populações de diferentes tipos de *habitats* (Giessler 2001). A covariância entre divergências fenotípicas e genotípicas é altamente dependente das condições ambientais (Giessler 2001). No entanto, as espécies (*D. cucullata*, *D. galeata* e *D. longispina*) têm-se mantido geneticamente bem diferenciadas apesar da hibridização inter-específica frequente e retrocruzamentos (Schwenk *et al.* 2000).

A dificuldade em conseguir identificar espécies pertencentes ao complexo morfológicamente variável de *Daphnia longispina*, causou a necessidade de distinguir os diferentes taxa e genótipos recombinantes. Deste modo, alguns marcadores genéticos nucleares têm sido desenvolvidos e utilizados em populações de *Daphnia*, tais como, alozimas, RAPD e análises com microsatlélites (Billiones *et al.* 2004; Schwenk *et al.* 2004). Recentemente, foram propostas ferramentas moleculares para identificar as espécies do grupo *D. longispina* (Billiones *et al.* 2004; Skage *et al.* 2007). Estes protocolos, baseados na análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP) da região ITS (“internal transcribed spacer”) de DNA ribossomal (rDNA) com enzimas de restrição, foram aplicados a várias populações europeias (Billiones *et al.* 2004; Schwenk *et al.* 2004; Skage *et al.* 2007). A aplicação de marcadores genéticos nucleares (ITS e *loci* nucleares anónimos) permite a identificação de espécies e híbridos inter-específicos de *Hyalodaphnia* que são taxonomicamente difíceis de identificar (Billiones *et al.* 2004). A taxa de mutação da sequência do fragmento ITS representa um compromisso (ver abaixo) que permite obter um padrão de bandas específico, relativamente conservado para cada espécie. As vantagens do método PCR-RFLP são o seu custo reduzido e a sua fácil execução, na qual é apenas necessário usar uma quantidade mínima de DNA; pode ser usado em amostras vivas ou preservadas em álcool tal como em ovos de resistência e é eficiente para analisar uma população (Billiones *et al.* 2004; Schwenk *et al.* 2004).

Nos seres eucarióticos, o DNA ribossomal encontra-se organizado em unidade *tandem* repetidas, onde regiões de transcrição alternam com regiões de não transcrição. Nas regiões de transcrição, as taxas de substituição diferem entre os genes e espaços. Devido ao grau de variação de sequência interspecífica poder ser bastante elevado na região ITS, a técnica de ITS-RFLP tem sido bastante útil na descrição entre espécies muito semelhantes, onde caracteres morfológicos são ambíguos ou falham completamente (Schwenk *et al.* 2000). A variação ITS intragenómica parece, apesar de tudo, ser um problema mais sério no complexo *D. longispina* do que o assumido previamente (Billiones *et al.* 2004). O primeiro protocolo desenvolvido (Billiones *et al.* 2004) apresentava algumas falhas, nomeadamente devido à perda de determinados locais de restrição em regiões ITS2 e o não reconhecimento de recombinações. Esta perda fazia com que a distinção de *D. galeata* de outras espécies não fosse muito

fidedigna, e os híbridos F1 não pudessem ser identificados (Skage *et al.* 2007). Como solução a este problema, Skage *et al.* (2007) apresentaram um protocolo aperfeiçoado de identificação de genótipos baseado numa dupla digestão muito simples da região rDNA-ITS com outras enzimas de restrição. Acrescidamente, o novo protocolo permite identificar todas as espécies europeias do complexo *Daphnia longispina*, assim como os seus híbridos F1 (Skage *et al.* 2007). Devido a região ITS ser um local de polimorfismo, isso fez com que, usando o protocolo de Billiones *et al.* 2004, os padrões de restrição obtidos pudessem ser erradamente interpretados (Skage *et al.* 2007).

Objectivos e estrutura da dissertação

O objectivo desta dissertação consistiu na análise da dinâmica de uma população do complexo *Daphnia longispina*, durante o período de transição Primavera-Verão, num lago pouco profundo e eutrófico, a Lagoa da Vela. Este período representa uma fase de transição ambiental, cobrindo o advento da pressão predatória por parte dos peixes planctívoros, à medida que o Verão se aproxima. No início deste período, a população regista densidades elevadas e é quando ocorre a fase de água transparente (Sommer *et al.* 1986); posteriormente, seguir-se-á uma fase de adaptação à pressão predatória e posterior declínio. Durante este período de transição, na Lagoa da Vela, a população de *Daphnia* exibiu alterações drásticas, incluindo a redução do tamanho à maturidade em quase metade (Castro & Goncalves 2007). O objectivo da presente dissertação foi o de acompanhar e analisar os parâmetros populacionais de *Daphnia* na Lagoa da Vela, por forma a corroborar as observações de Castro&Goncalves (2007). Adicionalmente, pretendeu-se complementar os dados morfológicos e populacionais com um estudo genético das espécies que aí ocorrem, de modo a averiguar de que forma a proporção dos diferentes *taxa*/genótipos evolui ao longo do período de estudo, sob a influência de diferentes estímulos ambientais. Para tal, recorreu-se a ferramentas moleculares recentemente desenvolvidas, por forma a suprir a ambiguidade dos critérios morfológicos para a diferenciação das espécies e a sua ineficácia na identificação de híbridos inter-específicos.

A conceptualização teórica e os objectivos específicos do trabalho, assim como as metodologias usadas, os resultados obtidos e sua discussão são apresentados numa secção própria e independente, constituindo um capítulo da

presente dissertação. Este capítulo é precedido da presente introdução geral, onde a temática da tese é inicialmente abordada. A secção ulterior da dissertação contempla algumas considerações finais sobre o trabalho realizado e a temática em estudo.

Bibliografia

- Abrantes N, Antunes SC, Pereira MJ & Goncalves F (2006a). Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **29**(1): 54-64.
- Abrantes N, Pereira R & Goncalves F (2006b). First step for an ecological risk assessment to evaluate the impact of diffuse pollution in Lake Vela (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment* **117**(1-3): 411-431.
- Antunes SC, Abrantes N & Goncalves F (2003). Seasonal variation of the abiotic parameters and the cladoceran assemblage of Lake Vela: comparison with previous studies. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* **39**(3): 255-264.
- APHA, AWWA & WPCF (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington DC, USA, American Public Health Association.
- Behera N & Nanjundiah V (2004). Phenotypic plasticity can potentiate rapid evolutionary change. *Journal of Theoretical Biology* **226**(2): 177-184.
- Billiones R, Brehm M, Klee J & Schwenk K (2004). Genetic identification of *Hyalodaphnia* species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* **526**(1): 43-53.
- Boersma M, vanTongeren OFR & Mooij WM (1996). Seasonal patterns in the mortality of *Daphnia* species in a shallow lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**(1): 18-28.
- Brede N, Thielsch A, Sandrock C, Spaak P, Keller B, Streit B & Schwenk K (2006). Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* **6**(2): 536-539.
- Caramujo M-J & Boavida MJ (2000). Dynamics of *Daphnia hyalina* x *galeata* in Castelo do Bode Reservoir: The effect of food availability and flatworm predation. *Aquatic Ecology* **34**: 155-163.
- Carpenter SR (2005). Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(29): 10002-10005.
- Carpenter SR, Christensen DL, Cole JJ, Cottingham KL, He X, Hodgson JR, Kitchell JF, Knight SE, Pace ML, Post DM, Schindler DE & Voichick N

- (1995). Biological-Control of Eutrophication in Lakes. *Environmental Science & Technology* **29**(3): 784-786.
- Carpenter SR, Cole JJ, Hodgson JR, Kitchell JF, Pace ML, Bade D, Cottingham KL, Essington TE, Houser JN & Schindler DE (2001). Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: whole-lake experiments. *Ecological Monographs* **71**(2): 163-186.
- Castro BB (2007). Ecologia e selecção de habitat em crustáceos zooplanctónicos de lagos pouco profundos. p. 168, Aveiro: Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.
- Castro BB & Goncalves F (2007). Seasonal dynamics of the crustacean zooplankton of a shallow eutrophic lake from the Mediterranean region. *Fundamental and Applied Limnology* **169**(3): 189-202.
- De Meester L, Vanoverbeke J, De Gelas K, Ortells R & Spaak P (2006). Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations - a conceptual framework. *Archiv Fur Hydrobiologie* **167**(1-4): 217-244.
- Giessler S (2001). Morphological differentiation within the *Daphnia longispina* group. *Hydrobiologia* **442**(1-3): 55-66.
- Gliwicz ZM (1994). Relative Significance of Direct and Indirect Effects of Predation by Planktivorous Fish on Zooplankton. *Hydrobiologia* **272**(1-3): 201-210.
- Hebert PDN (1978). Population Biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **53**(3): 387-426.
- Hewitt G (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**(6789): 907-913.
- Hulsmann S (2003). Recruitment patterns of *Daphnia*: a key for understanding midsummer declines? *Hydrobiologia* **491**(1-3): 35-46.
- Keller B, Wolinska J, Tellenbach C & Spaak P (2007). Reproductive isolation keeps hybridizing *Daphnia* species distinct. *Limnology and Oceanography* **52**(3): 984-991.
- Lampert W & Sommer U (1997). Limnoecology: The ecology of lakes and streams. New York (USA), Oxford University Press.
- Lass S & Spaak P (2003). Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* **491**(1-3): 221-239.
- Luecke C, Vanni MJ, Magnuson JJ, Kitchell JF & Jacobson PT (1990). Seasonal Regulation of *Daphnia* Populations by Planktivorous Fish - Implications for

- the Spring Clear-Water Phase. *Limnology and Oceanography* **35**(8): 1718-1733.
- Pereira R, Soares AMVM, Ribeiro R & Goncalves F (2002). Assessing the trophic state of Linhos lake: a first step towards ecological rehabilitation. *Journal of Environmental Management* **64**(3): 285-297.
- Petrusek A, Bastiansen F & Schwenk K. (2005). European *Daphnia* Species (EDS) - Taxonomic and genetic keys. [Build 2006-01-12 beta]. CD-ROM, distributed by the authors. Department of Ecology and Evolution, J.W. Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany & Department of Ecology, Charles University, Prague, Czechia.
- Ringelberg J, van Gool E & Brehm M (2004). Density and depth variations of *Daphnia multilocus* genotypes during a summer period in Lake Maarsseveen. *Aquatic Ecology* **38**(4): 525-535.
- Scheffer M (1998). Ecology of shallow lakes. London, Chapman & Hall.
- Schwenk K, Junntila P, Rautio M, Bastiansen F, Knapp A, Dove O, Billiones R & Streit B (2004). Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (Hyalodaphnia) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnology and Oceanography* **49**(2): 532-539.
- Schwenk K, Posada D & Hebert PDN (2000). Molecular systematics of European Hyalodaphnia: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**(1455): 1833-1842.
- Schwenk K & Spaak P (1995). Evolutionary and Ecological Consequences of Interspecific Hybridization in Cladocerans. *Experientia* **51**(5): 465-481.
- Silva PCLD (1999). Lagoa das Braças: um caso de estudo do processo de eutrofização. p. 83, Coimbra: Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.
- Skage M, Hobek A, Ruthova S, Keller B, Petrusek A, Sed'a JR & Spaak P (2007). Intra-specific rDNA-ITS restriction site variation and an improved protocol to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia* **594**: 19-32.
- Sommer U, Gliwicz ZM, Lampert W & Duncan A (1986). The Peg-Model of Seasonal Succession of Planktonic Events in Fresh Waters. *Archiv Fur Hydrobiologie* **106**(4): 433-471.

- Stibor H & Lampert W (2000). Components of additive variance in life-history traits of *Daphnia hyalina*: seasonal differences in the response to predator signals. *Oikos* **88**(1): 129-138.
- Tessier AJ, Young A & Leibold M (1992). Population-Dynamics and Body-Size Selection in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **37**(1): 1-13.
- Weber A & Declerck S (1997). Phenotypic plasticity of *Daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potential. *Hydrobiologia* **360**: 89-99.
- Wetzel RG & Likens GE (1983). *Limnology*. Philadelphia, USA, Saunders College Publishing.

Capítulo 1

**Dinâmica populacional de *Hyalodaphnia* sp.
na lagoa da Vela na transição Primavera-Verão**

Introdução

As espécies de *Daphnia* têm sido um importante objecto de estudo pelos limnologistas (ver Castro 2007), sobretudo pela sua biologia (são organismos modelo em Ecologia, Biologia Evolutiva e Genómica) e posição de charneira na transferência de massa e energia nas cadeias tróficas pelágicas. De um ponto de vista mais aplicado, o interesse nestes cladóceros reside também no seu papel vital no controlo da produção fitoplanctónica em sistemas eutróficos (Pace 1984; Moss 1992). A dinâmica populacional de *Daphnia*, isto é, as variações na abundância das populações destes seres vivos, segue usualmente padrões bem distintos em lagos temperados (Sommer *et al.* 1986; Castro & Goncalves 2007). Após uma redução na sua densidade populacional para níveis muito baixos ou até mesmo inexistentes no Inverno, as populações tendem a desenvolver-se no início da Primavera, com o aumento da temperatura e disponibilidade de alimento, atingindo os valores máximos de densidade anuais durante a Primavera (Lampert *et al.* 1986; Hulsmann & Voigt 2002; Hulsmann 2003). Durante esta fase, é comum registarem-se os níveis mais elevados de transparência da água (Scheffer 1998; Castro & Goncalves 2007). Habitualmente, as densidades populacionais de *Daphnia* voltam a sofrer um forte revés no Verão, sobretudo em sistemas eutróficos, devido à conjugação de vários factores (dos quais se destacam a predação pelos peixes e a presença de cianobactérias) (Wetzel & Likens 1983).

Num estudo realizado na Lagoa da Vela (Figueira da Foz, litoral-centro de Portugal), Castro & Goncalves (2007) verificaram que a população de *Hyalodaphnia* (complexo de espécies do grupo *Daphnia longispina*) se encontrava bem representada neste sistema lacustre, apresentando flutuações sazonais, as quais incluíam períodos de ausência completa, nomeadamente durante o Verão e o Outono. No início da Primavera estes cladóceros exibiam um tamanho corporal médio e um tamanho à maturação muito superiores aos que haviam sido verificados no final dessa estação (e início do Verão). Essas diferenças foram atribuídas ao incremento da pressão predatória (por parte dos peixes planctívoros) durante o período de transição Primavera-Verão (Castro & Goncalves 2007). A capacidade de adaptação de *Daphnia* às flutuantes

condições ambientais (quantidade e qualidade de alimento, predação, competição) é bem conhecida (e.g., DeMeester 1996b, 1996a; Boersma *et al.* 1999; Sarnelle & Wilson 2005; Castro *et al.* 2007) e é possível que a diferença de tamanho corporal à maturidade observada seja devida à sua plasticidade fenotípica. A plasticidade fenotípica é o principal mecanismo que contribui para a existência das populações em *habitats* com flutuações temporárias (Silva 1999). Neste processo, os organismos reagem a estímulos químicos (e.g. presença de peixes), moldando as suas respostas morfológicas, comportamentais ou reprodutivas em função do sinal recebido. No caso da predação, os dafnídeos reduzem o seu tamanho corporal de modo a minimizar a probabilidade de serem detectados por predadores visuais, como os peixes (Castro & Goncalves 2007; Pijanowska *et al.* 2007). Os peixes planctívoros são os principais predadores de controlo de *Daphnia* e exercem um maior efeito predatório nas presas de maior tamanho corporal e maior biomassa (Luecke *et al.* 1990; Tessier *et al.* 1992; Gliwicz 1994; Caramujo *et al.* 1997; Ringelberg *et al.* 2004; Castro & Goncalves 2007; Pijanowska *et al.* 2007).

Outra explicação possível para a acentuada diferença no tamanho corporal das primíparas é a alternância ou sucessão de diferentes espécies (*Daphnia longispina*, *Daphnia galeata*, *D.longispina* x *D.galeata*), ou de diferentes génotipos dentro da mesma espécie, durante este período de transição ambiental. A selecção natural, via predação ou resistência a recursos alimentares insuficientes, determina o génotipo que será favorecido em cada momento (Silva 1999). Génotipos que apresentem maior tamanho corporal podem estar menos adaptados ao ambiente pois são o principal alvo alimentar dos peixes planctívoros (Luecke *et al.* 1990; Boersma *et al.* 1996), sendo removidos num cenário de predação e substituídos por outros de menores dimensões. Adicionalmente, a presença de mais do que uma espécie do género *Daphnia* leva à formação (através de reprodução sexuada) de híbridos inter-específicos (Keller & Spaak 2004). A hibridação inter-específica é um fenómeno comum entre o complexo de espécies de *Daphnia longispina* (Schwenk *et al.* 1995; Schwenk 1998; Giessler 2001; Keller *et al.* 2007; Seda *et al.* 2007). Os híbridos podem permanecer distintos, mesmo quando co-habitam com as suas espécies parentais, e apresentam capacidade de produzir indivíduos sexualmente férteis (Jankowski & Straile 2004). Nos indivíduos híbridos, as características parentais podem ser

vantajosamente combinadas tornando-os mais eficientes que os seus *taxa* parentais (Schwenk & Spaak 1995; Seda *et al.* 2007), por exemplo no evitamento da predação de peixes planctívoros, com a combinação de um tamanho corporal relativamente pequeno e de uma elevada taxa de crescimento.

Este trabalho teve como objectivo estudar a dinâmica populacional do complexo *Daphnia longispina*, durante o curto período de transição entre a Primavera-Verão na Lagoa da Vela, e averiguar se a população aí presente é uni-específica ou mista, testando a hipótese de sucessão dos *taxa* ao longo do gradiente temporal de predação. Dado que os critérios morfológicos para a distinção das espécies são dúbios (Schwenk 1998; Giessler *et al.* 1999; Billiones *et al.* 2004) – e ineficazes na identificação de híbridos inter-específicos – foram utilizados protocolos moleculares recentemente propostos (Billiones *et al.* 2004; Skage *et al.* 2007), de modo a poder distinguir os *taxa* presentes.

Material e métodos

Local de estudo

A Lagoa da Vela é a maior das pequenas lagoas naturais de água doce da costa oeste entre Mira e Figueira da Foz (centro de Portugal). Situa-se numa área de cordões dunares estabilizados (cordão dunar de Quiaios, do lado oceânico das lagoas) e areias eólicas sem estrutura dunar (planície da Gândara, do lado continental). É uma lagoa pequena (área máxima inundável: 70 ha) e de baixa profundidade (máxima: 2,4 m; média: 0,9 m), que se encontra num estado eutrófico devido à acumulação de matéria orgânica e nutrientes resultantes de descargas de campos agrícolas, situados na sua margem leste. A água encontra-se permanentemente turva (salvo alguns períodos transientes de alguma transparência) devido à elevada produtividade primária existente e à ressuspensão mais ou menos regular de materiais sedimentares (Castro & Goncalves 2007). Os “blooms” de cianobactérias são frequentemente observados e, esporadicamente, já ocorreram diminuições bruscas de oxigénio disponível e consequente morte de peixes (Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006a).

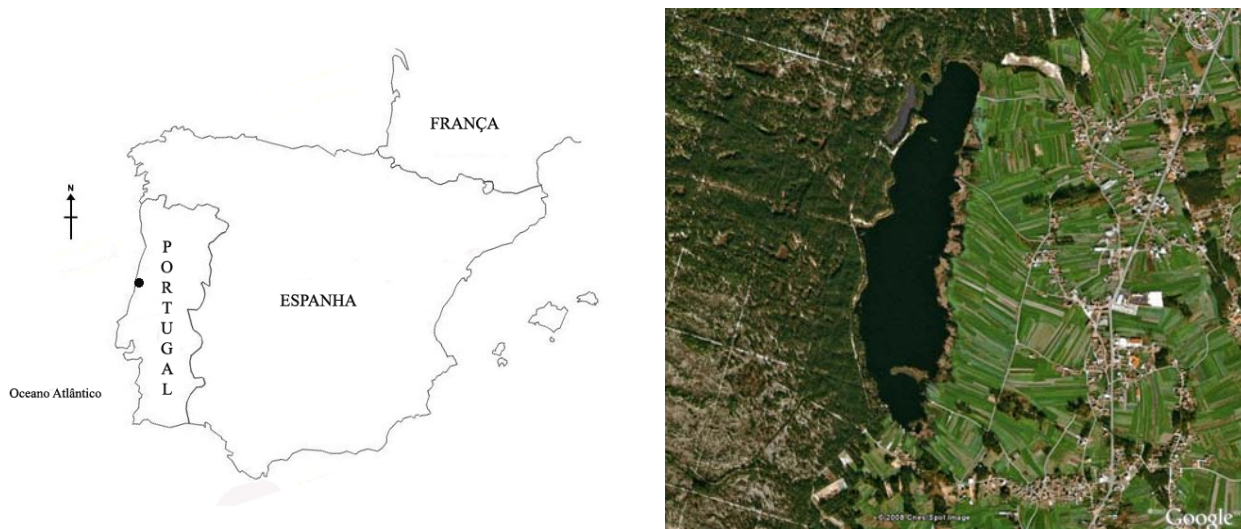


Figura 2. Localização e fotografia de satélite da Lagoa da Vela (Figueira da Foz, Portugal). [www.earth.google.com]

A Lagoa da Vela apresenta escassez de macrófitas submersas e dominância de peixes planctívoros de origem exótica, tais como a perca-sol (*Lepomis gibbosus*) e a gambúsia (*Gambusia holbrooki*), que ocorrem em densidades extremamente elevadas. O achigã (*Micropterus salmoides*) é o único representante piscívoro da lagoa. A par do agravamento da eutroficação, também a comunidade íctica tem sofrido alterações negativas ao longo do tempo, incluindo a extinção local de espécies nativas como o verdemã (*Cobitis* spp.) e o ruivaco (presumivelmente *Achondrostoma oligolepis*).

Procedimentos de amostragem

A amostragem foi efectuada semanalmente, durante 11 semanas (de 6 de Abril a 8 de Junho de 2006), usando um pequeno barco numa zona pelágica (sem macrófitas). *In situ*, determinou-se com equipamentos de medição portátil apropriados o pH, a temperatura da água, a condutividade e o oxigénio dissolvido, enquanto a profundidade e a transparência foram determinadas usando uma estaca calibrada e um disco de Secchi. Foram recolhidas amostras de água em garrafas de plástico de 1,5 L para posterior quantificação do azoto inorgânico dissolvido ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{NH}_3^+$ - DIN, em mg N L^{-1}), fósforo total (TP, em mg P L^{-1})

e clorofila *a* (que foi diferenciada em fracção total, $> 25 \mu\text{m}$ e $< 25 \mu\text{m}$, em $\mu\text{g L}^{-1}$). Estes parâmetros foram quantificados por espectrofotometria, obedecendo a metodologias largamente disseminadas (APHA *et al.* 1989; Wetzel & Likens 1991; Rodier 1996).

Para a análise da composição de zooplâncton foram recolhidos dois tipos de amostras: quantitativas e qualitativas. Para o primeiro caso, recolheu-se 16 L de amostra de água, com uma garrafa de Van Dorn vertical, que foram concentrados numa rede de plâncton com malha de $55\mu\text{m}$. As amostras foram preservadas em álcool a $\approx 80\%$, para posterior examinação (determinação da composição específica e densidade zooplanctónica). A colheita qualitativa (sem estimativa do volume amostrado) foi efectuada por arrasto oblíquo na coluna de água com rede de plâncton com malha de $55 \mu\text{m}$. Essas amostras foram preservadas em álcool a $\approx 80\%$ e armazenadas a 4°C , para posterior examinação dos parâmetros morfométricos e de fecundidade, bem como para análise molecular.

Parâmetros morfométricos e reprodutivos

Em laboratório, os cladóceros dominantes na amostra foram identificados como pertencentes ao grupo *Daphnia longispina*, de acordo com a nomenclatura de Alonso (1996). Pontualmente, foram registados alguns exemplares de *D. parvula* (a densidades reduzidas), que é um *taxon* alienígena e, por isso, não foi considerado na análise. A abundância de *D. longispina* foi expressa em densidades (ind L^{-1}), após fraccionamento da amostra quantitativa e contagem dos exemplares em estereoscopia. Para as estimativas populacionais, foi recolhida uma sub-amostra aleatória de 100 indivíduos das amostras qualitativas. O tamanho médio do corpo (desde o topo da carapaça até à base do espinho caudal) de cada um desses indivíduos foi determinado e o estado reprodutivo registado (juvenis, machos, fêmeas ovígeras, fêmeas com *ephippium*). No caso das fêmeas ovígeras, procedeu-se ainda à contagem do respectivo número de ovos contidos na câmara de incubação (marsúpio) como estimativa de fecundidade. A proporção de fêmeas ovígeras relativamente ao número total de *Daphnia* foi determinada a partir desta sub-amostra ou da amostra total (se $N < 100$). De forma a garantir um desenho experimental equilibrado (N semelhante), foram adicionalmente medidas e isoladas fêmeas ovígeras até

perfezer um total de 55 indivíduos por semana de amostragem. Determinou-se nestas fêmeas o tamanho corporal à maturidade (SAM), para cada semana de amostragem, como sendo a classe de tamanho mais pequena de fêmeas ovígeras, excluindo as primíparas mais pequenas (utilizando uma margem de segurança de 5%, conforme Caramujo *et al.* (1997). Cada uma das fêmeas ovígeras foi isolada, analisada e transferida para um microtubo com etanol a ≈80% e armazenadas a 4°C, para posterior análise genética.

Análises moleculares

O material genético foi extraído conforme descrito nos trabalhos de Schwenk *et al.* (1998; 2004) e Brede *et al.* (2006). Os 55 indivíduos de *Daphnia longispina* de cada semana de amostragem foram individualmente transferidos da solução de etanol para uma solução de lavagem - 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE) [10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0 a 25 °C)] - e incubados durante, pelo menos, 2h. Este procedimento permite remover o excesso de etanol das amostras, que poderia comprometer a restante extracção. Após lavagem, os exemplares foram individualmente sujeitos à extracção de DNA em tubos de reacção contendo 72 µL de uma mistura de tampão H3 [100mM Tris (pH 8,3 a 25 °C), 0,5 M KCl, 0,05 % Tween-20®, 0,05 % NP-40 (Tergitol®)] e 20 µg de proteinase K. Para maximizar a extracção, as amostras foram incubadas a 40°C num banho de água durante, pelo menos, 6h. A proteinase K foi irreversivelmente desactivada por aquecimento das amostras a 90 °C durante 12 min. Antes e após o aquecimento das amostras, estas foram sujeitas a centrifugação a 14000 rpm durante uns segundos. As amostras foram armazenadas a 4°C até se proceder à amplificação do ADN.

A amplificação do ADN por reacção em cadeia da polimerase (PCR) da região ITS do genoma de *Daphnia* foi efectuada conforme descrito por Schwenk *et al.* (2000) e Billiones *et al.* (2004). Cada reacção de PCR (16 µL) era constituída por: 3 mM MgCl₂ 1x tampão de PCR, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, previamente misturados), 0.3 µM de cada oligonucleótido (*vulgo primer*) e 1 unidade de *Taq* ADN polimerase (recombinante). Todos os reagentes da reacção foram adquiridos a Fermentas® (representada em Portugal por Bioportugal® Lda., Porto). Os *primers* para a região ITS foram os descritos por Schwenk *et al.* (2000) (*forward*: 5'-CAC ACC GCC CGT CGC TAC TAC CGA

TTG-3'; *reverse*: 5'-CGG TGG TCG ACA CTT CGA CAC GC-3') e adquiridos a Invitrogen™ (representada em Portugal por Alfacene® Lda., Carcavelos). Os parâmetros do termociclador para a amplificação foram (adaptados de Skage *et al.* 2007): 1 período inicial de desnaturação de 95 °C durante 120 seg; 35 ciclos de 94 °C por 45 seg, 60° C por 45 seg e 72 °C durante 90 seg; a amplificação foi terminada com um passo de alongamento final a 72 °C durante 8 min.. Os produtos de PCR (*amplicons*) foram visualizados em gel de agarose a 1%, após separação electroforética (ver detalhes abaixo), para confirmação da presença de uma banda de ~1500 bp (fragmento ITS).

Dos fragmentos ITS obtidos, 48 de cada semana de amostragem foram posteriormente cortados com as enzimas de restrição *HpyF10VI* (equivalente a *Mwo I* em Billiones *et al.* 2004) e *Eco52I* + *MbI* (protocolo double digestion descrito por Skage *et al.* 2007) e as reacções incubadas a 37 °C durante a noite. Foram seguidas as recomendações do fornecedor (Fermentas®) e as quantidades de enzima no volume de reacção final (7,5 µL) foram 1, 0,8 e 1,6 unidades de *HpyF10VI*, *Eco52I* e *MbI*, respectivamente. Os fragmentos obtidos (bandas polimórficas – RFLP) foram separados através de electroforese (90V) em gel de agarose a 2% e visualizados num transiluminador (312 nm), após imersão do gel em brometo de etídio (este corante liga-se especificamente ao ADN, podendo ser posteriormente visualizado sob luz UV). Para auxiliar a distinção dos fragmentos obtidos, as extremidades dos géis foram sempre carregadas com um marcador de peso molecular comercial de 100 pb (100-3000 bp), seguindo as indicações do fabricante (Fermentas®). As imagens (fotografias dos géis) foram capturadas e digitalizadas com um aparelho de aquisição de imagem G:BOX HR (SynGene, USA), usando o software GeneSnap (SynGene®, USA). A Figura 3 mostra os padrões de bandas espectáveis (versão simplificada, pois não inclui outros *taxa*, menos comuns) para cada um dos protocolos de restrição, segundo Billiones *et al.* (2004), Petrusek *et al.*(2005) e Skage *et al.* (2007).

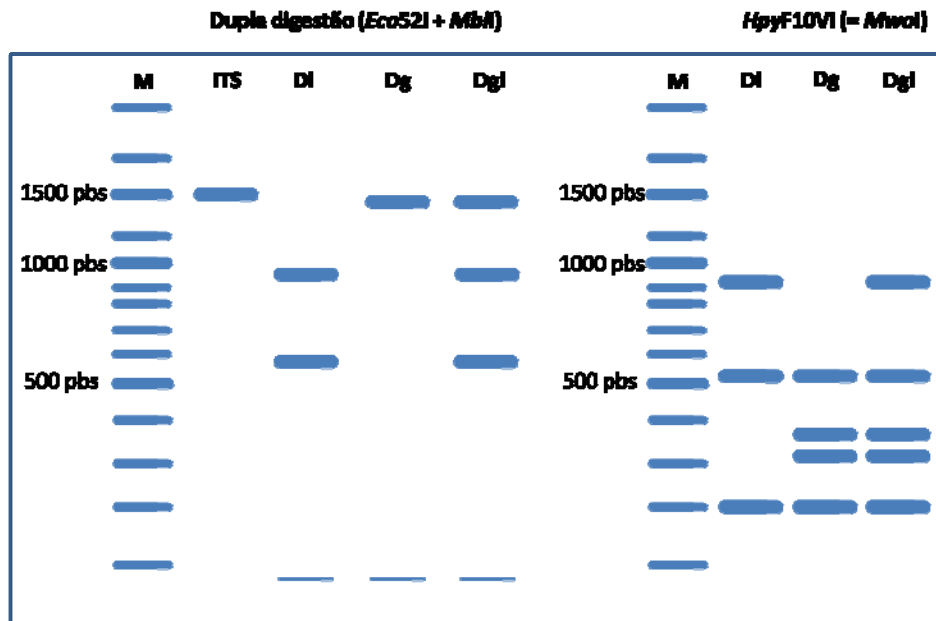


Figura 3. Representação esquemática dos padrões de restrição de *D. longispina* (DI), *D. galeata* (Dg) e *D. galeata x longispina* (Dgl). Tipicamente, os padrões de bandas são visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (visível sob luz UV). Está igualmente representado um marcador de peso molecular (M) de 100 pbs (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1500, 2000, 3000 pbs) e o fragmento amplificado não sujeito à restrição (ITS).

Análise estatística

A variação semanal dos registos morfológicos da população de *Daphnia* foi sujeita a uma análise de variância (ANOVA) unifactorial, de forma a testar se esta variação foi significativa. Nos casos em que tal sucedeu, foi ainda empregue uma análise de contrastes com polinomiais ortogonais (Quinn & Keough 2002) para determinar a significância da tendência linear da variável analisada ao longo do tempo. Foi também utilizada a análise de correlação e/ou regressão linear para avaliar as relações entre variáveis populacionais e ambientais. A significância da variação semanal nos rácios entre as diferentes espécies de *Daphnia* foi avaliada com um teste de independência de χ^2 (Quinn & Keough 2002). Em todas as análises foi utilizado um nível de significância de 0,05.

Resultados

Parâmetros abióticos e biomassa fitoplanctónica

A variação dos parâmetros físico-químicos da lagoa da Vela, ao longo do período de estudo, é apresentada na Tabela 1. A temperatura da água aumentou ao longo do tempo, tendo-se registado o valor mínimo (17,2 °C) a 6 de Abril e o valor máximo (26,0 °C) a 8 de Junho. A percentagem de saturação de oxigénio apresentou valores perto ou superiores à saturação 100%, o que sugere uma forte remistura das águas (por acção do vento) e elevada actividade fotossintética. O valor máximo de 150,0 % registou-se a 13 de Abril e o mínimo de 84,0 % a 4 de Maio (Tabela 1). Este mínimo no teor de oxigénio dissolvido coincidiu com o mínimo de biomassa fitoplanctónica, medida em concentração de clorofila *a* (Figura 4). O pH manteve-se sempre em valores ligeiramente alcalinos (7,9-8,6), tendo atingido os seus mínimos após um período de chuvas (no final de Abril), que contribuiu também para o decréscimo dos valores de condutividade e diminuição da carga de nutrientes (início de Maio – ver Tabela 1). À parte este período de alguma pluviosidade, os valores de condutividade e de nutrientes (DIN e TP) mantiveram-se mais ou menos constantes.

Tabela 1. Registo dos parâmetros físico-químicos da lagoa da Vela, durante o período de estudo (OD - Oxigénio dissolvido; DIN - Azoto inorgânico dissolvido; TP - Fósforo total).

Data	Temp.(°C)	OD (%)	pH	Cond.(µS/cm)	DIN(mg N/L)	TP(mg P/L)
6-Abr	17,2	118,7	8,56	583	1,36	0,18
13-Abr	18,6	150,0	8,30	585	1,21	0,24
20-Abr	18,9	90,3	8,19	588	1,14	0,18
27-Abr	21,2	92,0	7,88	594	0,90	0,16
4-Mai	19,9	84,0	7,88	127	0,63	0,14
11-Mai	21,6	117,0	7,93	130	0,86	0,10
18-Mai	23,0	100,0	7,94	463	1,11	0,12
25-Mai	20,0	97,5	8,46	644	1,05	0,12
1-Jun	22,0	102,0	8,25	653	1,31	0,14
08-Jun	26,0	145,0	8,37	619	1,64	0,16

A profundidade da lagoa da Vela no local de amostragem escolhido apresentou valores sempre superiores a 1 m de profundidade, excepção feita ao valor registado a 8 de Junho (0,90 m). A transparência média registada na Lagoa da Vela (medida com o disco de Secchi), ao longo do período de estudo, foi de cerca de 0,44 m. O seu valor permaneceu constante (0,4 m) desde o início do estudo até 20 de Abril, havendo um ligeiro aumento de 27 de Abril até 16 de Maio, verificando-se posteriormente uma diminuição até 0,30 m (8 de Junho – Figura 4).

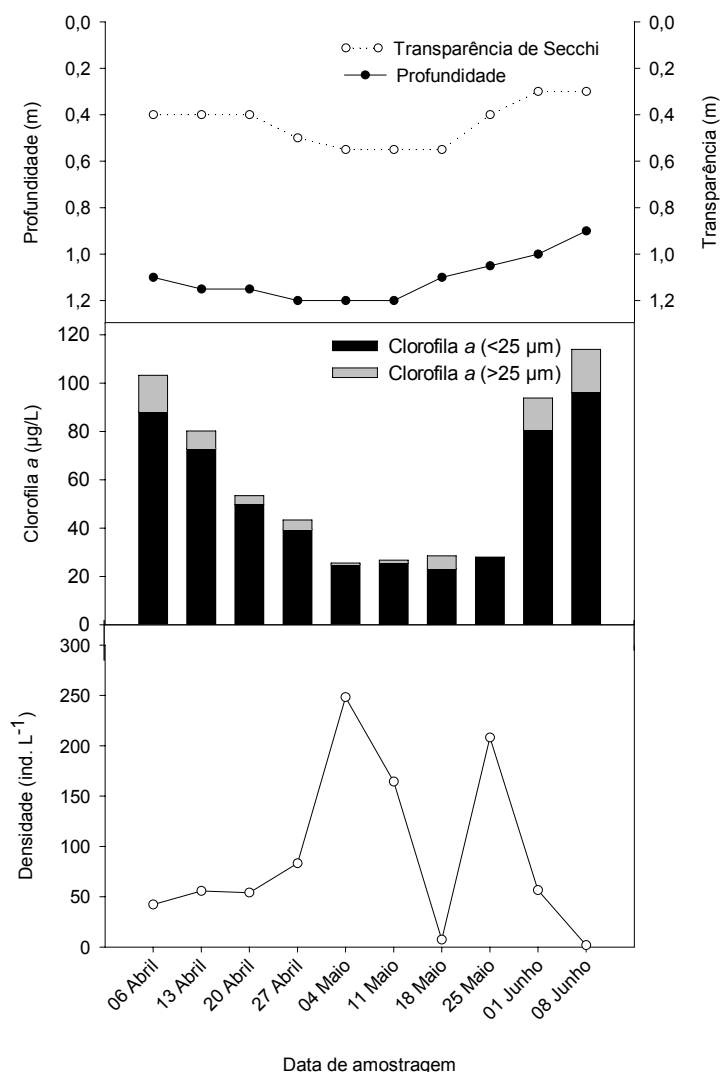


Figura 4. Variação da profundidade, transparência de Secchi, clorofila *a* e densidade de *Daphnia cf. longispina* na Lagoa da Vela, durante o período de estudo.

A clorofila *a* representa um índice aproximado da biomassa fitoplanctónica e foi diferenciada em fracções de dimensões inferiores (fracção comestível pelos

dafnídeos) e superiores a 25 μm (Figura 4). A primeira fracção predomina, ao longo de todo o estudo, relativamente à fracção de partículas suspensas na água (seston) de dimensões superiores a 25 μm . De um modo geral, a clorofila *a* registou uma tendência de decréscimo desde o início da amostragem até 4 de Maio. Este mínimo no teor de clorofila *a* foi coincidente com o pico máximo de densidade de *Daphnia*. Durante todo o mês de Maio, o teor de clorofila *a* manteve-se entre os 20 e os 30 $\mu\text{g/L}$, coincidindo com o período de maior transparência (ver acima). A variação da transparência de Secchi, ao longo das semanas de amostragem, foi explicada sobretudo pela concentração de clorofila *a* (<25 μm) presente na água (regressão simples: declive= -0,00283; $r^2= 0,70$; $p= 0,002$). Durante o mês de Maio, à excepção do dia 18, foram sempre registadas densidades de *Daphnia* superiores a 150 ind./L (Figura 4). Contudo, não foi registada qualquer relação linear significativa entre a densidade deste cladóceros e qualquer um destes parâmetros ambientais.

Dinâmica populacional de *Daphnia*

A densidade populacional de *Daphnia* cf. *longispina* (*sensu Hyalodaphnia*), apresenta uma variação irregular ao longo do tempo (Figura 4), aparentemente relacionada com a transparência da água e a clorofila *a* (ver acima). De um modo geral, a densidade dos indivíduos foi aumentando ao longo do período de estudo, tendo-se registado um valor máximo de 248,12 ind./L a 4 de Maio. Seguiu-se uma quebra abrupta da densidade populacional nas duas semanas subsequentes e uma recuperação rápida a 25 de Maio (> 200 ind./L). Durante este período, verificaram-se os valores mais elevados de transparência e reduzidos de clorofila *a*, durante o período de estudo. A partir do final de Maio, a população de *Daphnia* registou uma quebra acentuada no número de efectivos (Figura 4), vindo posteriormente a desaparecer durante o Verão (dados não apresentados). A dificuldade em obter fêmeas ovígeras a partir de 8 de Junho (inclusivé), levou-nos a considerar, para fins de análise dos parâmetros populacionais, apenas o período de 6 de Abril a 1 de Junho (ver em baixo).

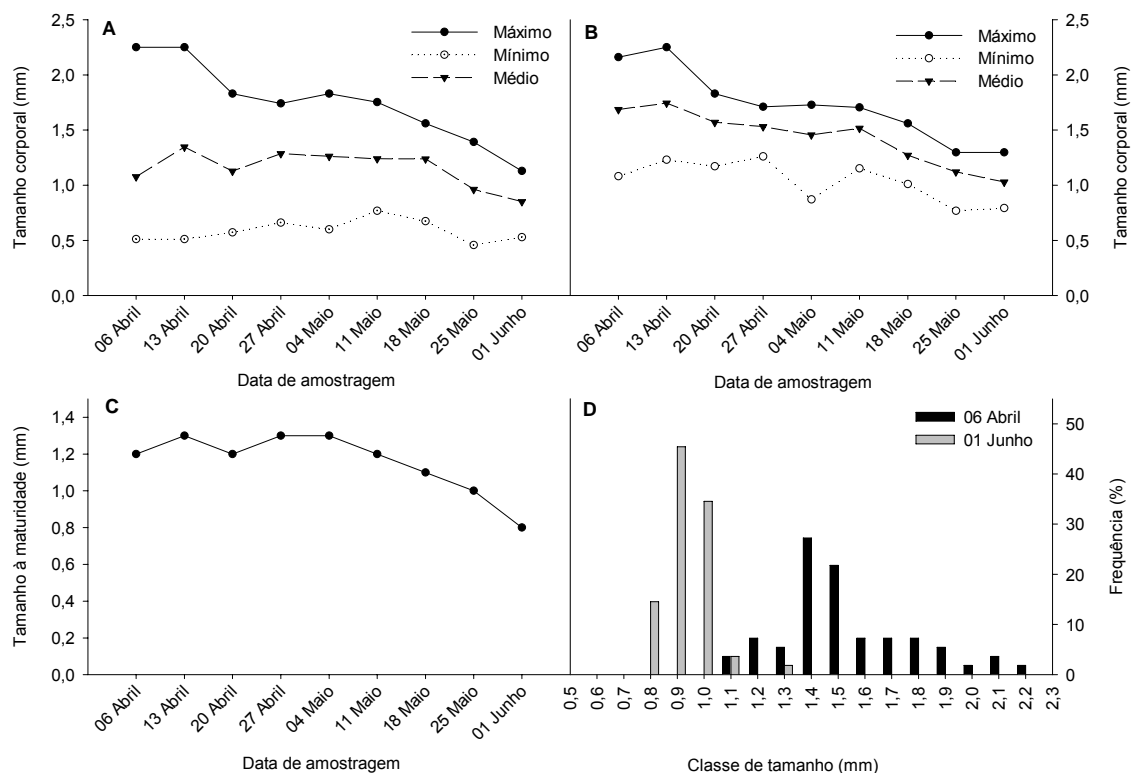


Figura 5. Variação do tamanho corporal (máximo, médio e mínimo) de *Daphnia* cf. *longispina*, ao longo do período de estudo numa amostra aleatória de 100 indivíduos (A) e de 55 fêmeas adultas ovígeras (B). Evolução temporal do tamanho à maturidade das fêmeas ovígeras no mesmo período de estudo (C) e distribuição de tamanho corporal em duas semanas de amostragem distintas (D), uma no início (6 de Abril) e outra no final do período de amostragem (1 de Junho).

O tamanho corporal médio e máximo de *Daphnia* apresentou um declínio progressivo ao longo do período de estudo (Figura 5 - A), ao passo que os valores mínimos permaneceram relativamente constantes. O comprimento máximo registado foi de 2,25 mm, a 6 de Abril, e o comprimento mínimo foi de 0,46 mm, registado a 25 de Maio. O decréscimo de tamanho corporal foi também perceptível quando apenas se consideraram as fêmeas adultas (Figura 5 - B). Verificou-se uma tendência monotónica de decréscimo altamente significativa ao longo do período de amostragem, quer na sub-amostra da população (contraste linear= -0,24; $p < 0,001$; após ANOVA unifactorial: $F = 39,86$; g.l.=8; $p < 0,001$), quer no caso das fêmeas adultas (contraste linear= -0,534; $p < 0,001$; após ANOVA unifactorial: $F = 95,78$; g.l.=8; $p < 0,001$). No caso das fêmeas adultas (ovígeras), o

comprimento corporal máximo registado foi de 2,25 mm a 13 de Abril e o comprimento mínimo foi de 0,77 mm a 25 de Maio. A progressiva redução do tamanho corporal da população de *Daphnia* adultas resultou, por isso, da conjugação de dois fenómenos: a) desaparecimento dos espécimes de maiores dimensões (ver Figura 5 – A e B); b) redução do tamanho à maturidade, bem perceptível (Figura 5 – C) sobretudo a partir de 11 de Maio. O tamanho à maturidade mais elevado foi de 1,3 mm (13 de Abril) e o mais baixo foi de 0,8 mm (1 de Junho). Na figura 5 - D é possível visualizar-se, a título de exemplo, a frequência das classes de tamanho nas datas de amostragem mais afastadas, isto é, a primeira (6 de Abril) e a última semana (1 de Junho) do estudo. Esta figura (distribuição das classes de tamanhos das fêmeas ovígeras de *Daphnia*) ilustra bem os dois fenómenos acima indicados, que resultaram quase numa não-sobreposição da distribuição de tamanhos da mesma população em dois períodos diferentes (com uma distância de 2 meses). Estas evidências contribuem para fortalecer a hipótese de que poderá haver uma sucessão ecológica durante o período de transição ambiental, com substituição de um determinado *taxon* dentro do grupo *D. longispina* por outro(s) do mesmo complexo de espécies (incluindo híbridos interespecíficos). Foi necessário recorrer a técnicas de análise genética para averiguar a validade desta hipótese (ver abaixo).

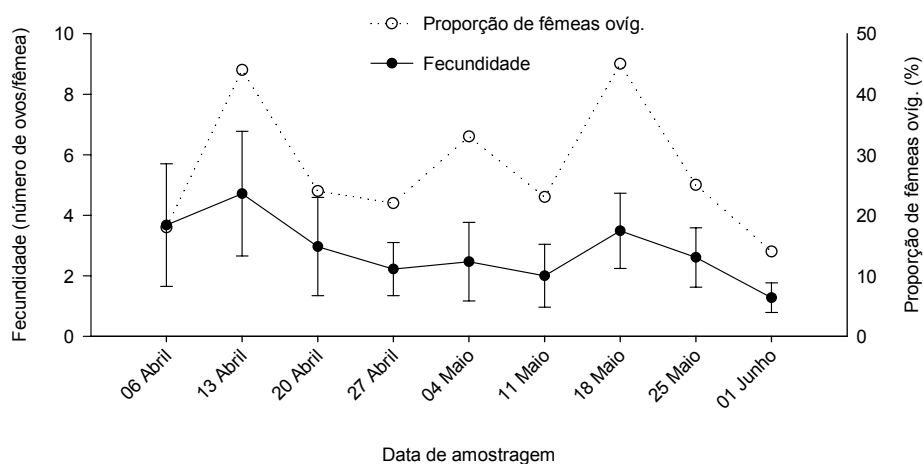


Figura 6. Variação da proporção de fêmeas ovígeras e fecundidade média de *Daphnia* cf. *longispina* na lagoa da Vela. As barras de erro representam o desvio padrão.

A proporção de fêmeas ovígeras na população de *Daphnia* apresentou um padrão irregular (Figura 6), não se observando qualquer tendência ao longo do

tempo. Este parâmetro mostrou estar marginalmente correlacionado com o tamanho corporal médio ($r = 0,666$; $p = 0,050$) e com a fecundidade ($r = 0,680$; $p = 0,044$), mas não foi encontrada nenhuma relação com a disponibilidade alimentar (clorofila *a*) ou com a densidade populacional. A percentagem mínima registada foi de 14 %, a 1 de Junho, e a máxima foi de 46%, a 18 de Maio. Já a fecundidade apresentou valores tendencialmente decrescentes ao longo do período de estudo (Figura 6). Esta tendência de decréscimo revelou ser significativa (contraste linear= -1,95, $p < 0,001$; após ANOVA unifactorial: $F = 30,68$; g.l.=8; $p < 0,001$). O valor médio de número de ovos por fêmea mais elevado registado foi de 4,74 (13 de Abril), e o valor mais baixo foi de 1,27 (1 de Junho). A variação da fecundidade demonstrou estar directamente relacionada com a variação do tamanho corporal das fêmeas ovígeras, na medida em que foi observada uma correlação significativa entre a fecundidade e tamanho corporal médio das fêmeas ovígeras ($r = 0,700$; $p = 0,036$), bem como o tamanho corporal máximo ($r = 0,762$; $p = 0,017$).

Diferenciação de *Daphnia* spp. com marcadores moleculares

A análise genética efectuada aos indivíduos presentes na lagoa da Vela permitiu demonstrar que, em média, cerca de 97 % dos dafnídeos pertencem à espécie *D. galeata*, enquanto uma reduzida proporção representa híbridos interespecíficos de *D. longispina* x *D. galeata* (Figura 7). Apesar de existirem diferenças significativas na frequência de ambos os *taxa* ao longo das semanas de estudo (teste de independência, $\chi^2 = 23,0$; g.l = 9; $p = 0,006$), estas diferenças apenas reflectem eventos aleatórios, na medida em que não é visível qualquer tendência temporal de sucessão ou substituição de *taxa* (Figura 7), conforme anteriormente hipotetizado.

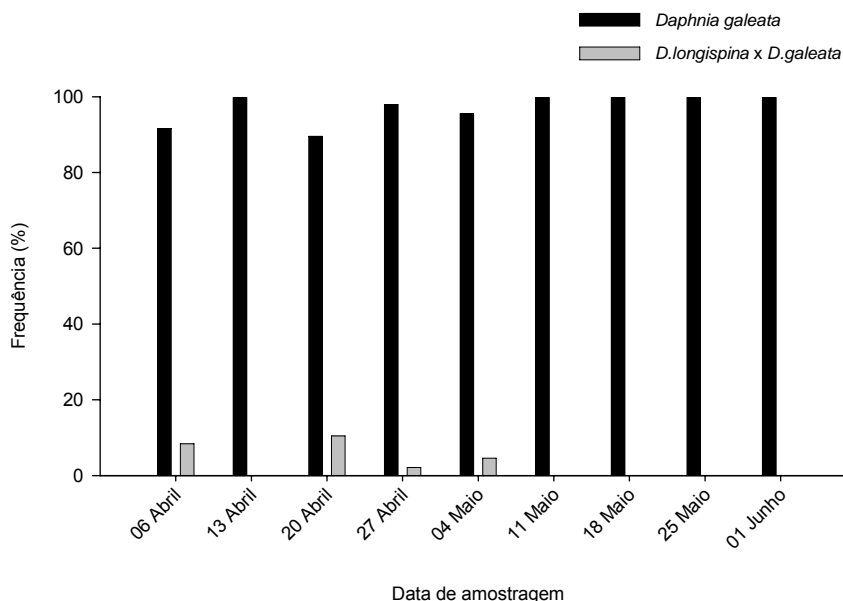


Figura 7. Variação da frequência dos taxa presentes (*Daphnia galeata* e *Daphnia longispina x galeata*) na lagoa da Vela, ao longo do período de estudo.

A diferenciação genética foi essencialmente baseada nos padrões de restrição da dupla digestão com *Eco52I* e *MbI*, na medida que a fiabilidade do padrão de restrição de *HpyF10VI* tem sido posta em causa (ver discussão). Contudo, no presente trabalho, registou-se relativa concordância entre o diagnóstico efectuado com um e com outro padrão de restrição (incluindo em *D. longispina x D. galeata*). Ainda assim, verificaram-se alguns exemplos de “falsos híbridos” e “falsas *D. longispina*” (ver exemplo na Figura 8), mas numa proporção inferior a 10%.

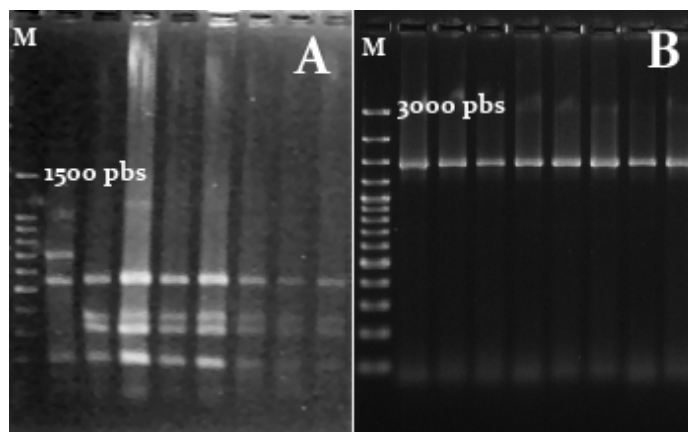


Figura 8. Padrões de restrição da região ITS dos mesmos oito indivíduos: A – corte com *HpyF10VI*, revelando um padrão coincidente com *D. galeata*, excepto na primeira amostra (à esquerda – “falsa *D. longispina*”); B – corte com dupla digestão *Eco52I / MbI*, que revela padrões de *Daphnia galeata* na totalidade das

amostras. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de bandas de um marcador de peso molecular comercial (100 pbs) – 1500, 1000-100 pbs (A) e 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900-100 pbs (B).

Discussão

A variação dos factores bióticos e abióticos do ambiente da lagoa da Vela tem sido alvo de alguns estudos, nomeadamente na dinâmica sazonal da comunidade zooplanctónica e na ecologia deste sistema aquático (e.g., Antunes *et al.* 2003; Castro & Goncalves 2007). Este trabalho vem confirmar o avançado estado no processo de eutroficação da lagoa da Vela, devido aos elevados níveis de nutrientes presentes, tais como o fósforo e o azoto, e à elevada actividade fotossintética. A dinâmica físico-química da lagoa da Vela apresenta um padrão temporal semelhante ao verificado anteriormente por outros estudos, durante o mesmo período de transição ambiental (Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006a; Abrantes *et al.* 2006b; Castro & Goncalves 2007).

Os estudos efectuados até ao momento demonstram que a clorofila *a*, a transparência e a abundância da população *Daphnia* encontram-se fortemente relacionadas, encontrando-se o padrão sazonal do zooplâncton claramente associado com o nível da água, a concentração de partículas suspensas na coluna de água (seston) e a transparência, mas também com a pressão predatória por peixes (Castro & Goncalves 2007). Apesar da sua baixa diversidade, a comunidade zooplanctónica deste lago polimíctico é bastante abundante (Antunes *et al.* 2003). No presente trabalho, a abundância populacional de *Daphnia* aumentou rapidamente no início do período de amostragem (início da Primavera), ao mesmo tempo que os níveis de clorofila *a* diminuíram bastante. Esta supressão no crescimento primário levou a uma maior transparência da água (Luecke *et al.* 1990), designada por fase de água transparente. Esta transparência está principalmente dependente da redução do seston, o qual está, por sua vez, dependente do nível da água (Castro & Goncalves 2007) e da redução do fitoplâncton pelo zooplâncton herbívoro

(Luecke *et al.* 1990; Tessier *et al.* 1992; Castro & Goncalves 2007). Os picos primaveris de fitoplâncton são induzidos por factores externos, tais como o aumento da concentração de nutrientes, de temperatura e dos níveis de luz (fotoperíodo) (Mccauley & Murdoch 1987). Na Primavera, há um aumento das espécies de zooplanctontes presentes, até ao Verão, principalmente de dafnídeos, que dominam com elevada abundância. A combinação de temperaturas da água mais amenas e elevada qualidade de alimento disponível permitem às populações de dafnídeos expandir-se rapidamente (Luecke *et al.* 1990). A capacidade de *Daphnia* de reduzir a comunidade fitoplanctónica a níveis baixos, demonstra bem a sua elevada capacidade de filtração e a sua importante posição na cadeia trófica, sendo controladores *top-down* dos produtores primários (Scheffer 1998). A capacidade dos dafnídeos de tamanho corporal mais elevado em reduzir o fitoplâncton presente em lagos eutróficos, parece permitir a manipulação na cadeia alimentar como uma ferramenta de gestão viável para melhorar a claridade da água durante o Verão, nos lagos eutróficos (Luecke *et al.* 1990).

A dinâmica populacional de *Daphnia*, e as consequências directas da sua herbivoria na qualidade da água, reiteram a importância do estudo desta população, na lagoa da Vela, durante o período de transição Primavera-Verão. O facto de *Daphnia* ser um competidor por recursos muito eficiente, interferindo na quantidade de biomassa algal disponível e na densidade populacional de outros organismos presentes, faz deste grupo de organismos um importante objecto de estudo (Scheffer 1998). Um estudo mais aprofundado de *Daphnia* durante a transição primaveril, na qual ocorrem flutuações desta população (Scheffer 1998), permite um maior conhecimento da sua interacção com outras populações de organismos, incluindo predadores (peixes) e recursos alimentares (fitoplâncton).

Quantidade e qualidade dos recursos alimentares

Na natureza, as populações de cladóceros experimentam grandes flutuações na disponibilidade de alimento, tanto devido a alterações temporárias na produtividade dos lagos como na dinâmica populacional dos próprios consumidores (Perrin *et al.* 1992). A sucessão sazonal de fitoplâncton e a intensa pressão dos herbívoros podem conduzir à limitação de alimento, e mesmo à morte dos zooplanctontes (Elendt 1989). A disponibilidade de recursos

alimentares e a predação são os principais factores que controlam a estrutura da população de *D. longispina* (Reede 1997; Hulsmann & Voigt 2002), sendo a morte por falta de alimento mais observada nos estados juvenis (Hulsmann & Voigt 2002). A ocorrência de densidades populacionais tão elevadas de *Daphnia* como as registadas no início deste estudo podem ser resultado da fraca existência de predação sobre estes organismos e à grande abundância de recursos alimentares disponíveis. Neste estudo, o pico de densidade mais elevado de *Daphnia* coincidiu com o valor mínimo de clorofila *a* presente na lagoa, o que por sua vez coincidiu com o nível de transparência mais elevado. Isto pode ser explicado pela forte herbivoria de *Daphnia* sobre o fitoplâncton, cuja redução de abundância leva a uma maior transparência da água, conforme discutido em cima. Após este máximo de densidade registou-se um declínio na abundância de *Daphnia* que pode ser devido à diminuição do alimento disponível (período de 4 de Maio a 25 de Maio). Contudo, uma redução da qualidade de alimento devido à presença de um elevado número de cianobactérias nocivas para os cladóceros poderá ser também uma hipótese explicativa desta redução abrupta da densidade de *Daphnia* (vide Abrantes *et al.* 2006a). A densidade dos dafnídeos depois recupera (25 de Maio), mas sofre novo colapso (Junho), do qual não recupera. Neste último período, o alimento não aparenta ser limitante na quantidade (elevado teor na clorofila *a*), ganhando mais força a hipótese da diminuição da quantidade do seston. Todavia, este período é também caracterizado por uma forte pressão predatória por parte dos peixes (ver em baixo) pelo que o declínio populacional de *Daphnia* não pode ser explicado por qualquer um destes factores isoladamente.

Ao longo deste estudo, verificou-se um reduzido número de fêmeas ovígeras tal como um baixo número de ovos em cada ninhada, a par do declínio da população e da diminuição do tamanho corporal médio (ver abaixo). A prioridade dos indivíduos, em condições de falta de alimento (em quantidade ou qualidade), é a sobrevivência, de modo que o primeiro compartimento energético a ficar comprometido é a reprodução, o que constitui um mecanismo muito importante na dinâmica de *Daphnia* (Lampert *et al.* 1986; Sommer *et al.* 1986; Hulsmann & Voigt 2002). À medida que diminui o investimento energético na reprodução, diminui a fecundidade. Além disso, a redução do tamanho corporal médio das fêmeas ovígeras leva a uma consequente diminuição do tamanho da

câmara de incubação, diminuindo assim o número de ovos que podem aí ser produzidos.

Vários estudos demonstraram a influência da reduzida quantidade e qualidade de alimento no declínio populacional de *Daphnia* (Lampert *et al.* 1986; Luecke *et al.* 1990; Ringelberg *et al.* 2004; Seidendorf *et al.* 2007). O processo de eutroficação altera a quantidade e qualidade de alimento disponível e a restrição alimentar limita o crescimento e a fecundidade de *Daphnia* (Gliwicz & Boavida 1996; Silva 1999), pois a produção de ovos depende da concentração de alimento (Lampert *et al.* 1986). O pico de densidade máxima de *Daphnia* observado a 4 de Maio, seguido de uma abrupta diminuição a 18 de Maio e um novo aumento a 25 de Maio demonstra uma flutuação irregular dessa população provavelmente devido à influência das oscilações do fitoplâncton. Dado que os valores de clorofila *a* permanecem elevados durante todo o período de amostragem (mesmo os valores mais baixos de clorofila *a* são valores característicos de sistemas eutróficos), estas oscilações irregulares podem ser principalmente explicadas pela má qualidade de alimento disponível, durante esse período de amostragem. Da eutroficação resultam adições progressivas de compostos azotados e fosfatados nas bacias de drenagem, que conduzem a problemas tais como florescências de bactérias, diminuição da transparência, desoxigenação e desaparecimento de vegetação aquática submersa (Silva 1999). O actual estudo está concordante com o anteriormente efectuado por Silva (1999), na lagoa das Braças (Figueira da Foz, Portugal), o qual também verifica uma diminuição da densidade de dafnídeos devido à ocorrência de florescências de cianobactérias. Em Portugal, registam-se sazonalmente “blooms” de cianobactérias desde Abril até ao final de Novembro, não sendo a lagoa da Vela uma excepção (Silva 1999; Antunes *et al.* 2003; Abrantes *et al.* 2006a). A redução da fecundidade (globalmente baixa durante todo o estudo – ver parágrafo anterior) é outro factor que pode ser explicado pela diminuição da qualidade de alimento disponível, pois não foi encontrada qualquer relação significativa entre a fecundidade e a disponibilidade alimentar (clorofila *a*) ou a densidade populacional. Tal como no estudo efectuado por Silva (1999), a fecundidade das fêmeas apresentou valores consistentemente decrescentes, ao longo das semanas de estudo, sendo este decréscimo populacional possivelmente explicado por *stress* alimentar (Glazier & Calow 1992). Uma vez

mais, o advento da pressão predatória pelos peixes planctívoros deve também aqui ser tido em conta (ver parágrafos seguintes).

Pressão predatória

De acordo com o modelo PEG (Sommer *et al.* 1986), a predação por peixes acelera o declínio das populações de herbívoros fitoplanctónicos até níveis muito baixos e esta tendência é acompanhada por uma alteração para indivíduos de tamanho corporal médio inferior entre os crustáceos sobreviventes. Neste trabalho, verificou-se que os dafnídeos apresentaram um tamanho corporal mais reduzido nas semanas finais de amostragem relativamente ao que apresentavam no início da amostragem, o que foi mais notado no tamanho corporal máximo e no tamanho das primíparas (tamanho à maturação). No final do período de amostragem, *Daphnia* exibia reduzidos tamanho corporal e tamanho à maturidade, o que é concordante com a predação selectiva de tamanho por peixes (Luecke *et al.* 1990; Tessier *et al.* 1992; Gliwicz 1994; Caramujo *et al.* 1997; Hulsmann & Voigt 2002; Antunes *et al.* 2003; Castro & Goncalves 2007), visto estes seleccionarem visualmente as suas presas, escolhendo primeiramente as de maiores dimensões (Tessier *et al.* 1992). A grande diferença de tamanho corporal médio observado entre a primeira semana (1,07 mm) e a última semana (0,72 mm) de amostragem, juntamente com um decréscimo linear (monotónico) do tamanho corporal ao longo das semanas de estudo, são uma forte evidência de que a predação por peixes influenciou a população de *Daphnia*. O decréscimo progressivo evidente do tamanho à maturidade é uma resposta adaptativa típica dos indivíduos *Daphnia* na evitação dos predadores planctívoros (Luecke *et al.* 1990; Boersma *et al.* 1996; Carpenter *et al.* 2001; Pijanowska *et al.* 2007). Estes predadores podem estruturar directamente as populações de zooplâncton através de predação selectiva de tamanho, com os peixes usualmente a preferirem os indivíduos de maior tamanho, e uma variedade de predadores invertebrados a seleccionarem indivíduos de tamanho mais pequeno. O aumento da temperatura ambiente, no início do Verão, resulta num maior consumo de zooplâncton por peixes planctívoros (Luecke *et al.* 1990), havendo um controlo *top-down* dos peixes sobre os cladóceros. Alguns estudos demonstraram que cladóceros de tamanho mais reduzido (e.g., *Bosmina*, *Chydoridae*, *Ceriodaphnia*) aumentaram em abundância durante o período no qual *Daphnia galeata* se encontrava

regulada por predação por peixes (Luecke *et al.* 1990). No entanto, o desaparecimento dos indivíduos de maiores dimensões pode também dever-se à interferência mecânica de cianobactérias coloniais, que causam a morte aos dafnídeos (Gliwicz & Boavida 1996).

A predação afecta tanto o tamanho da população como a sua estrutura etária: adultos e especialmente fêmeas ovígeras são mais vulneráveis aos predadores que os indivíduos juvenis (Ringelberg *et al.* 2004). A diferença de tamanho à maturação dos dafnídeos na primeira (1,2 mm) e na última semana (0,8 mm) de amostragem apresenta uma discrepância muito elevada, fazendo com que quase não ocorra sobreposição nas classes de tamanho das fêmeas ovígeras. Vários artigos demonstram que as mesmas espécies de *Daphnia*, em lagos com muitos peixes planctívoros, tornam-se sexualmente maduras a tamanhos corporais inferiores do que em lagos com poucos peixes (Ringelberg *et al.* 2004). Num único lago podem ocorrer variações sazonais, onde no Verão, quando os peixes se encontram especialmente activos, *Daphnia* torna-se sexualmente madura a um tamanho mais reduzido (Lampert & Sommer 1997). Os cladóceros exibem várias estratégias populacionais as quais consideram-se ser respostas a fortes pressões predatórias impostas por predadores, e a predação actua como um potencial mecanismo que influencia a evolução da sua dinâmica populacional (Weber & Declerck 1997). Recentemente, descobriu-se que os organismos reagem a substâncias químicas dissolvidas na água, libertadas por potenciais predadores (Spaak 1997; Weber & Declerck 1997; Ringelberg *et al.* 2004; Pijanowska *et al.* 2007; Seda *et al.* 2007). Um único clone de *Daphnia longispina* pode adoptar diferentes estratégias fenotípicas em resposta a estímulos químicos de um predador em particular (Lampert & Sommer 1997; Stibor & Lampert 2000). Vários estudos têm mostrado de forma convincente que a predação tem um impacto significativo nas comunidades de água doce em geral (Gliwicz & Pijanowska 1989; Carpenter & Kitchell 1993) e também na composição genética de espécies de *Daphnia* (Pijanowska *et al.* 1993; Demeester *et al.* 1995). Assim espera-se que a população de *Daphnia* apresente uma adaptação local, relativamente à pressão predatória no seu *habitat* (Parejko & Dodson 1991; Boersma *et al.* 1999).

A importância de peixes planctívoros é bem visível quando se comparam ambientes com e sem pressão predatória. Na lagoa da Vela, tal como noutros

sistemas aquáticos semelhantes, tem sido observada com regularidade a ocorrência de morte em massa de peixes (Antunes *et al.* 2003), permitindo a ocorrência de picos de densidade de *Daphnia* em períodos em que normalmente esta não ocorreria. Observações feitas por Luecke *et al.* (1990) fornecem evidências de que a abundância de peixes planctívoros determina quais as espécies de cladóceros abundantes mas não regula necessariamente a dinâmica populacional dessas espécies. Os peixes não controlam apenas quantitativamente as populações de presas, mas podem também alterar tanto a diversidade como a estrutura demográfica (como também a morfologia e o comportamento) (Pijanowska *et al.* 2007). Por outro lado, a quantidade e qualidade do seston desempenham um papel importante na dinâmica populacional (ver acima). Os três factores em conjunto (predação, qualidade e quantidade do seston) determinam a ocorrência e flutuações globais da dinâmica populacional de *Daphnia* nos sistemas lacustres. Para compreender a influência de cada factor, é necessário manipular cada um isoladamente, o que só é conseguido através de simulações experimentais em ambiente laboratorial ou semi-controlado (“enclosures”).

Diferenciação genética de *Daphnia* spp.

As evidências observadas na diferença de tamanhos dos indivíduos *Daphnia* fortaleceram a hipótese da ocorrência de uma sucessão ecológica durante o período de transição Primavera-Verão, sendo um determinado *taxon* substituído por outro, dentro do complexo de espécies *D. longispina*. A força motriz desta sucessão ou substituição seria o *stress* ambiental (condições flutuantes na disponibilidade de recursos e aumento progressivo da predação). Vários estudos mostram que em organismos aquáticos (especialmente em espécies de *Daphnia*) existem diferenças na estrutura genética entre *habitats* (e.g., Hebert 1978; Boersma *et al.* 1999). A aplicação de marcadores genéticos nucleares (região ITS) permitiu a identificação de espécies e híbridos interespecíficos do grupo *Hyalodaphnia*, taxonomicamente difícil de identificar (Billiones *et al.* 2004; Skage *et al.* 2007). A ocorrência de reprodução sexuada induz um aumento da variabilidade genética, devido ao processo meiótico que aí ocorre. Portanto, colocou-se a hipótese da população de *Daphnia longispina* da lagoa da Vela apresentar uma variabilidade genotípica muito elevada entre os

indivíduos. Essa variabilidade poderia ser alterada por influência do processo de selecção natural, durante as alterações ambientais que ocorrem no período em estudo. Contudo, os estudos moleculares efectuados demonstraram a presença quase exclusiva de apenas uma espécie durante todo o período de amostragem, independentemente da evolução dos factores abióticos e bióticos (incluindo a predação): *D. galeata*. Estudos realizados anteriormente, verificaram igualmente a presença de apenas *D. galeata*, na lagoa em estudo, mas essa amostragem havia sido meramente pontual. Estas evidências põem de parte a hipótese de uma sucessão de diferentes espécies. Porém, apesar de se encontrar presente apenas uma espécie sem que ocorram trocas genéticas entre *taxa*, é possível que ocorra uma variabilidade genotípica dentro do mesmo *taxon*, que será modelada pela selecção natural.

Ao existir mais do que uma espécie de *Daphnia* no mesmo *habitat*, é possível a ocorrência de fluxo genético, com a produção de híbridos interespecíficos, retrocruzamentos e híbridos F2 (Billiones *et al.* 2004), sobretudo entre *D. galeata* e *D. longispina* (Klaus Schwenk, comunicação pessoal). No entanto, a existência de apenas uma espécie num *habitat*, reflecte uma população estanque, sem variação genética que se reproduz essencialmente por partenogénese e que se encontra bem adaptada ao ambiente em que habita. O facto de existir apenas uma espécie presente pode dever-se a uma elevada plasticidade fenotípica da mesma, havendo uma redução de tamanho dos indivíduos, ou então a uma frequência de diferentes genótipos, os quais apresentam diferentes tamanhos médios e, portanto, uma maior ou menor adaptação ao ambiente em redor. Elementos da dinâmica populacional dos organismos determinam a capacidade de sobrevivência de cada indivíduo num determinado ambiente, podendo a plasticidade fenotípica fornecer grandes vantagens para um organismo que é afectado por regimes de flutuações predatórias durante o seu ciclo de vida (Weber & Declerck 1997). Uma selecção de direcção constante leva a uma variância genética baixa para traços de sobrevivência associados (Weber & Declerck 1997). A plasticidade fenotípica é um componente fundamental na alteração evolucionária (Weber & Declerck 1997), levando a uma aceleração da evolução (Behera & Nanjundiah 2004).

O protocolo desenvolvido por Skage *et al.* (2007) permitiu resolver algumas lacunas presentes no protocolo de Billiones *et al.* (2004). A diferenciação genética

do presente trabalho foi baseada sobretudo nos padrões de restrição da dupla digestão com *Eco52I* e *MbI*, devido a alguns erros que o padrão de restrição de *HpyF10VI* (= *Mwo* I) poderia conduzir (Skage *et al.* 2007). Usando o protocolo de Skage *et al.* (2007), foi possível verificar a existência de híbridos interespecíficos na população em estudo, sem a incorrecta interpretação de “falsos híbridos” e “falsas *D. longispina*”. No entanto, efectuando cortes de restrição com a enzima *HpyF10VI*, foram registados cerca de 5% de “falsos *D. longispina*” e cerca de 5% de “falsos híbridos”. Isto ocorre devido a um único ponto de mutação que pode causar padrões RFLP com *HpyF10VI* inesperados em *D. galeata*, e esta mutação pode manifestar-se em dois padrões de restrição, dependendo da variação intragenómica nas cópias ITS (Skage *et al.* 2007). Os locais de mutação variam em tamanho entre diferentes populações de *Daphnia longispina* (Skage *et al.* 2007), ocorrendo por vezes grandes diferenças na identificação de espécies com as diferentes enzimas de restrição ou, por vezes, não havendo uma diferença muito significativa. Os “falsos híbridos” resultantes da digestão de *HpyF10VI* apresentaram bandas padrão tanto de *D. longispina* como bandas padrão de *D. galeata*, mas vieram a revelar-se como sendo *D. galeata* pelo padrão de restrição da dupla digestão com *Eco52I* e *MbI*.

A existência de híbridos entre as populações de *D. longispina* e *D. galeata* é um fenómeno de elevada importância porque as espécies parentais encontram-se menos relacionadas do que outras espécies, que se sabe que hibridizam com o complexo (Hobaek *et al.* 2004). As suas linhagens diferem em cerca de 15% no ADNmt (Schwenk *et al.* 2001), o que leva a que não seja usual a produção de híbridos viáveis em tais genomas divergentes (Hobaek *et al.* 2004); no entanto, acabam também por ocorrer híbridos viáveis de *D. longispina* x *D. galeata*. As características morfológicas do híbridos *D. longispina* x *D. galeata* caracterizam-se por traços intermédios entre as espécies parentais, tal como tem sido observado noutros híbridos do complexo (Schwenk 1993; Hobaek *et al.* 2004). Contudo, essas diferenças morfológicas muitas vezes são quase indistintas e são moldadas consoante os diferentes factores ambientais entre os *habitats*, tais como a predação ou a qualidade de alimento, ocorrendo variação espacial entre híbridos e espécies (Schwenk *et al.* 1995). A identificação morfológica de híbridos torna-se muito difícil devido aos inúmeros potenciais genes recombinantes existentes entre as espécies parentais e os híbridos interespecíficos que tornam

impossível estabelecer um número suficiente de características morfológicas específicas de espécies para diferenciar todos os *taxa* (Giessler 1997; Schwenk *et al.* 2001). Uma vez mais se reitera a importância do recurso a ferramentas moleculares como elemento de diagnóstico essencial na redução das incertezas associadas à distinção da identidade taxonómica das populações de *Daphnia* spp..

Sub-estrutura populacional

A ocorrência de diferentes genótipos numa mesma população pode permitir uma resposta diferente de cada um deles a diferentes factores, nomeadamente à falta de alimento (Ringelberg *et al.* 2004; Haag *et al.* 2005). Uma população de *Daphnia* é um complexo de muitos conjuntos de clones em constante alteração com diferentes características comportamentais e dinâmicas populacionais (Ringelberg *et al.* 2004). Spaak (1997), num estudo em populações de *Daphnia* de vários lagos, sugeriu que processos como diferenças na reprodução sexual, selecção e populações de híbridos de diferentes idades, têm um papel mais importante em causar distinção genética entre populações, do que a ocorrência de retrocruzamentos. Estudos efectuados por Boersma (1999) demonstraram que as diferenças genéticas entre populações de *Daphnia* não foram mediadas através de uma resposta aos sinais químicos dos peixes, mas sim através de um tamanho médio mais reduzido, ovos mais pequenos e um elevado número de ovos nos clones provenientes de *habitats* onde os peixes se encontravam presentes (adaptação local). A população de *Daphnia* é um complexo em constante alteração de vários grupos de clones com diferentes características comportamentais e dinâmica populacional (Ringelberg *et al.* 2004). DeMeester (1996a), num estudo com populações de *Daphnia* de diferentes *habitats*, verificou que apesar de, no geral, as populações apresentarem diferenças nas respostas comportamentais, indicando uma adaptação local, produziam clones que apresentavam comportamentos muito diferentes. Esta variabilidade sub-específica pode permitir a adaptação da população a novas condições ambientais, caso isso ocorra.

Há várias ferramentas que podem ser utilizadas para determinar a sub-estrutura populacional de diferentes populações de *Daphnia*, tais como marcadores nucleares de ADN: microsátélites, alozimas e RAPD (“Random

Amplified Polymorphic DNA”) (Schwenk *et al.* 1995; Billiones *et al.* 2004; Brede *et al.* 2006). Neste trabalho tentou-se também desenvolver e otimizar uma ferramenta molecular para a discriminação de variação genética nuclear dentro da mesma espécie na medida em que a quase totalidade dos exemplares capturados durante o período de estudo representavam a mesma espécie: *D. galeata*. Um ou vários marcadores genéticos sub-específicos poderiam ajudar a clarificar a hipótese de que, durante o período de transição ambiental amostrado, poderia haver uma substituição ou sucessão de clones de *D. galeata* com características distintas. Pretendia-se que o marcador genético escolhido fosse de rápida execução e permitisse obter uma elevada variabilidade entre indivíduos. Adicionalmente, era também um critério importante o custo associado às análises moleculares necessárias, na medida em que um custo elevado poderia comprometer a sua utilização disseminada em estudos de dinâmica populacional. Assim, a escolha recaiu sobre um método baseado na técnica de PCR (sem recurso a enzimas de restrição ou a sequenciação), cujos resultados preliminares aqui se apresentam apenas a título de exemplo, já que há ainda uma grande necessidade de optimização.

Efectuou-se uma técnica de MSP-PCR (“microsatellite-primed polymerase chain reaction”), a qual utiliza *primers* únicos de modo a distinguir cadeias repetidas de ADN de diferentes indivíduos por *fingerprinting* (Alves *et al.* 2007). Esta técnica, a qual analisa todo o genoma, têm demonstrado ser relativamente robusta e discriminatória noutros *taxa* (Alves *et al.* 2007) e baseia-se na amplificação por PCR de sequências de ADN que possuem a mesma sequência que o microsatélite utilizado. Os micro-satélites (repetições *tandem* de 1-5 pares de bases) são componentes ubíquos de genomas eucarióticos (Alves *et al.* 2007). Um dos *primers* utilizados para efeito [(GTGC)₄] proporcionou padrões potencialmente interessantes na distinção entre *taxa* e entre genótipos dentro do mesmo *taxon* (ver Figura 9).

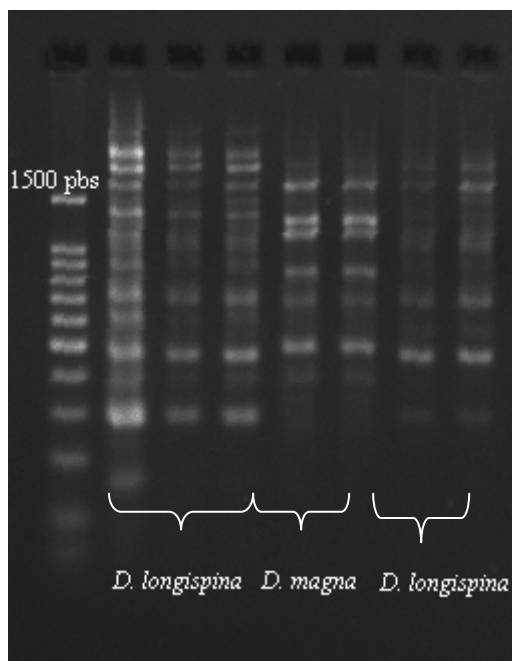


Figura 9. Exemplos de padrões de *fingerprinting* obtidos com o *primer* (GTGC)₄. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de bandas de um marcador de peso molecular comercial (100 pbs) – 1500, 1000-100 pbs. Os três padrões à esquerda e os dois últimos à direita correspondem aos padrões de bandas de dois genótipos distintos de *D. longispina*, enquanto que os dois do meio correspondem a um padrão de bandas do mesmo clone de *D. magna*.

MSP-PCR *fingerprinting* é uma alternativa simples e fácil à sequenciação e que pode ser extremamente útil quando se estuda um vasto conjunto de isolados ou genótipos (Alves *et al.* 2007). Fica em aberto a sua utilização em populações de *Daphnia*, na medida em que ainda requer optimização posterior do número mínimo de marcadores necessários para distinguir genótipos (“*multiple-locus genotypes*”) com alguma certeza, assim como requer ainda afinações na fiabilidade e repetibilidade da técnica. Fica assim por esclarecer se a população de *D. galeata* da lagoa da Vela sujeita a oscilações ambientais é constituída por um ou vários genótipos e se a proporção relativa destes se altera ao longo de um período de transição ambiental. Esta deverá ser a aposta nos estudos futuros, assim que se consiga ter a técnica de MSP-PCR a funcionar em pleno, algo que o tempo limitado para a execução da presente tese não permitiu concluir.

Bibliografia

- Abrantes N, Antunes SC, Pereira MJ & Goncalves F (2006a). Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **29**(1): 54-64.
- Abrantes N, Pereira R & Goncalves F (2006b). First step for an ecological risk assessment to evaluate the impact of diffuse pollution in Lake Vela (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment* **117**(1-3): 411-431.
- Alonso M (1996). Fauna Iberica. Crustacea Branchiopoda. Madrid, Mus. Nac. Cien. Natur. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas.
- Alves A, Phillips AJL, Henriques I & Correia A (2007). Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* **158**: 112-121.
- Antunes SC, Abrantes N & Goncalves F (2003). Seasonal variation of the abiotic parameters and the cladoceran assemblage of Lake Vela: comparison with previous studies. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* **39**(3): 255-264.
- APHA, AWWA & WPCF (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington DC, USA, American Public Health Association.
- Behera N & Nanjundiah V (2004). Phenotypic plasticity can potentiate rapid evolutionary change. *Journal of Theoretical Biology* **226**(2): 177-184.
- Billiones R, Brehm M, Klee J & Schwenk K (2004). Genetic identification of *Hyalodaphnia* species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* **526**(1): 43-53.
- Boersma M, De Meester L & Spaak P (1999). Environmental stress and local adaptation in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* **44**(2): 393-402.
- Boersma M, vanTongeren OFR & Mooij WM (1996). Seasonal patterns in the mortality of *Daphnia* species in a shallow lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**(1): 18-28.
- Brede N, Thielsch A, Sandrock C, Spaak P, Keller B, Streit B & Schwenk K (2006). Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* **6**(2): 536-539.

- Caramujo M-J & Boavida MJ (2000). Dynamics of *Daphnia hyalina* x *galeata* in Castelo do Bode Reservoir: The effect of food availability and flatworm predation. *Aquatic Ecology* **34**: 155-163.
- Caramujo MJ, Crispim MC & Boavida MJ (1997). Assessment of the importance of fish predation versus copepod predation on life history traits of *Daphnia hyalina*. *Hydrobiologia* **360**: 243-252.
- Carpenter SR (2005). Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(29): 10002-10005.
- Carpenter SR, Christensen DL, Cole JJ, Cottingham KL, He X, Hodgson JR, Kitchell JF, Knight SE, Pace ML, Post DM, Schindler DE & Voichick N (1995). Biological-Control of Eutrophication in Lakes. *Environmental Science & Technology* **29**(3): 784-786.
- Carpenter SR, Cole JJ, Hodgson JR, Kitchell JF, Pace ML, Bade D, Cottingham KL, Essington TE, Houser JN & Schindler DE (2001). Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: whole-lake experiments. *Ecological Monographs* **71**(2): 163-186.
- Carpenter SR & Kitchell JF (1993). The trophic cascade in lakes, Cambridge Univ. Press.
- Castro BB (2007). Ecologia e seleção de habitat em crustáceos zooplanctónicos de lagos pouco profundos. p. 168, Aveiro: Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.
- Castro BB, Consciencia S & Goncalves F (2007). Life history responses of *Daphnia longispina* to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) and pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) kairomones. *Hydrobiologia* **594**: 165-174.
- Castro BB & Goncalves F (2007). Seasonal dynamics of the crustacean zooplankton of a shallow eutrophic lake from the Mediterranean region. *Fundamental and Applied Limnology* **169**(3): 189-202.
- De Meester L, Vanoverbeke J, De Gelas K, Ortells R & Spaak P (2006). Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations - a conceptual framework. *Archiv Fur Hydrobiologie* **167**(1-4): 217-244.
- DeMeester L (1996a). Evolutionary potential and local genetic differentiation in a phenotypically plastic trait of a cyclical parthenogen, *Daphnia magna*. *Evolution* **50**(3): 1293-1298.

- DeMeester L (1996b). Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes. *Ecoscience* **3**(4): 385-399.
- Demeester L, Weider LJ & Tollrian R (1995). Alternative Antipredator Defenses and Genetic-Polymorphism in a Pelagic Predator-Prey System. *Nature* **378**(6556): 483-485.
- Elendt BP (1989). Effects of Starvation on Growth, Reproduction, Survival and Biochemical-Composition of *Daphnia-Magna*. *Archiv Fur Hydrobiologie* **116**(4): 415-433.
- Giessler S (1997). Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology* **10**(1): 87-105.
- Giessler S (2001). Morphological differentiation within the *Daphnia longispina* group. *Hydrobiologia* **442**(1-3): 55-66.
- Giessler S, Mader E & Schwenk K (1999). Morphological evolution and genetic differentiation in *Daphnia* species complexes. *Journal of Evolutionary Biology* **12**(4): 710-723.
- Glazier DS & Calow P (1992). Energy Allocation Rules in *Daphnia-Magna* - Clonal and Age-Differences in the Effects of Food Limitation. *Oecologia* **90**(4): 540-549.
- Gliwicz ZM (1994). Relative Significance of Direct and Indirect Effects of Predation by Planktivorous Fish on Zooplankton. *Hydrobiologia* **272**(1-3): 201-210.
- Gliwicz ZM & Boavida MJ (1996). Clutch size and body size at first reproduction in *Daphnia pulicaria* at different levels of food and predation. *Journal of Plankton Research* **18**(6): 863-880.
- Gliwicz ZM & Pijanowska J (1989). The role of predation in zooplankton succession. In U. Sommer (ed.), *Plankton ecology: Succession in plankton communities*. Heidelberg: 253-296.
- Haag CR, Riek M, Hottinger JW, Pajunen VI & Ebert D (2005). Genetic diversity and genetic differentiation in *Daphnia* metapopulations with subpopulations of known age. *Genetics* **170**(4): 1809-1820.
- Hebert PDN (1978). Population Biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **53**(3): 387-426.

- Hewitt G (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**(6789): 907-913.
- Hobaek A, Skage M & Schwenk K (2004). *Daphnia galeata* x *D-longispina* hybrids in western Norway. *Hydrobiologia* **526**(1): 55-62.
- Hulsmann S (2003). Recruitment patterns of *Daphnia*: a key for understanding midsummer declines? *Hydrobiologia* **491**(1-3): 35-46.
- Hulsmann S & Voigt H (2002). Life history of *Daphnia galeata* in a hypertrophic reservoir and consequences of non-consumptive mortality for the initiation of a midsummer decline. *Freshwater Biology* **47**(12): 2313-2324.
- Jankowski T & Straile D (2004). Allochronic differentiation among *Daphnia* species, hybrids and backcrosses: the importance of sexual reproduction for population dynamics and genetic architecture. *Journal of Evolutionary Biology* **17**(2): 312-321.
- Keller B & Spaak P (2004). Nonrandom sexual reproduction and diapausing egg production in a *Daphnia* hybrid species complex. *Limnology and Oceanography* **49**(4): 1393-1400.
- Keller B, Wolinska J, Tellenbach C & Spaak P (2007). Reproductive isolation keeps hybridizing *Daphnia* species distinct. *Limnology and Oceanography* **52**(3): 984-991.
- Lampert W, Fleckner W, Rai H & Taylor BE (1986). Phytoplankton Control by Grazing Zooplankton - a Study on the Spring Clear-Water Phase. *Limnology and Oceanography* **31**(3): 478-490.
- Lampert W & Sommer U (1997). *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. New York (USA), Oxford University Press.
- Lass S & Spaak P (2003). Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* **491**(1-3): 221-239.
- Luecke C, Vanni MJ, Magnuson JJ, Kitchell JF & Jacobson PT (1990). Seasonal Regulation of *Daphnia* Populations by Planktivorous Fish - Implications for the Spring Clear-Water Phase. *Limnology and Oceanography* **35**(8): 1718-1733.
- Mccauley E & Murdoch WW (1987). Cyclic and Stable-Populations - Plankton as Paradigm. *American Naturalist* **129**(1): 97-121.

- Moss B (1992). The scope for biomanipulation for improving water quality. Eutrophication: Research and Application to Water Supply. UK, Freshwater Biological Association.
- Pace ML (1984). Zooplankton Community Structure, but Not Biomass, Influences the Phosphorus Chlorophyll a Relationship. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **41**(7): 1089-1096.
- Parejko K & Dodson SI (1991). The Evolutionary Ecology of an Antipredator Reaction Norm - *Daphnia-Pulex* and *Chaoborus-Americanus*. *Evolution* **45**(7): 1665-1674.
- Pereira R, Soares AMVM, Ribeiro R & Goncalves F (2002). Assessing the trophic state of Linhos lake: a first step towards ecological rehabilitation. *Journal of Environmental Management* **64**(3): 285-297.
- Perrin N, Baird DJ & Calow P (1992). Resource-Allocation, Population-Dynamics and Fitness - Some Experiments with *Daphnia-Magna Straus*. *Archiv Fur Hydrobiologie* **123**(4): 431-449.
- Petrusek A, Bastiansen F & Schwenk K. (2005). European *Daphnia* Species (EDS) - Taxonomic and genetic keys. [Build 2006-01-12 beta]. CD-ROM, distributed by the authors. Department of Ecology and Evolution, J.W. Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany & Department of Ecology, Charles University, Prague, Czechia.
- Pijanowska J, Bernatowicz P & Fronk J (2007). Phenotypic plasticity within *Daphnia longispina* complex: Differences between parental and hybrid clones. *Polish Journal of Ecology* **55**(4): 761-769.
- Pijanowska J, Weider LJ & Lampert W (1993). Predator-Mediated Genotypic Shifts in a Prey Population - Experimental-Evidence. *Oecologia* **96**(1): 40-42.
- Quinn GP & Keough MJ (2002). Experimental design and data analysis for biologists, Commun. Biometry Crop Sci.
- Reede T (1997). Effects of neonate size and food concentration on the life history responses of a clone of the hybrid *Daphnia hyalina* x *galeata* to fish kairomones. *Freshwater Biology* **37**(2): 389-396.
- Ringelberg J, van Gool E & Brehm M (2004). Density and depth variations of *Daphnia multilocus* genotypes during a summer period in Lake Maarsseveen. *Aquatic Ecology* **38**(4): 525-535.

- Rodier J (1996). L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Paris, France, Dunod.
- Sarnelle O & Wilson AE (2005). Local adaptation of *Daphnia pulicaria* to toxic cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* **50**(5): 1565-1570.
- Scheffer M (1998). Ecology of shallow lakes. London, Chapman & Hall.
- Schwenk K (1993). Interspecific Hybridization in *Daphnia* - Distinction and Origin of Hybrid Matrilines. *Molecular Biology and Evolution* **10**(6): 1289-1302.
- Schwenk K, Anna Sand, Maarten Boersma, Michaela Brehm, Eva Mader, Doorle Offerhaus, Piet Spaak (1998). Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquatic Ecology* **32**: 37-51.
- Schwenk K, Bijl M & Menken SBJ (2001). Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia* **442**(1-3): 67-73.
- Schwenk K, Ender A & Streit B (1995). What Can Molecular Markers Tell Us About the Evolutionary History of *Daphnia* Species Complexes. *Hydrobiologia* **307**(1-3): 1-7.
- Schwenk K, Junttila P, Rautio M, Bastiansen F, Knapp A, Dove O, Billiones R & Streit B (2004). Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (Hyalodaphnia) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnology and Oceanography* **49**(2): 532-539.
- Schwenk K, Posada D & Hebert PDN (2000). Molecular systematics of European Hyalodaphnia: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**(1455): 1833-1842.
- Schwenk K & Spaak P (1995). Evolutionary and Ecological Consequences of Interspecific Hybridization in Cladocerans. *Experientia* **51**(5): 465-481.
- Seda J, Petrusek A, Machacek J & Smilauer P (2007). Spatial distribution of the *Daphnia longispina* species complex and other planktonic crustaceans in the heterogeneous environment of canyon-shaped reservoirs. *Journal of Plankton Research* **29**(7): 619-628.
- Seidendorf B, Boersma M & Schwenk K (2007). Evolutionary stoichiometry: The role of food quality for clonal differentiation and hybrid maintenance in a *Daphnia* species complex. *Limnology and Oceanography* **52**(1): 385-394.

- Silva PCLD (1999). Lagoa das Braças: um caso de estudo do processo de eutrofização. p. 83, Coimbra: Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.
- Skage M, Hobek A, Ruthova S, Keller B, Petrusek A, Sed'a JR & Spaak P (2007). Intra-specific rDNA-ITS restriction site variation and an improved protocol to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia* **594**: 19-32.
- Sommer U, Gliwicz ZM, Lampert W & Duncan A (1986). The Peg-Model of Seasonal Succession of Planktonic Events in Fresh Waters. *Archiv Fur Hydrobiologie* **106**(4): 433-471.
- Spaak P (1997). Hybridization in the *Daphnia galeata* complex: are hybrids locally produced? *Hydrobiologia* **360**: 127-133.
- Stibor H & Lampert W (2000). Components of additive variance in life-history traits of *Daphnia hyalina*: seasonal differences in the response to predator signals. *Oikos* **88**(1): 129-138.
- Tessier AJ, Young A & Leibold M (1992). Population-Dynamics and Body-Size Selection in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **37**(1): 1-13.
- Weber A & Declerck S (1997). Phenotypic plasticity of *Daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potential. *Hydrobiologia* **360**: 89-99.
- Wetzel RG & Likens GE (1983). *Limnology*. Philadelphia, USA, Saunders College Publishing.
- Wetzel RG & Likens GE (1991). *Limnological analyses*. New York. USA, Springer-Verlag.

Conclusão Geral

Conclusão Geral

A lagoa da Vela é um lago pouco profundo que se encontra num elevado estado eutrófico, o que influencia toda a sua fauna e flora. Uma das populações aquáticas mais afectadas por este processo pertence ao género *Daphnia*. Durante o período de estudo, a densidade destes dafnídeos mostrou-se fortemente relacionada com a quantidade de clorofila *a* presente, o nível de água e a quantidade de partículas suspensas na coluna de água. Verificou-se uma fase de água transparente, durante a transição primaveril devido à capacidade filtradora destes organismos em reduzir rapidamente o fitoplâncton presente para níveis reduzidos (Luecke *et al.* 1990).

A população de *Daphnia* efectua um controlo *top-down* nos produtores primários, afectando toda a cadeia trófica, no entanto, a estrutura da sua população é por sua vez controlada pela quantidade e qualidade de alimento disponível e pela intensidade de pressão predatória por peixes. Nenhum destes factores pode isoladamente explicar a flutuação da densidade de *Daphnia* observada durante esta transição Primavera-Verão. A redução na qualidade de alimento levou à redução do número de fêmeas ovígeras e da fecundidade, podendo também ser responsável por alguns colapsos nas densidades populacionais. O estado eutrófico da lagoa poderá ter influenciado a qualidade de alimento pois a concentração de clorofila *a* encontrava-se em grande abundância durante todo o período e não foi encontrada qualquer relação significativa entre a fecundidade e a disponibilidade alimentar (clorofila *a*) ou a densidade populacional.

A pressão predatória por peixes induz um controlo *top-down* bastante importante sobre a população de *Daphnia* (Sommer *et al.* 1986; Luecke *et al.* 1990). Isso foi verificado com a redução do tamanho corporal e do tamanho à maturidade, sendo esta diminuição mais evidente nos tamanhos máximos. O desaparecimento dos indivíduos de maiores dimensões deveu-se à predação visual dos peixes pelos dafnídeos de maior tamanho corporal assim como por uma possível interferência mecânica de cianobactérias coloniais. A elevada plasticidade fenotípica que *Daphnia* possui, permite-lhe minimizar a predação por

peixes, quando se encontra na sua presença. *Daphnia* apresenta uma adaptação local ao seu *habitat*, reduzindo o seu tamanho corporal e antecipando o tamanho à reprodução quando na presença de predadores.

Apesar da evidência de diferentes tamanhos corporais de *Daphnia* durante este estudo, a sucessão de espécies ao longo do período de transição primaveril não foi verificada, pois só se encontrou uma espécie presente maioritariamente: *Daphnia galeata*. Esta distinção foi efectuada utilizando técnicas moleculares com marcadores genéticos nucleares (ITS). O facto de se verificar a presença de apenas uma espécie demonstra a adaptação local da mesma ao seu *habitat*, apresentando uma plasticidade fenotípica muito acentuada, ou em alternativa, apresentando indivíduos muito distintos entre si geneticamente (variabilidade clonal). Este trabalho demonstra a importância de futuros estudos na sub-estrutura da população de *Daphnia* na lagoa da Vela, de forma a colmatar a falta de informação sobre a constituição genética dos indivíduos presentes. A utilização da técnica MSP-PCR *fingerprinting* poderá, após uma optimização da mesma, permitir um maior conhecimento sobre a sub-estrutura da população de dafnídeos na lagoa da Vela. Um estudo mais aprofundado permitirá obter mais informações sobre as oscilações e composição relativa dos genótipos presentes na população, incluindo a variação temporal nas frequências de genótipos ao longo de um período de transição ambiental como o que foi aqui estudado.

Bibliografia

- Alves A, Phillips AJL, Henriques I & Correia A (2007). Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* **158**: 112-121.
- Luecke C, Vanni MJ, Magnuson JJ, Kitchell JF & Jacobson PT (1990). Seasonal Regulation of Daphnia Populations by Planktivorous Fish - Implications for the Spring Clear-Water Phase. *Limnology and Oceanography* **35**(8): 1718-1733.
- Sommer U, Gliwicz ZM, Lampert W & Duncan A (1986). The Peg-Model of Seasonal Succession of Planktonic Events in Fresh Waters. *Archiv Fur Hydrobiologie* **106**(4): 433-471.