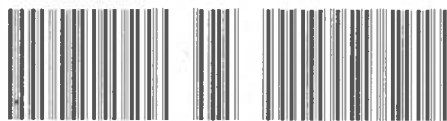


21 | 2003



REVISTA DE BIOLOGIA

PO ISSN 0034-7736

REVISTA DE BIOLOGIA

VOL. 21

2003

N.^{os} 1-4

Publicação do
Jardim Botânico
Museu Nacional de História Natural
Universidade de Lisboa
Rua da Escola Politécnica 58, 1250-102 Lisboa (Portugal)

REDACTORES

M. A. MARTINS-LOUÇÃO F. M. CATARINO IRENEIA MELO

Esta Revista tem revisão científica.

Título para citações bibliográficas: *Revista Biol. (Lisboa)*

Publicação do Jardim Botânico (M.N.H.N.), Universidade de Lisboa,
Rua da Escola Politécnica, 58, 1250-102 Lisboa, Portugal.

Capa: Rocha e Loução

Montagem e arranjo gráfico no Jardim Botânico por J. Cardoso, Setembro de 2003.

LISBOA

7º ENCONTRO NACIONAL DE ECOLOGIA

*Promovido pela
SPECO - Sociedade Portuguesa de Ecologia*

Lisboa, Novembro de 2002

Publicação financiada pela:

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DA TECNOLOGIA

POCTI - Programa Operacional "Ciência, Tecnologia, Inovação"

PREFÁCIO

O 7º Encontro Nacional de Ecologia, realizou-se em Novembro de 2002, na Universidade dos Açores em Ponta Delgada, dando continuidade ao objectivo de abranger um leque cada vez maior de cientistas e investigadores nacionais que se dedicam ao estudo da ecologia nas suas diversas vertentes.

O tema proposto “Da conservação à gestão dos ecossistemas” enfatiza a conservação em diferentes escalas, desde a protecção dos endemismos à gestão dos ecossistemas.

O presente volume da Revista de Biologia reúne alguns dos trabalhos que foram apresentados no âmbito do 7º ENE. Os artigos deste número são contribuições de todos os que tendo apresentado comunicação sob a forma oral ou de painel manifestaram interesse em ver publicado o seu trabalho. Os trabalhos submetidos foram objecto de revisão por investigadores nacionais que procederam a críticas e sugestões, valorizando esta publicação de distribuição nacional e internacional.

A SPECO agradece o interesse de todos os que contribuíram com os seus trabalhos, aos que se disponibilizaram a rever e a sugerir alterações aos manuscritos, aos responsáveis pela edição da Revista de Biologia, Profª Paula Sobral (SPECO), Drª Ireneia de Melo e Sr. José Cardoso e às entidades que nos apoiaram e assim tornaram possível esta publicação.

*A Direcção da
Sociedade Portuguesa de Ecologia*

Revisores do presente volume:

Cecília Sérgio	<i>Universidade de Lisboa</i>
Jorge Canhoto	<i>Universidade de Coimbra</i>
Otília Correia	<i>Universidade de Lisboa</i>
Conceição Santos	<i>Universidade de Aveiro</i>
Maria da Luz Mathias	<i>Universidade de Lisboa</i>
Helena Freitas	<i>Universidade de Coimbra</i>
José Paula	<i>Universidade de Lisboa</i>
Henrique Queiroga	<i>Universidade de Aveiro</i>
Helena Costa	<i>Universidade Nova de Lisboa</i>
João Carlos Marques	<i>Universidade de Coimbra</i>
Orlando Luís	<i>Universidade de Lisboa</i>
Paula Sobral	<i>Universidade Nova de Lisboa</i>
Luís Fonseca	<i>Universidade do Algarve</i>
Ana Maria Rodrigues	<i>Universidade de Aveiro</i>

ÍNDICE

Chá-Chá, R., Fernandes, F. & Romano, A. - Conservação de <i>Polystichum drepanum</i> (Sw.) C. Presl, pteridófito endémico da ilha da Madeira.	7
Gonçalves, S., Jesus, J. & Romano, A. - Produção <i>in vitro</i> de plantas de <i>Drosophyllum lusitanicum</i> com vista à sua conservação.	17
Almeida, R., Gonçalves, S., Romano, A. - Micropropagação de adelfeira. Contributos para a conservação e reprodução de uma espécie endémica da serra de Monchique.	29
Clavijo, A., Díaz Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Alvarez Cansino, L., Correia, O. & García Novo, F. - A conservação de <i>Corema album</i> no litoral atlântico da Península ibérica; a influência de dispersores animais na regeneração natural.	43
Carvalho, S., Marques, J. C., Banha, M. M. & Fonseca, L. C. - Macrobenthic crustacea of the Bay of S. Torpes (Portugal).	57
Costa, A. M., Cristo, M. & Cancela da Fonseca, L. - Annual cycle of the benthic community of a coastal lagoon: Lagoa de Melides (Grândola, SW Portugal).	71
Sardo, A. M., Azeiteiro, U. & Morgado, F. - Condições de aclimação de <i>Mesopodopsis slabberi</i> (van Beneden) (Crustacea: Mysidacea) num sistema semi-estático.	91
Pombo, L., Dias, C., Lopes, C. & Rebelo, J. E. - Fishes, cuttlefishes and the environmental status of the Ria de Aveiro estuarine lagoon (Portugal).	103

CONSERVAÇÃO DE *POLYSTICHUM DREPANUM* (SW.) C. PRESL, PTERIDÓFITO ENDÊMICO DA ILHA DA MADEIRA

R. Chá-Chá, F. Fernandes¹ & A. Romano

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

¹Jardim Botânico da Madeira, Quinta do Bom Sucesso, 9050 Funchal, Madeira, Portugal / BIOTecMOL-CCBG-UMA, Edifício Penteada, 9000-300 Funchal, Portugal

Chá-Chá, R., Fernandes, F. & Romano, A. (2003). Conservação de *Polystichum drepanum* (Sw.) C. Presl, pteridófito endêmico da Ilha da Madeira. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 7-16.

Polystichum drepanum (Sw.) C. Presl é um feto endêmico da Ilha da Madeira, muito raro e em perigo de extinção, tornando-se por isso prioritário desenvolver estudos que permitam a sua conservação. Foi objectivo deste trabalho estudar a resposta de germinação *in vitro* de esporos de *P. drepanum* após diferentes períodos e diversas condições de armazenamento. Testaram-se diversas temperaturas de armazenamento combinadas com humidade relativa igual ou inferior à humidade relativa ambiente. A viabilidade dos esporos foi avaliada após 2, 4 e 6 meses. Os esporos apresentaram uma percentagem de viabilidade superior a 90% em todos os ensaios, no entanto, com o aumento do tempo de armazenamento verificou-se uma diminuição da capacidade de germinação dos esporos. O número de esporófitos obtidos também diminuiu com o aumento do tempo de armazenamento dos esporos. Durante a fase de germinação foram testados diversos meios de cultura com diferentes consistências, tendo-se verificado que os esporos germinavam mais rapidamente em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido sem agitação. As plântulas obtidas *in vitro* foram aclimatizadas numa mistura de turfa e vermiculite 2:1 (v/v) em câmara de aclimatização com elevada humidade. A percentagem de plantas aclimatizadas com sucesso foi de 95%, apresentando estas um crescimento activo.

Palavras chave: conservação, esporos, germinação, fetos.

Chá-Chá, R., Fernandes, F. & Romano, A. (2003). Preservation of *Polystichum drepanum* (Sw.) C. Presl, an endemic pteridophyte of Madeira Island. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 7-16.

Polystichum drepanum (Sw) C. Presl is a threatened fern endemic to Madeira Island, very rare and confined to a few forest areas in the northwest of this island. Due to this situation it is urgent the development of studies to propagate this species. The aim of this work was to study the germination capability of the spores after conservation under several conditions. Different temperatures combined with humidity levels were assayed. The spores' viability was assessed after 2, 4 and 6 months. The preserved spores presented viability higher than 90% in all the assays; however the germination capability decreased with the increase of storage period. The number of sporophytes obtained also decreased with the increase of storage time. During germination period several culture media as well as medium consistency were tested. The minor time of germination was obtained with MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) liquid medium, without agitation. Plantlets obtained *in vitro* were acclimatized in a mixture of peat moss and vermiculite 2:1 (v/v) in a phytotron unit. Ninety five percent of the plantlets were successfully acclimatized and showed active growth.

Key words: conservation, spores, germination, ferns.

INTRODUÇÃO

A destruição extensiva de grandes áreas de floresta, especialmente nas zonas temperadas e tropicais, tem posto em causa a sobrevivência de muitas espécies de pteridófitos. Torna-se por isso necessário levar a cabo acções de conservação *ex situ*, nomeadamente o estabelecimento de colecções de germenplasma (HAWKES *et al.*, 2000; RAO & HODGKIN, 2002). Como a maioria das espécies de fetos produz esporos com elevada viabilidade, o estabelecimento de bancos de esporos parece ser uma opção prometedora (CONSTANTINO *et al.*, 2000).

Polystichum drepanum (Sw.) C. Presl é um feto endémico da Ilha da Madeira, muito raro e em vias de extinção, existindo apenas algumas plantas em áreas de floresta na zona noroeste da ilha (PRESS & SHORT, 1994). Entretanto, essas plantas não foram reencontradas, existindo apenas algumas em cultura no Jardim Botânico da Madeira.

As frondes de *P. drepanum* são pinadas com cerca de 140 × 95 cm e apresentam soros sem indúcio alinhados na periferia de cada pina durante todo o ano (JARDIM & FONTINHA, 2000). Apresenta um sistema radicular bem desenvolvido mas, ao contrário da maioria das espécies de fetos, não possui raízes aéreas.

Os fetos são comercialmente importantes como plantas de interior e na utilização das suas frondes em arranjos florais (SMITH, 1991). A cultura em jardins está igualmente a aumentar (BERTRAND *et al.*, 1999). Esta tendência verifica-se também nos jardins madeirenses, onde já se encontram muitas

espécies de fetos endêmicas da ilha. Neste sentido, o *P. drepanum* apresenta-se como uma planta de elevado valor económico pois pode ser comercializada e facilmente cultivada dado que se adapta bem à mudança de habitat. É de referir que existem já alguns exemplares na estufa e nos jardins do Jardim Botânico da Madeira.

A técnica de armazenamento de esporos de fetos a baixas temperaturas tem sido utilizada pelo Royal Botanic Garden de Edinburgh. Este processo pode assegurar a sobrevivência e a diversidade de espécies ameaçadas pela erosão genética se desaparecerem populações selvagens. Esta metodologia permite assim manter um banco de genes, ao qual se pode recorrer no caso de uma espécie estar em risco de extinção (HAWKES *et al.*, 2000).

Dada a situação de vulnerabilidade em que *P. drepanum* se encontra torna-se urgente desenvolver métodos que permitam a propagação e a conservação desta espécie. Assim, foi objectivo deste trabalho estudar a resposta de germinação *in vitro* de esporos de *P. drepanum* após armazenamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante este trabalho, utilizou-se como material vegetal os soros maduros, recolhidos a partir de frondes férteis de plantas-mãe de *P. drepanum* em cultura na estufa (Fig. 1). Para obtenção dos esporos a serem utilizados nos ensaios de armazenamento, recolheram-se as frondes e introduziram-se em envelopes de papel mantendo-as nestas condições durante uma semana à temperatura ambiente.

Armazenamento de esporos

Ensaíram-se diversos métodos de armazenamento em que se testaram diferentes condições de temperatura, -80, -17 e 21 °C, combinadas com humidade relativa ambiente ou humidade relativa < 20%. Para cada ensaio de armazenamento utilizaram-se três tubos de vidro normal (10 φ x 150 mm) contendo 10 mg de esporos cada. Sobre os esporos colocou-se algodão cardado de modo a que estes ficassem aglomerados no fundo do tubo (Fig. 2).

Os tubos cujas condições de armazenamento envolviam humidade relativa igual à humidade relativa ambiente foram selados por aquecimento da boca do tubo à chama (Fig. 2). Para os ensaios cuja humidade relativa era inferior à ambiente, colocou-se sobre o algodão 2 g de sílicagel e selou-se de seguida os tubos (Fig. 2). Os tubos foram colocados nas condições de temperatura referidas anteriormente.

Avaliação da viabilidade dos esporos

Para a avaliação da viabilidade dos esporos após armazenamento utilizou-se a coloração com Azul de Evans. Para cada ensaio de conservação procedeu-se à pesagem de 1 mg de esporos por eppendorf (3 eppendorfs/ensaio), que foram ressuspendidos em 1 ml de solução aquosa de Azul de Evans (1%, p/v). Os

eppendorfs foram agitados regularmente durante um período de 5 min e após esse período transferiram-se $\pm 20 \mu\text{l}$ para as câmaras do hemacitómetro. Ao microscópio (Amp=100 \times) contabilizou-se o número total de esporos e o número de esporos viáveis. Para cada ensaio foram efectuadas 30 contagens (10 por eppendorf).

Desinfecção superficial dos esporos

A desinfecção superficial dos esporos foi efectuada com solução aquosa de lixívia comercial a 1% (v/v), às quais se adicionou 0,1% (v/v) de Tween 20, durante 16 min. A solução desinfectante foi retirada por centrifugação (13000 rpm). Depois de desinfectados os esporos foram lavados três vezes em água estéril e de seguida foram suspensos em água bidestilada estéril, com uma densidade de 1 mg/ml. 100 μl dessa suspensão foram distribuídos por cada recipiente de cultura.

Cultura *in vitro* dos esporos

Durante a fase de germinação dos esporos foram testados os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), MS modificado (CONSTANTINO *et al.*, 1995) e $\frac{1}{4}$ MS. Todos os meios de cultura foram testados com diferentes consistências (líquido com e sem agitação a 25 rpm e duas fases). Estes ensaios foram efectuados com esporos não submetidos a armazenamento. Os esporos submetidos a condições de armazenamento foram cultivados, após armazenamento, em meio MS líquido sem agitação.

Os meios foram suplementados com 20 g.l^{-1} de sacarose e 8 g.l^{-1} de agar, no caso do meio semi-sólido. Para o meio em duas fases, sobre o meio semi-sólido foram adicionados 2 ml de meio líquido com a mesma constituição para facilitar a germinação. O pH do meio foi ajustado a 5,7 e os meios autoclavados durante 20 min, a 120 $^{\circ}\text{C}$ e 1 atm. Como recipientes de cultura foram utilizados tubos de ensaio (25 $\phi \times 160$ mm), vedados com tampas transparentes de polietileno, contendo 10 ml de meio de cultura. As culturas foram mantidas a 25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 h a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cultivo dos gametófitos e dos esporófitos

Os gametófitos resultantes (Fig. 3-5) foram transferidos para tubos de ensaio (30 $\phi \times 200$ mm) com tampas transparentes de polietileno contendo meio MS em duas fases e mantidos nas condições descritas anteriormente. Os esporófitos obtidos (Fig. 6) foram transferidos para meio fresco e mantidos nas condições atrás descritas até ocorrer o desenvolvimento de raízes.

Aclimatização das plantas

As plântulas com raízes bem desenvolvidas foram retiradas do meio de cultura e as raízes cuidadosamente lavadas em água corrente de modo a remover o agar. As plântulas foram de seguida transferidas para vasos (300 cm^3 de capacidade)

(Fig. 7) contendo uma mistura de turfa e vermiculite (2:1) e aclimatizadas em estufim à temperatura de 22-26 °C, fotoperíodo de 16 h com densidade de fluxo de fotões de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sob humidade relativa elevada (95%). A humidade relativa foi gradualmente diminuída a uma taxa de 10% por semana durante um mês. No final desse período as plântulas foram transferidas para caixas de polietileno transparente onde foram mantidas durante um mês em condições naturais. De seguida as plantas foram transferidas para a estufa (Fig. 8).

Quantificação e análise dos resultados

Para cada ensaio de conservação e para cada meio testado foram testados 10 tubos de ensaio, tendo cada ensaio sido repetido três vezes. O período de armazenamento dos esporos decorreu durante 0, 2, 4 ou 6 meses, tendo sido efectuados os seguintes registos para cada período de armazenamento dos esporos: número total de esporos e esporos viáveis por mg de esporos, tempo de germinação e crescimento dos gametófitos, tempo para o aparecimento de novos esporófitos e desenvolvimento dos mesmos.

O número total de esporos por mg foi calculado com base na seguinte equação: $n_{\text{total de esporos}} = n \times 10^4 \times \text{diluição}$, sendo $n_{\text{total de esporos}}$ o número total de esporos por mg, n o número médio de esporos contados, 10^4 o volume da câmara de contagem (ml^{-1}), e *diluição* o factor de diluição (ml.mg^{-1}). A partir do número total de esporos por mg e do número total de esporos viáveis, calculou-se a percentagem destes por mg de esporos no final de cada período de armazenamento (0, 2, 4 e 6 meses).

Em relação aos resultados de germinação, registou-se semanalmente a percentagem de tubos em que ocorreu germinação, considerando-se germinação positiva quando mais de 50% dos esporos se encontravam a germinar. Com base nestes resultados calculou-se a percentagem de tubos em que ocorreu germinação e o tempo médio de germinação (em dias). Semanalmente registou-se o crescimento dos gametófitos, o aparecimento de novos esporófitos e o seu desenvolvimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dependendo das espécies, a viabilidade dos esporos diminui com o aumento da duração do período de armazenamento e depende das condições de armazenamento (POLLARD & WALKER, 1984; KURIYAMA & MAEDA, 1999). Da análise da Tabela 1 verifica-se que a percentagem de esporos viáveis se manteve superior a 94% para todos os ensaios de armazenamento dos esporos, independentemente do período de armazenamento, da temperatura ou da humidade relativa. Estes resultados parecem indicar que o armazenamento dos esporos de *P. drepanum* nas condições testadas não afecta a sua viabilidade. Contudo, é necessário verificar se a sua capacidade de germinação se mantém.

Tabela 1. Percentagem de esporos viáveis, percentagem de tubos em que ocorreu germinação, tempo médio de germinação dos esporos, desenvolvimento dos gametófitos, tempo médio de aparecimento dos esporófitos e número total de esporófitos obtidos para as diferentes condições de conservação ao fim de 0, 2, 4 e 6 meses.

Temperatura de conservação (°C)	Humidade relativa	Período de conservação (meses)	% Viabilidade	% Germinação	Tempo médio de germinação ^a (dias)	Tempo médio de aparecimento dos esporófitos ^b (dias)	Número total de esporófitos obtidos
Controlo	—	0	100	100	29	124	39
		2	100	100	29	118	20
		4	96	63	37	130	4
21	Ambiente	6	97	0	—	—	—
		2	100	100	32	149	19
		4	98	100	48	160	14
-30	Ambiente	6	100	0	—	—	—
		2	96	100	29	153	4
		4	94	100	47	165	2
-80	< 20 %	6	97	0	—	—	—
		2	96	100	29	175	9
		4	97	100	45	—	—
-80	Ambiente	6	97	0	—	—	—
		2	94	100	29	153	4
		4	98	44	43	176	1
-80	< 20 %	6	100	0	—	—	—
		2	95	100	29	146	1
		4	100	100	50	—	—
-80	< 20 %	6	100	0	—	—	—
		2	95	100	29	146	1
		4	100	100	50	—	—

^a Tempo médio considerado quando >50% dos esporos se encontravam a germinar.

^b Tempo considerado desde o dia em que se considerou germinação positiva.

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados obtidos para a germinação dos esporos após o armazenamento. Verifica-se que a percentagem de germinação dos esporos foi drasticamente afectada para um período de armazenamento de 6 meses, independentemente das condições de armazenamento. Para 2 e 4 meses de armazenamento a percentagem de germinação foi de 100%, exceptuando os ensaios relativos a 4 meses de armazenamento a 21 °C e a -80 °C com humidade relativa ambiente. Relativamente ao tempo médio de germinação dos esporos, este aumentou consideravelmente ao longo do período de armazenamento. Estes resultados comprovam que apesar dos esporos apresentarem elevada viabilidade no final do período de armazenamento, a sua capacidade de germinação foi afectada negativamente para o período de armazenamento de 6 meses.

Perante estes resultados pode concluir-se que a capacidade de germinação dos esporos não foi afectada nem pela temperatura de armazenamento nem pela humidade relativa durante o armazenamento, mas apenas pela duração do período de armazenamento. O mesmo se pode concluir relativamente ao tempo médio para o aparecimento dos esporófitos, o qual aumentou com o aumento da duração do período de armazenamento, mas não foi afectado pela temperatura ou humidade de armazenamento. O número de esporófitos desenvolvidos diminuiu com o aumento da duração do período de armazenamento (Tabela 1). A perda de capacidade germinativa com o aumento do período de armazenamento poderá ter influenciado negativamente o desenvolvimento dos gametófitos, traduzindo-se essa influência na perda de capacidade para originarem novos esporófitos.

Tendo em conta estes resultados verifica-se que o armazenamento de esporos de *P. drepanum*, durante um período de 4 meses pode ser efectuada a 21 °C na presença de dessecante. Nestas condições, passado cerca de um mês era possível observar gametófitos em início de desenvolvimento (Fig. 3). Duas semanas depois os gametófitos cobriam toda a superfície do meio de cultura (Fig. 4) e eram observáveis gametófitos maduros com arquegónios e anterídeos (Fig. 5). Dois meses após a transferência destes gametófitos para meio fresco observou-se o desenvolvimento dos esporófitos (Fig. 6).

CONSTANTINO *et al.* (2000), num ensaio de armazenamento de esporos dos fetos *Dicksonia sellowiana* e *Cyathea caracasana*, verificaram que a presença de dessecante para manter a humidade relativa inferior à humidade relativa ambiente afecta negativamente a capacidade de germinação dos esporos. Contrariamente, no presente estudo verificou-se que a perda de capacidade de germinação não está directamente relacionada com a presença de agente dessecante mas sim com o tempo de armazenamento.

Relativamente à influência do meio de cultura e da sua consistência, verificou-se que a percentagem de germinação foi máxima nos meios MS e ¼ MS líquidos sem agitação (Tabela 2). No entanto, o tempo médio de germinação foi mais reduzido no meio MS. Para os ensaios em meio líquido com agitação a percentagem de germinação diminuiu consideravelmente (Tabela 2), podendo-se

concluir que a agitação nas condições ensaiadas afectou negativamente a capacidade de germinação dos esporos.

Tabela 2. Influência da constituição e da consistência do meio basal na percentagem de germinação, tempo médio de germinação dos esporos e desenvolvimento dos gametófitos obtidos.

Meio de Cultura	Consistência do meio	% Germinação	Tempo médio de germinação ^a (dias)	Desenvolvimento dos gametófitos
MS mod.	Duas fases	0	—	—
	Líquido	70	46	- - -
	Líquido com agitação ^b	58	39	- -
MS	Duas fases	48	39	++
	Líquido	100	22	+++
	Líquido com agitação	28	24	++
¼ MS	Duas fases	34	49	++
	Líquido	100	34	+ -
	Líquido com agitação	27	28	+ -

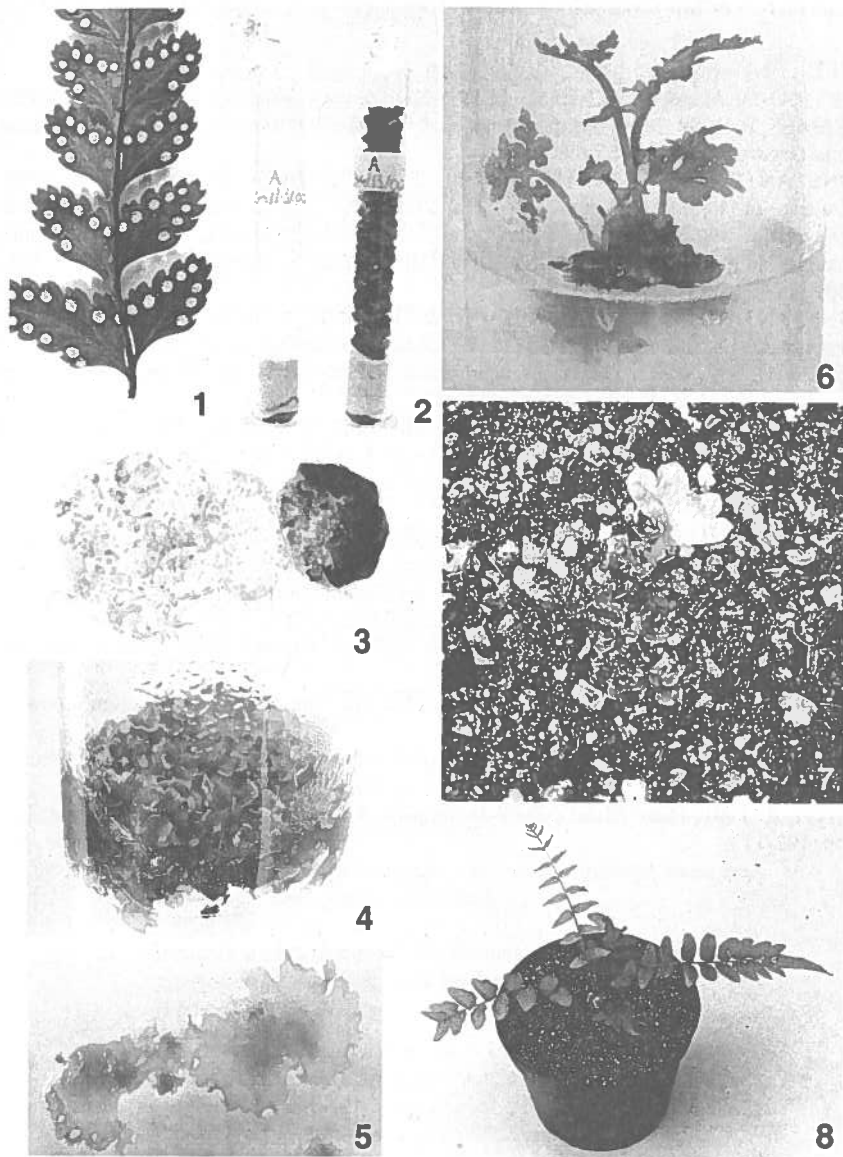
^a Tempo médio considerado quando +50% dos esporos se encontravam a germinar; ^b 25 rpm
 +++ Gametófitos muito verdes, ++ Gametófitos verdes, + - Gametófitos pouco verdes, - - Gametófitos ligeiramente verdes, - - - Gametófitos acastanhados

Dos resultados obtidos verifica-se que o meio MS modificado não é adequado para a germinação de esporos de *P. drepanum*, contrariamente a resultados com esporos de outras espécies de fetos (CONSTANTINO *et al.*, 2000). Para além da percentagem de germinação ser baixa, nos ensaios em que esta ocorreu os gametófitos apresentaram cor acastanhada e um desenvolvimento muito lento (Tabela 2). Dado que o que diferencia o meio MS modificado do meio MS é a ausência de vitaminas, estes resultados parecem indicar que as vitaminas são essenciais para a germinação dos esporos de *P. drepanum*.

De um modo geral, verificou-se que em todos os ensaios em que se testou o meio em duas fases a percentagem de germinação foi baixa e o tempo médio de germinação elevado. Esta diminuição da capacidade de germinação dos esporos em meio semi-sólido poderá dever-se a problemas de toxicidade induzidos pelo agar (DEBERGH, 1983).

Os gametófitos e os esporófitos obtidos foram cultivados em meio MS em duas fases e apresentaram um desenvolvimento favorável (Fig. 5 e 6). Ao fim de três semanas em cultura os esporófitos apresentavam raízes bem desenvolvidas (10 – 20 mm) e novas frondes, foram transplantados para vasos e colocados em condições de aclimatização (Fig. 7). A percentagem de aclimatização no final do primeiro mês de crescimento em estufa foi elevada (95%), tendo as plantas apresentado bom desenvolvimento (Fig. 8).

Figuras: 1. Pina de uma fronde fértil do feto *Polystichum drepanum*; 2. Tubos do ensaio usados no armazenamento dos esporos sem e com sílica gel; 3. Esporo em germinação após 25 dias de inoculação (amp. = 400 x); 4. Gametófitos jovens com 57 dias provenientes de esporos conservados durante 4 meses a -30 °C e humidade relativa < 20%; 5. Pormenor de gametófito maduro, proveniente de esporos conservados durante 2 meses a -80 °C e humidade ambiente; 6. Esporófito jovem com 76 dias em meio MS total semi-sólido; 7. Esporófito a crescer *ex vitro*; 8. Aspecto geral de plântulas de *P. drepanum* com 2 meses de aclimatização a crescer em estufa.



A partir dos resultados observados neste estudo podemos concluir que, apesar dos esporos de manterem viáveis ao fim de 6 meses de armazenamento, a perda da sua capacidade de germinação é rápida. Provavelmente será esta perda de capacidade germinativa a responsável pelas dificuldades desta espécie se regenerar naturalmente. É urgente efectuar novos estudos de armazenamento dos esporos noutras condições, no sentido de tentar prolongar o período de armazenamento. Presentemente encontram-se a decorrer ensaios com o objectivo de desenvolver um protocolo de micropropagação para esta espécie.

REFERÊNCIAS

- BERTRAND, A., ALBUERNE, M., FERNÁNDEZ, H., GONZÁLEZ, A. & SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1999. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 65-69.
- CONSTANTINO, S., SANTAMARIA, L., GÓNGORA, G.A & HODSON, E. 1995. Cultivo de tejidos vegetais como una alternativa para la preservación *ex situ* de *Dicksonia sellowiana*, un helecho arborescente amenazado. Memorias Primer Congreso Nacional sobre Biodiversidad, Cali, Colombia, diciembre 4-7 de 1995. 303-309 pp.
- CONSTANTINO, S., SANTAMARIA, L. & HODSON, E. 2000. Storage and *in vitro* germination of tree fern spores. *Botanic Gardens Micropropagation News* 2 : 58-60.
- DEBERGH, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia plantarum* 59: 270-276.
- HAWKES, J.G., MAXTED, N. & FORD-LLOYED, B.V. (Eds.) 2000. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Kluwer Academic Publishers.
- JARDIM, R. & FONTINHA, S. 2000. *Laurissilva – Uma reliquia da Madeira*. 1ª edição. 19 pp.
- KURIYAMA, A. & MAEDA, M. 1999. Direct production of sporophytic plants from spores of *Equisetum arvense*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 77-79.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- POLLARD, J. & J. WALKER. 1984. *Plant Cell and Tissue Culture*. Vol. 6. Humana Press-Clifton, New Jersey.
- PRESS, J. & SHORT, M. 1994. *Flora of Madeira*. The Natural History Museum. London. pp. 48-49.
- RAO, V.R. & HODGKIN, T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- SMITH, R. 1991. *Plant tissue culture-techniques and experiments*. Academic Press, Inc. pp. 102-113.

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DE *DROSOPHYLLUM LUSITANICUM* COM VISTA À SUA CONSERVAÇÃO

S. Gonçalves, J. Jesus & A. Romano

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

Gonçalves, S., Jesus, J. & Romano, A. (2003). Produção *in vitro* de plantas de *Drosophyllum lusitanicum* com vista à sua conservação. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 17-27.

Este trabalho centrou-se na espécie *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Droseraceae), vulgarmente conhecida por pinheiro baboso ou orvalho do pinhal, espécie perene rara, insectívora, endémica do sudoeste da Península Ibérica e do nordeste de Marrocos. A propagação vegetativa desta espécie pelas técnicas convencionais não foi até à data descrita. *D. lusitanicum* só pode ser propagada pela via seminal. No entanto, a reduzida disponibilidade de sementes e a baixa frequência de germinação e sobrevivência compromete a disseminação da espécie. Foi objectivo deste trabalho elaborar um protocolo de micropropagação para a espécie *Drosophyllum lusitanicum*, partindo de sementes, com vista à sua conservação. Foram identificadas várias populações no Algarve de onde se recolheram sementes que foram germinadas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 0,5 mg.l⁻¹ BA e 0,1 mg.l⁻¹ GA₃. Com os rebentos obtidos testaram-se vários meios para multiplicação *in vitro* desta espécie, seleccionando-se o meio MS suplementado com 0,2 mg.l⁻¹ de zeatina como o melhor. Para indução de enraizamento utilizou-se a incorporação de auxinas no meio de cultura. Os meios menos concentrados em sais (1/2MS e 1/4MS) revelaram-se mais eficazes. Embora as percentagens de enraizamento mais elevadas tivessem sido obtidas com ANA, foi o AIA que permitiu o melhor desenvolvimento das raízes.

Palavras-chave: germinação *in vitro*, micropropagação, pinheiro baboso, planta insectívora.

Gonçalves, S., Jesus, J. & Romano, A. (2003). *In vitro* production of *Drosophyllum lusitanicum* plants. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 17-27.

Drosophyllum lusitanicum (L.) Link (Droseraceae), commonly known as Portuguese sundew, is a rare perennial,

insectivorous plant, endemic to the southwest of the Iberian Peninsula and northwest Morocco. The vegetative propagation of this species by conventional techniques has not been described. *D. lusitanicum* can only be propagated by seed. However, the limited seed availability and poor germination frequency and survival reduce species dissemination. The objective of this work was to develop a method of *in vitro* propagation of *D. lusitanicum* using seeds as explant, in order to preserve this species. Various populations were identified in the Algarve region. The collected seeds were *in vitro* germinated on MURASHIGE & SKOOG (1962) medium supplemented with 0.5 mg.l⁻¹ BA and 0.1 mg.l⁻¹ GA₃. The obtained shoots were used in several proliferation assays. The best results were observed in MS medium supplemented with 0.5 mg.l⁻¹ zeatin. For root development media less concentrated in salts (1/2MS and 1/4MS) were more favorable. The highest rooting frequency was observed with NAA, however AIA allowed a better root development.

Key words: *in vitro* germination, insectivorous plant, micropropagation, Portuguese sundew.

INTRODUÇÃO

A espécie insectívora *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (*Droseraceae*), vulgarmente conhecida por pinheiro baboso ou orvalho do pinhal, é uma espécie perene rara, endémica do sudoeste da Península Ibérica e do nordeste de Marrocos (MÜLLER & DEIL, 2001). A maioria das populações conhecidas desta espécie localizam-se em locais sujeitos a intensa pressão humana e urbanística, em especial nas zonas costeiras. Em Espanha está incluída na lista de espécies em perigo de extinção (VALDÉS, 1996; OCANÃ *et al.*, 2000). Em Portugal MÜLLER & DEIL (2001), identificaram 21 populações na Serra de Monchique. No entanto, recentemente, CORREIA & FREITAS (2002) analisaram a distribuição Portuguesa desta espécie e concluíram ter ocorrido uma regressão na sua distribuição nos últimos 60 anos.

D. lusitanicum é um caméfito, glanduloso, lenhoso na base. Possui folhas sésseis, alternas, marcescentes e com enrolamento circinado (Est. 1 A). Em Portugal pode atingir os 50 cm. O período de floração estende-se de Março a Agosto, durante o qual são produzidas, em média, cinco flores amarelas por inflorescência (ORTENGA-OLIVENCIA *et al.*, 1995).

Tanto quanto se sabe, *D. lusitanicum* é a única planta carnívora capaz de se desenvolver em solos secos, mal drenados, sobre surraipas. Como adaptação ao *habitat* hostil, esta planta desenvolveu folhas especializadas na captura de insectos, com posterior digestão das presas e absorção das substâncias nutritivas. A captura está a cargo de inúmeras glândulas produtoras de mucilagem que cobrem praticamente toda a planta (Est. 1 B). O insecto, ao ser atraído, ou pela

cor vermelha das glândulas (SLACK, 1969), pelo brilho da mucilagem ou pelo odor das secreções (MEYER & DEWÉVRE, 1894; QUINTANILHA, 1926; SLACK, 1969), pousa na folha e fica preso na mesma. Este evento estimula a planta a produzir enzimas digestivas que decompõem as substâncias orgânicas da presa em moléculas mais simples, que são absorvidas, compensando a deficiência do solo em nutrientes. É de notar também que, dentro das plantas carnívoras que possuem armadilhas do tipo adesivo, esta espécie é uma das que possui maiores dimensões, dado que pode viver bastantes anos (CATARINO *et al.*, 1997). É devido a todas estas características que *D. lusitanicum* se apresenta como uma planta carnívora única entre todas as que optaram por esta estratégia de vida.

A propagação vegetativa desta espécie pelas técnicas convencionais não foi até à data descrita. *D. lusitanicum* só pode ser propagada pela via seminal (TILBROOKE, 1988; D'AMATO, 2000; CORREIA & FREITAS, 2002). No entanto, a probabilidade de germinação das sementes na proximidade de plantas adultas da mesma espécie é reduzida, o que compromete a disseminação da espécie (CORREIA & FREITAS, 2002). Assim, a propagação *in vitro* produzindo elevada quantidade de plantas em reduzido tempo (FAY, 1992) poderá contribuir para a conservação de recursos genéticos desta espécie (HAWKES *et al.*, 2002), à semelhança do que tem sido descrito na conservação de diversas plantas em vias de extinção (BENSON *et al.*, 2000; IANKOVA *et al.*, 2001; BHATIA *et al.*, 2002).

Foi objectivo deste trabalho elaborar um protocolo de micropropagação para a espécie *Drosophyllum lusitanicum*, partindo de sementes, com vista à sua conservação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Germinação *in vitro*

Foram efectuados estudos de campo tendo sido identificadas várias populações de *Drosophyllum lusitanicum* no Algarve. Nessas populações recolheram-se sementes que foram utilizadas nos ensaios de germinação.

As sementes foram desinfectadas com solução aquosa de lixívia comercial a 15%, à qual se adicionou 0,1% (v/v) de Tween 20, durante 15 minutos, seguindo-se três lavagens com água estéril. Posteriormente, foram embebidas em água estéril e sujeitas a um choque de frio (5 °C) durante 2, 3 ou 4 dias. Passado o período de frio, retirou-se o tegumento a metade das sementes (180 sementes) em condições assépticas e estas foram imediatamente inoculadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo 20 g.l⁻¹ de sacarose, 0,5 mg.l⁻¹ de BA (benziladenina) e 0,1 mg.l⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico). As sementes foram incubadas a 25±2 °C, metade (90 sementes com tegumento e 90 sementes sem tegumento) às escuras e outra metade sob fotoperíodo de 16 h (60 mmol m⁻² s⁻¹).

Multiplicação

Os rebentos provenientes da germinação das sementes, foram utilizados nos ensaios de multiplicação. Utilizou-se como meio base para estes ensaios o meio MS contendo 20 g.l⁻¹ de sacarose. Foram testadas duas citocininas (zeatina e BA) e duas concentrações das mesmas (0,1 e 0,2 mg.l⁻¹). Após 6 semanas avaliou-se a taxa de multiplicação e o comprimento do maior rebento.

Enraizamento

Como meio basal de enraizamento testou-se o meio MS e duas modificações do mesmo (diluindo para 1/2 ou 1/4 os macronutrientes do meio MS). A formação de raízes foi induzida pela incorporação de auxinas no meio de cultura, tendo-se testado três auxinas (AIA, ANA e AIB) e duas concentrações das mesmas (1 e 2 mg.l⁻¹). Cinco semanas após indução do enraizamento, contabilizou-se a frequência de enraizamento, o número de raízes desenvolvidas por rebento e o comprimento da raiz mais longa.

Meios e condições de cultura

Os meios de cultura foram preparados a partir de soluções-mãe. Após adição de 20 g.l⁻¹ de sacarose e 7 g.l⁻¹ de agar, o pH foi ajustado a 5,8 (com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M). A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclavagem a 1 atm, 121 °C durante 20 minutos.

Nos ensaios de germinação utilizaram-se como recipientes de cultura tubos de vidro (25 × 160 mm) contendo 10 ml de meio cada. Nos ensaios de multiplicação e enraizamento utilizaram-se balões Erlenmeyer de 500 ml contendo 80 ml de meio cada.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 25±2 °C com fotoperíodo de 16 h (60 mmol m⁻² s⁻¹).

Quantificação dos resultados e tratamento estatístico

Nos ensaios de germinação *in vitro*, para cada combinação de tratamentos efectuados (com ou sem tegumento; 2, 3 ou 4 dias a 5°C; luz ou escuro) testaram-se 30 sementes. Na multiplicação, para cada citocinina (BA e zeatina) e concentração (0,1 e 0,2 mg.l⁻¹) testaram-se 30 rebentos. Nos ensaios de enraizamento foram testados no total 180 rebentos.

Os resultados da fase de multiplicação foram avaliados estatisticamente utilizando o programa SPSS. Efectuou-se uma análise de variância e o teste de Duncan para cada variável ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo verificou-se que a remoção do tegumento é essencial para que ocorra a germinação das sementes, à semelhança do que tem sido descrito para outras espécies (PINHEIRO *et al.*, 2001). Quando este tegumento não foi removido não se verificou germinação.

A taxa de germinação das sementes de *D. lusitanicum* foi afectada pelo período de frio a que foram submetidas e pelas condições de luz durante o processo de germinação. A percentagem de germinação mais elevada (75%) obteve-se quando as sementes permaneceram durante 4 dias a 5 °C e foram expostas à luz durante o período de germinação *in vitro* (Fig. 1).

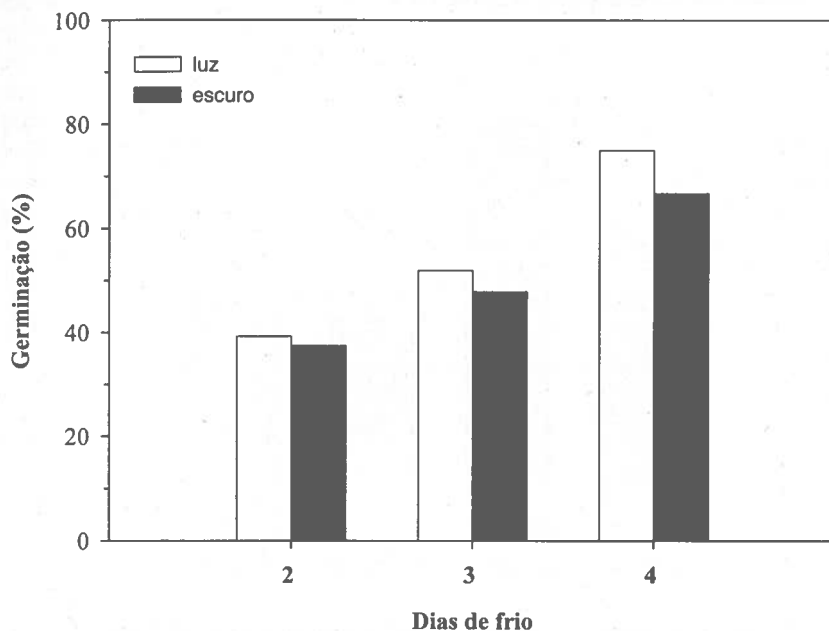


Figura 1. Influência de diferentes períodos de frio (5°) e da luz ou escuro na germinação *in vitro* das sementes de *D. lusitanicum*. Resultados obtidos ao fim de um mês de germinação.

A dormência das sementes é afectada por factores ambientais, pelas condições de armazenamento das sementes e pelo estado fisiológico da planta-mãe durante a maturação (TOOLE & TOOLE, 1953; ROBERTS, 1963). A quebra da dormência das sementes por tratamento de frio é referenciada para várias espécies (ARBELOA *et al.* 2000; HOQUE *et al.* 2001; IANKOVA *et al.* 2001).

Para qualquer um dos períodos de frio testados, a percentagem de germinação mais elevada verificou-se quando as sementes foram expostas à luz após inoculação. Durante a cultura das sementes verificaram-se dois tipos de resposta, a formação de *callus* e a formação de rebentos completos (Est. 1 C e D).

A fase de multiplicação é de grande importância durante o processo de micropropagação, uma vez que o seu objectivo é a produção rápida de órgãos ou outras estruturas que possam ulteriormente regenerar novas plantas (MURASHIGE, 1974). Este processo é normalmente induzido pela adição de

citocininas ao meio de cultura (DEBERGH & READ, 1991). Na Figura 2 apresentam-se as taxas de multiplicação e o comprimento do maior rebento, para os diferentes meios testados.

O meio MS suplementado com 0,2 mg.l⁻¹ de zeatina permitiu obter taxas de multiplicação significativamente superiores ($p < 0,05$) bem como, um maior alongamento dos rebentos (Fig. 2) (Est. 1 E).

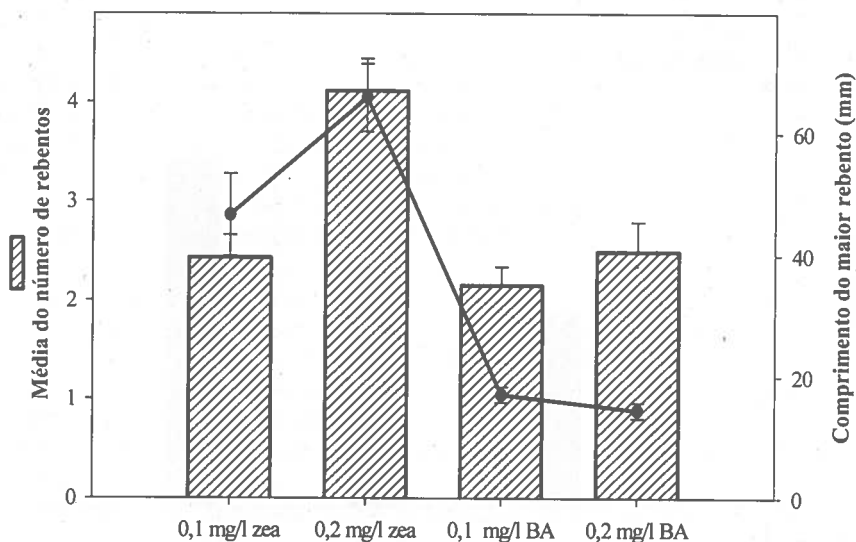


Figura 2. Efeito das citocininas zeatina e BA nas concentrações 0,1 e 0,2 mg.l⁻¹, na taxa de multiplicação e comprimento do maior rebento (6 semanas após inoculação). Os valores representam médias \pm erro padrão de 30 rebentos por citocinina e concentração.

Ao contrário do que tem sido referido para outras espécies carnívoras como *Nepenthes macfarlanei* (CHUA & HENSHAW, 1999) e *Dionaea muscipula* (ZHOU *et al.*, 2000), a citocinina benziladenina não se mostrou eficaz na multiplicação dos rebentos. Apesar de se verificar a produção de rebentos estes apresentavam um aspecto vitrificado. Este fenómeno tem sido frequentemente associado à presença desta citocinina no meio de multiplicação (NOBRE, 1996; CUENCA & AMO-MARCO, 2000; PAEK *et al.*, 2000). Este fenómeno é caracterizado essencialmente por alterações anatómicas, fisiológicas e morfológicas nas culturas, em especial nas folhas (folhas espessas, alongadas, translúcidas, com menor conteúdo em clorofila, entre outras), provocando uma diminuição da capacidade de multiplicação, de enraizamento e aclimatização (ZIV, 1991).

No continuar deste trabalho as taxas de multiplicação obtidas poderão vir a ser optimizadas testando concentrações de zeatina mais elevadas ou outras

citocininas. Meios de cultura menos concentrados em sais (diluições dos macronutrientes de MS) têm-se mostrado eficazes para outras plantas carnívoras (CHUA & HENSHAW, 1999; ZHOU *et al.*, 2000).

O ANA quando adicionado ao meio MS e 1/2MS, e o AIB quando adicionado ao meio 1/4MS, permitiram obter as percentagens de enraizamento mais elevadas (Fig. 3). No entanto, as raízes assim desenvolvidas apresentaram reduzido alongamento devido à elevada formação de *callus* basal. CUENCA & AMO-MARCO (2000) observaram em plantas de *Salvia valentina* que o ANA induziu a formação de raízes muito curtas. Elevadas concentrações de AIB podem induzir a formação de *callus* na base dos rebentos (FORD *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2000). Esta formação pode impedir o desenvolvimento de raízes, quer bloqueando fisicamente o desenvolvimento dos primórdios radiculares, quer por comprometer a continuidade vascular entre as raízes e o caule (ELIASSON, 1981; THORPE, *et al.*, 1991). Torna-se então, necessário baixar a concentração das auxinas para permitir o alongamento das raízes. FORD *et al.* (2000) obtiveram bons resultados transferindo os rebentos para meio de cultura com baixas concentrações de AIB, após a permanência em meio suplementado com esta auxina a concentrações mais elevadas, durante poucos dias.

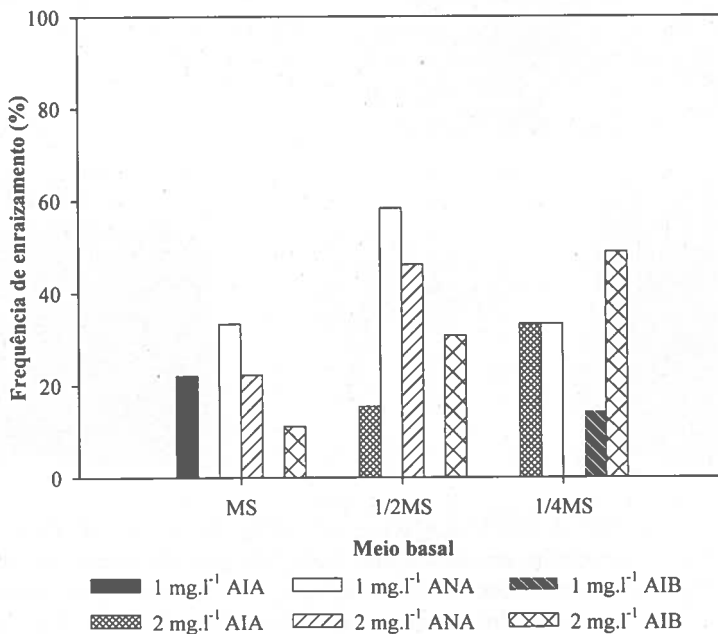
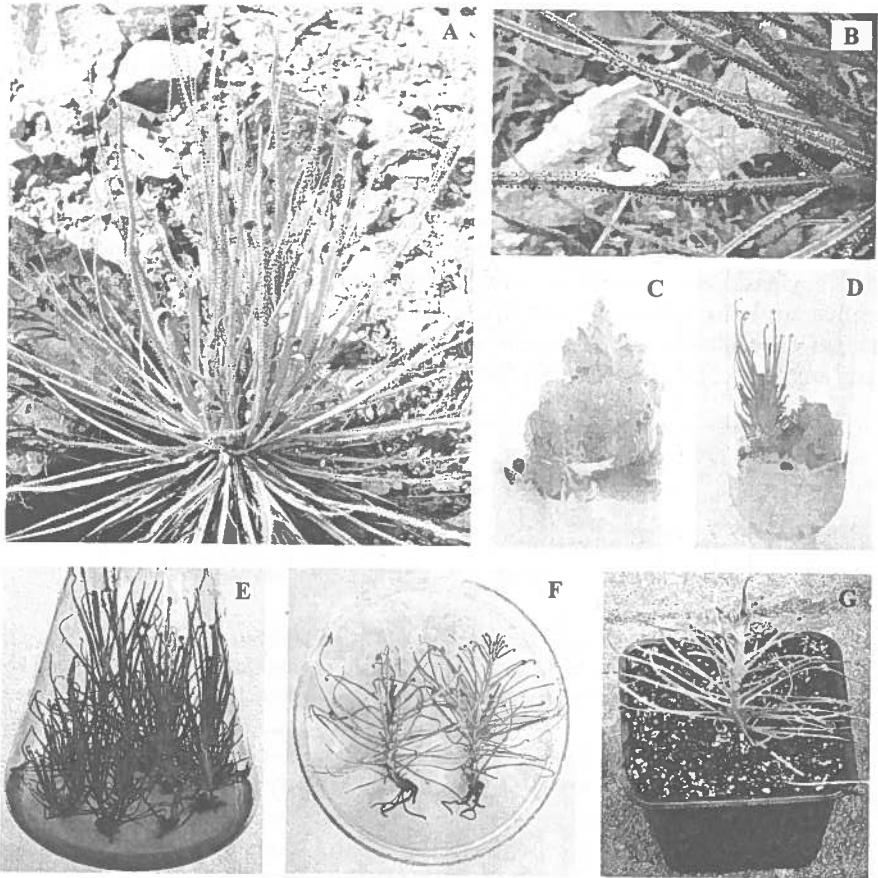


Figura 3. Efeito de três meios base (MS e duas diluições do mesmo, 1/2 e 1/4) e de três auxinas (AIA, ANA e AIB) a duas concentrações (1 e 2 mg.l⁻¹) na frequência de enraizamento (5 semanas após inoculação). Por cada tratamento testaram-se 10 rebentos, fazendo um total de 180 rebentos testados.

Estampa 1. A - Planta de *D. lusitanicum* no campo; B - Pormenor das folhas mostrando inúmeros insetos presos na mucilagem; C e D - diferentes tipos de resposta de germinação das sementes, *callus* e rebento completo, respectivamente (\varnothing tubos = 25 mm); E - rebentos em fase de multiplicação (balão de 500 ml); F - plântulas enraizadas (\varnothing caixa = 110 mm); G - plântula em fase de aclimatização (vaso de 350 ml).



CHUA *et al.* (1999) e ZHOU-KANG *et al.* (2000) descrevem o ANA e os meios menos concentrados em sais como mais eficazes no enraizamento de outras espécies de carnívoras. O AIA apesar de permitir obter menores percentagens de enraizamento, permitiu um maior alongamento das raízes formadas. Resultados semelhantes foram descritos por CUENCA & AMOMARCO (2000). Esta auxina é muito instável, sendo a maior parte removida por oxidação fotoquímica e/ou enzimática logo nos primeiros dias de cultura, estando apenas presente em concentrações elevadas durante o período inicial, ou

seja quando os meristemas se estão a formar. Segundo DE KLERK *et al.* (1999) numa fase mais avançada do processo de rizogénese, elevadas concentrações de auxinas são inibitórias para o desenvolvimento das raízes. Isto pode explicar o melhor desenvolvimento das raízes em meio suplementado com AIA, uma vez que este já terá sido degradado no momento do alongamento das raízes. Segundo os mesmos autores para que a frequência de enraizamento seja aumentada, esta auxina terá de ser utilizada em concentrações superiores.

As plântulas provenientes do enraizamento *in vitro* encontram-se em período de aclimatização (Est. 1 F e G). Após aclimatização às condições externas as plantas micropropagadas serão reintroduzidas em campo e será acompanhada a sua adaptação às condições naturais.

A conservação *in vitro* de *D. lusitanicum* está a ser efectuada mantendo as culturas em crescimento contínuo, transferindo-as para meio fresco em intervalos de tempo regulares (6 semanas). Este método proporciona material em crescimento activo em qualquer altura.

Os sistemas de conservação *in vitro* apresentam numerosas vantagens de que se destacam, a ausência de erosão genética, as altas taxas de multiplicação, as reduzidas necessidades de espaço e a facilidade na mobilidade do germoplasma (ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO, 1998). No continuar deste trabalho, pretendem-se desenvolver outras metodologias de conservação para esta espécie, nomeadamente recorrendo à crioconservação das sementes em azoto líquido.

REFERÊNCIAS

- ARBELOA, A., GARCIA, E., DAORDEN, M. E., ANDREU, P., MARIN, J. A. & SOCIAS-I-COMPANY, R. 2000. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de microbolan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *Jornadas de experimentación en fruticultura, Zaragoza, Spain. ITEA*. 2000, Volumen Extra No. 21: 59-61.
- BENSON, E. E., DANAHY, J. E., PIMBLEY, I. M., ANDERSON, C. T., WAKE, J. E. & ADAMS, L. K. 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation* 9: 711-726.
- BHATIA, P., BHATIA, N. P. & ASHWATH, N. 2002. *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): a rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biodiversity and Conservation* 11: 1469-1477.
- CATARINO, F., MELO, I. & CARDOSO, J. 1997. *Plantas carnívoras. Um pretexto para a conservação*. Jardim Botânico da Universidade de Lisboa. Museu Nacional de História Natural.
- CHUA, L. S. L. & HENSHAW, G. 1999. *In vitro* propagation of *Nepenthes macfarlanei*. *Journal of Tropical Forest Science* 11: 631-638.
- CORREIA, E. & FREITAS, H. 2002. *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediterranean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 383-390.
- CUENCA, S. & AMO-MARCO, J. B. 2000. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 225-229.

- D'AMATO, P. 2000. Savage garden: Slack-Potting the dewy pine. *Carnivorous Plants Newsletter* 29: 101-102.
- DEBERGH, P. & READ, P. 1991. Micropropagation. In: *Micropropagation, technology and application*. Debergh & Zimmerman (eds.). Kluwer Academic, Publishers, Netherlands. pp 1-15.
- DE KLERK, G.-J., KRIEKEN, W. V. D. & JONG, J. C. 1999. Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35: 189-199.
- ELIASSON, L. 1981. Factors affecting the inhibitory effect of indolacetic acid on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* 51: 23-26.
- FAY, M. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In *Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 32: 267-271.
- FORD, C. S., JONES, N. B. & STADEN, J. V. 2000. Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 366-369.
- HAWKES, J. G., MAXTED, N. & FORD-LLOYED, B. V. 2000. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Kluwer Academic Publishers.
- HOQUE, A., RAHMAN, S. M., ARIMA, S. & TAKAGI, Y. 2001. Efficient *in vitro* germination and shoot proliferation of chilling-treated water chestnut (*Trapa japonica* flerov) embryonal explants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: 369-374.
- HUANG, C. L., HSIEH, M. T., HSIEH, W. C., SAGARE, A. P. & TSAY, H. S. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (*Plumbaginaceae*), an ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf- and inflorescence- node explants. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 220-224.
- IANKOVA, E., CANTOS, M., LINAN, J., ROBEVA, P. & TRONCOSO, A. 2001. *In vitro* propagation of *Angelica panicii* Vauds, an endangered plant species in Bulgaria. *Seed Science & Technology* 29: 477-482.
- MEYER, A. & DEWEVRE, A. 1894. Über *Drosophyllum lusitanicum*. *Botanical Centralblatt* 60: 33-41.
- MÜLLER, J. & DEIL, D. 2001. Ecology and structure of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link populations in the south-western of the Iberian peninsula. *Acta Botanica Malacitana* 26: 47-68.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- NOBRE, J. 1996. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 151-155.
- OCAÑA, M. E., VALDÉS, B., MORENO SOCÍAS E., & PARRA, R. 2000. *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. In: G. Blanca et al. (eds.). *Libro Rojo de la flora Silvestre amenazada de Andalucía*. Tomo II. Especies Vulnerables. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.
- ORTENGA-OLIVENCIA, A., CARRASCO, J. P. & ALCARAZ, J. A. D. 1995. Floral and reproductive biology of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. (*Droseraceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 118: 331-351.
- PAEK, K.-Y. & HAHN, E.-J. 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affected organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus*

- [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 128-132.
- PINHEIRO, C. S. R., MEDEIROS, D. N., MACÊDO, C. E. C. & ALLOUFA, M. A. I. 2001. germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. *Ver. Bras. Frutic.* 23: 413-416.
- QUINTANILHA, A. 1926. O problema das plantas carnívoras. Estudo citofisiológico da digestão no '*Drosophyllum lusitanicum*'. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 2a sér. 4: 44-129.
- ROBERTS, E. H. 1963. An investigation of intervarietal differences in dormancy and viability of rice seeds. *Annals of Botany* 27: 365-369.
- ROMANO, A. & MARTINS-LOUÇÃO, M. A. 1998. Contributos da biotecnologia para a conservação de recursos genéticos vegetais. *Revista de Biologia* 16: 145-155.
- SLACK, A. 1969. *Carnivorous plants*. MIT Press, Cambridge, MA.
- THORPE, T., HARRY, F. & KUMAR, P. 1991. Application of micropropagation to forestry. *In: Micropropagation, technology and application*. Debergh and Zimmerman (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 311-336.
- TILBROOKE, R. D. 1988. Scape and axil cuttings of *Drosophyllum*. *Carnivorous Plants Newsletter* 17:106.
- TOOLE, V. K. & TOOLE, E. H. 1953. Seed dormancy in relation to seed longevity. *Proceedings of International Seed Test Association* 18: 325-328.
- VALDÉS, B. 1996. Elemento endémico en el Campo de Gibraltar. *Almoraima* 15: 13-33.
- ZHOU, K., H.E., S.L., DENG, F. & XIA, B. 2000. Tissue culture of carnivorous plants *Dionaea muscipula* Ellis. *Journal of Plant Resources and Environment* 9: 63-64.
- ZIV, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In: Debergh and Zimmerman (eds.). Micropropagation, technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 45-49.

MICROPROPAGAÇÃO DE ADELFEIRA. CONTRIBUTOS PARA A CONSERVAÇÃO E REPRODUÇÃO DE UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DA SERRA DE MONCHIQUE

R. Almeida, S. Gonçalves & A. Romano

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve,
Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

Almeida, R., Gonçalves, S., Romano, A. (2003). Micropropagação de adelfeira. Contributos para a conservação e reprodução de uma espécie endémica da serra de Monchique. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 29-42.

Rhododendron ponticum subsp. *baeticum* (adelfeira) é um endemismo ibérico confinado às serras de Monchique e Caramulo, onde é protegida desde 1971 na reserva Botânica do Cambarinho. Foi objectivo deste trabalho desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* de adelfeira, com vista à sua reintegração no seu habitat natural (Foia, Serra de Monchique).

A propagação vegetativa por estaca obrigaria à utilização de grande quantidade de material vegetal, obrigando a cortes muito extensos nas plantas existentes. Assim, o uso de plantas micropropagadas é uma abordagem interessante uma vez que se parte de quantidades de material muito reduzidas, permitindo manter as plantas-mãe sem comprometer a sua sobrevivência e normal desenvolvimento. Este aspecto é importante quando se trata de plantas em vias de extinção.

Neste estudo a zeatina revelou-se a citocinina mais eficaz na fase de multiplicação, permitindo obter o maior número de rebentos, tanto a partir de segmentos nodais como de ápices ($3,9 \pm 0,2$ rebentos / cultura). Embora se tenha observado a formação de raízes com a incorporação de auxinas no meio de cultura, a imersão basal dos rebentos em solução concentrada de auxina (AIB, ANA) durante 1 min. permitiu obter frequências de enraizamento superiores (91-100%). As plantas produzidas foram aclimatizadas (33%) e encontram-se em fase de endurecimento no exterior para serem reintroduzidas no campo.

Palavras-chave: adelfeira, conservação *ex situ*, micropropagação, planta em extinção, propagação *in vitro*.

Almeida, R., Gonçalves, S., Romano, A. (2003). Micropropagation of Iberian rose bay. Contribution to the conservation and reproduction of an endemic plant of Monchique mountain. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 29-42.

Rhododendron ponticum subsp. *baeticum* is an endemic plant confined to the mountains of Monchique and Caramulo. It is an endangered species and, therefore, it is of utmost importance the optimization of propagation techniques for this species. The aim of this work was to develop a micropropagation protocol for this species in order to produce plants to reintroduce in its natural habitat (Foia, Serra de Monchique).

The vegetative propagation by cuttings does not seem adequate for propagating this plant since it involves large quantities of plant material. The use of micropropagation is more satisfactory since the explants used are very small, and their excision does not endanger mother-plants.

In this study zeatin was the most efficient cytokinin for shoot multiplication, for both type of explants, apical shoots and nodal segments (3.9 ± 0.2 shoots / culture). For rooting two methods were tested: the inclusion of auxins in the rooting media or the basal dipping of the shoots in auxin solution (IBA, NAA) for 1 min. The basal dipping was more efficient in terms of rooting frequency (91-100%). The *in vitro* produced plants were acclimatized (33%) and are growing outside for hardening before being transplanted to the field.

Key words: endangered species, *ex situ* conservation, Iberian rose bay, *in vitro* propagation, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Os Rododendrons são plantas da família *Ericaceae*, género *Rhododendron*. Trata-se de um género diverso, de árvores e arbustos de folhagem persistente, semi-persistente ou caduca (PAGE & OLDS, 1999). Actualmente existem cerca de 800 espécies e milhares de cultivares, em contraste com 15 espécies conhecidas há um século, sendo a razão deste aumento a facilidade com que hibridizam (MACBOY'S, 1992).

Rhododendron ponticum L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti, é um endemismo ibérico confinado às serras de Monchique e Caramulo (DIAS & NOGUEIRA, 1973-74), onde é protegida desde 1971 na reserva Botânica do Cambarinho (Decreto Lei 364/71). É um representante da flora portuguesa, de raro interesse científico e invulgar beleza decorativa, que se encontra ameaçado de extinção (NEVES, 1964). Segundo MARIZ (1901), a descoberta em Portugal deste *Rhododendron* foi feita em 1799 pelo Conde de Hoffmansegg e pelo Prof. Link, na Serra de Monchique. Esta espécie foi incluída pelo Ministério da Agricultura no relatório da FAO "International Technical

Conference on Plant Genetic Resources" (1996) como uma espécie ornamental da flora espontânea portuguesa, com elevado e imediato interesse económico, e sujeita a erosão genética acelerada. Em Espanha esta planta existe apenas na região da Andaluzia e está catalogada como espécie em perigo de extinção, sendo protegida pelo Decreto 104/94. A área de implantação da espécie nestes locais tem vindo a diminuir nas últimas décadas devido a recolhas exageradas, aos fogos e devido à actividade humana. Esta planta é hoje considerada rara e em perigo de extinção (MEJÍAS *et al.*, 2002).

A serra de Monchique numa extensão de 76000 ha integra-se na Rede Natura 2000, sendo considerada Espaço Natura Grau I. Mais de 14 ecossistemas foram declarados merecedores de protecção especial. A área de implantação da adelfeira, nesta zona, tem vindo a diminuir drasticamente nas últimas décadas devido às grandes pressões antrópicas sofridas, nomeadamente com a introdução indiscriminada de eucalipto (MABBERLEY & PLACITO, 1993), tendo sido considerada planta rara e em perigo de extinção (DIAS, 1986). Presentemente, na Serra de Monchique encontra-se em pequenos aglomerados apenas na zona da Foia.

A adelfeira é um arbusto de copa ampla e densa com folhagem persistente, que pode atingir 3 metros de altura. As flores, violáceo-púrpúreas, estão dispostas em corimbos (PEREIRA COUTINHO, 1939; AFONSO, 1991). Na Foia esta planta floresce em Junho, sendo a sua folhagem venenosa por ingestão (MABBERLEY & PLACITO, 1993). É uma planta com várias possibilidades de utilização como ornamental devido às suas vistosas flores violáceas e ao seu porte. A planta inteira, poderá ser utilizada em projectos de jardinagem e paisagismo, e a sua folhagem e as suas vistosas flores poderão ser utilizadas em arranjos florais (DIAS, 1986; COSTA, 1996; MOLINA *et al.*, 1997).

Dadas as dificuldades de propagação seminal manifestadas pela espécie em condições naturais (MEJÍAS *et al.* 2002), torna-se necessário desenvolver vias alternativas de propagação para a espécie. A propagação vegetativa tradicional por estaca não parece ser a metodologia mais adequada pela grande quantidade de material vegetal necessário, o que obrigaria a cortes muito extensos nas plantas existentes. A micropropagação, utilizando porções de material de reduzidas dimensões, não afecta o normal desenvolvimento das plantas-mãe. A propagação *in vitro*, produzindo elevada quantidade de plantas em reduzido tempo, apresenta-se como uma potencial alternativa para a propagação de espécies de alto valor económico e/ou ecológico, cuja multiplicação pelas vias tradicionais se torna dispendiosa e de difícil aplicação (DEBERGH & ZIMMERMAN, 1991), contribuindo para a conservação de recursos genéticos desta espécie (FAY, 1992; HAWKES *et al.*, 2000).

O uso de métodos biotecnológicos na gestão dos recursos genéticos é no presente uma prática corrente, sendo cada vez mais utilizados na conservação de plantas raras ou em perigo de extinção (SUDHA *et al.*, 1998; BENSON *et al.*, 2000; IANKOVA *et al.*, 2001; BHATIA *et al.*, 2002).

Este trabalho integra-se num projecto de investigação que tem como objectivo específico desenvolver um protocolo para a propagação *in vitro* de adelfeira, com vista à sua reintegração em solos degradados da Serra de Monchique. Como objectivos gerais, este estudo visa a conservação da espécie, a multiplicação em massa por métodos biotecnológicos e a reintrodução das plantas micropropagadas no seu habitat natural.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento *in vitro* foi efectuado a partir de explantados provenientes de ramos recolhidos no campo (Foia, Serra de Monchique) (Est. 1A). Estes foram desinfectados com NaOCl a 25% durante 20 min., seguindo-se três lavagens com água estéril. Após a desinfecção, os ápices vegetativos e os segmentos nodais foram cultivados individualmente em tubos de vidro (25 × 160 mm), contendo 10 ml de meio de cultura, constituído por macronutrientes de ANDERSON (1984) (And), micronutrientes e vitaminas de MURASHIGE & SKOOG (1962), 0,5 mg.l⁻¹ de 6-benziladenina (BA), 20 g.l⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g.l⁻¹ de agar. O pH foi ajustado a 5.7 e o meio autoclavado a 121 °C, 1 atm., durante 20 min. As culturas foram mantidas em condições ambientais controladas a 25±2 °C, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 55 μmol m⁻² s⁻¹.

Decorridos trinta dias após iniciação, os explantados viáveis tinham desenvolvido apenas um rebento (15-24 mm), com 4-5 folhas. Estes foram então separados em ápices e segmentos nodais, e transferidos para meio de multiplicação.

Multiplicação e alongamento de rebentos

Para multiplicação dos rebentos foi testado o meio basal acima referido com combinações de diferentes reguladores de crescimento a diferentes concentrações.

Inicialmente foram testadas as citocininas BA, cinetina, 6-(γ,γ-dimethylallylamino)-purina (2iP) e zeatina, nas concentrações 1,5 e 4 mg.l⁻¹, combinadas com a auxina ácido indolacético (AIA) nas concentrações 0,5 e 1 mg.l⁻¹. Numa fase posterior, foram testadas diversas concentrações de zeatina, combinadas ou não, com o AIA, nomeadamente: zeatina a 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 (mg.l⁻¹) e o balanço zeatina : AIA 1,5:0,5; 3:1; 4:1 e 5:2 (mg.l⁻¹).

Cada período de multiplicação teve a duração de oito semanas, tendo as culturas sido mantidas nas condições anteriormente referidas.

Enraizamento *in vitro*

Nos ensaios de enraizamento utilizaram-se rebentos com 3 cm de comprimento, seleccionados a partir de culturas a crescer no meio base sem reguladores de crescimento durante uma semana (Est. 1C).

Foram testados dois métodos de indução radicular, a incorporação de auxinas no meio de cultura e a imersão basal dos rebentos em solução auxínica concentrada, seguida de cultura em meio sem reguladores de crescimento.

Foram testados dois meios de cultura para expressão e desenvolvimento radicular: And e 1/2And (no qual se reduziu para metade os macronutrientes), suplementados com 1 ou 2 mg.l⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) ou ácido indolacético (AIA).

No método de imersão basal, a base dos rebentos foi imersa em solução de ANA ou AIB (1 g.l⁻¹) durante 2 min., seguindo-se a inoculação dos rebentos em meio de cultura (And e 1/2And) sem reguladores de crescimento. Neste ensaio testou-se a influência de luz ou escuridão durante a primeira semana de enraizamento.

Como recipientes de cultura foram utilizados tubos de vidro (32 × 200 mm) com 20 ml de meio. O período de enraizamento foi de oito semanas nas condições atrás descritas.

Aclimatização

As plântulas com raiz (Est. 1D) foram retiradas do meio de cultura, lavadas dos resíduos de meio e transplantadas individualmente para vasos de 150 ml de capacidade contendo substrato constituído por uma mistura de turfa e vermiculite (2:1, v/v). Após envasamento as plântulas foram colocadas em estufim de aclimatização sob intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25±2 °C. A humidade relativa nas primeiras três semanas foi mantida a 98%, sendo este valor reduzido gradualmente até 70%. Ao fim de oito semanas as plântulas foram transplantadas para vasos de 350 ml de capacidade e foram colocadas em caixas de polietileno transparente com tampa e colocadas no exterior (Est. 1E). Decorridos dois meses foram gradualmente abertas. Posteriormente as plantas foram transferidas para vasos de maior capacidade e colocadas ao ar livre.

Quantificação dos resultados e tratamento estatístico

Para cada meio de multiplicação foram testados 30 rebentos. Decorridas oito semanas registou-se o número de rebentos desenvolvidos por explantado e o comprimento do maior rebento.

Nos ensaios de enraizamento com incorporação de auxinas no meio de cultura, testaram-se 30 rebentos para cada meio de cultura (And e 1/2And), auxina (ANA e AIB) e concentração. No caso da imersão basal em cada uma das combinações, meio de cultura (And e 1/2And), auxina (ANA e AIB) e luz ou escuro, testaram-se 50 rebentos. Ao longo da fase de aclimatização registou-se trimestralmente a percentagem de sobrevivência e o crescimento em altura das plantas.

A análise dos dados foi feita no programa SPSS. Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de variância. Para valores de F

significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $p < 0,05$. Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erro-padrão, sendo os valores significativamente diferentes assinalados com letras diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Multiplicação e alongamento de rebentos

A fase de multiplicação é de grande importância durante o processo de micropropagação, uma vez que o seu objectivo é a produção rápida de órgãos ou outras estruturas que possam ulteriormente regenerar novas plantas (MURASHIGE, 1974). Todas as espécies vegetais requerem um estudo para encontrar a melhor relação de reguladores de crescimento que permita otimizar o seu desenvolvimento *in vitro* (TAJI & WILLIAMS, 1996). O efeito das citocininas varia de acordo com o seu tipo, concentração, tipo de cultura e espécie em estudo. As auxinas podem também ser utilizadas durante a fase de multiplicação em combinação com as citocininas, estimulando o alongamento dos rebentos (MINOCHA, 1987).

Neste trabalho na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura não se verificou a formação de rebentos, tal como foi verificado por McCOWN & LLOYD (1983) noutras espécies de *Rhododendron*.

Conforme se pode observar na Figura 1 a multiplicação de rebentos foi conseguida tanto a partir de ápices como de segmentos nodais. Das quatro citocininas testadas em combinação com o AIA, a zeatina foi a que melhores resultados permitiu relativamente ao número médio de rebentos desenvolvido. O balanço 4 mg.l⁻¹ zeatina + 1 mg.l⁻¹ AIA apresentou resultados significativamente superiores ($p < 0,05$), nos dois tipos de explantados.

Os resultados observados com as citocininas cinetina e BA confirmam resultados anteriores que indicam os rododendrons como não respondendo a estas citocininas sintéticas (FORDHAM *et al.*, 1982). Nos meios contendo zeatina e 2iP observou-se a formação de *callus* basal com posterior regeneração de rebentos adventícios (Est. 1B).

O alongamento dos rebentos foi superior nos meios suplementados com as combinações zeatina:AIA e 2iP:AIA, para os dois tipos de explantados (Fig. 1).

Quando se adicionou apenas zeatina ao meio de multiplicação (Fig. 2), a concentração de 1 mg.l⁻¹ permitiu obter um número de rebentos significativamente superior ($p < 0,05$) para os ápices. Para os segmentos nodais este resultado não foi significativamente diferente do observado com 1,5 mg.l⁻¹ de zeatina. A adição de AIA (4:1, 3:1 e 5:2; mg.l⁻¹) ao meio contendo zeatina não afectou significativamente os resultados.

O tamanho dos rebentos desenvolvidos pelos ápices foi significativamente superior ($p < 0,05$) para as concentrações de 1 e 1,5 mg.l⁻¹ (Fig. 2), enquanto que nos segmentos nodais só foram observadas diferenças significativamente inferiores quando a concentração de zeatina foi mais baixa (0,1 mg.l⁻¹) (Fig. 2). A

adição de auxina ao meio de multiplicação não estimulou o alongamento dos rebentos (Fig. 2).

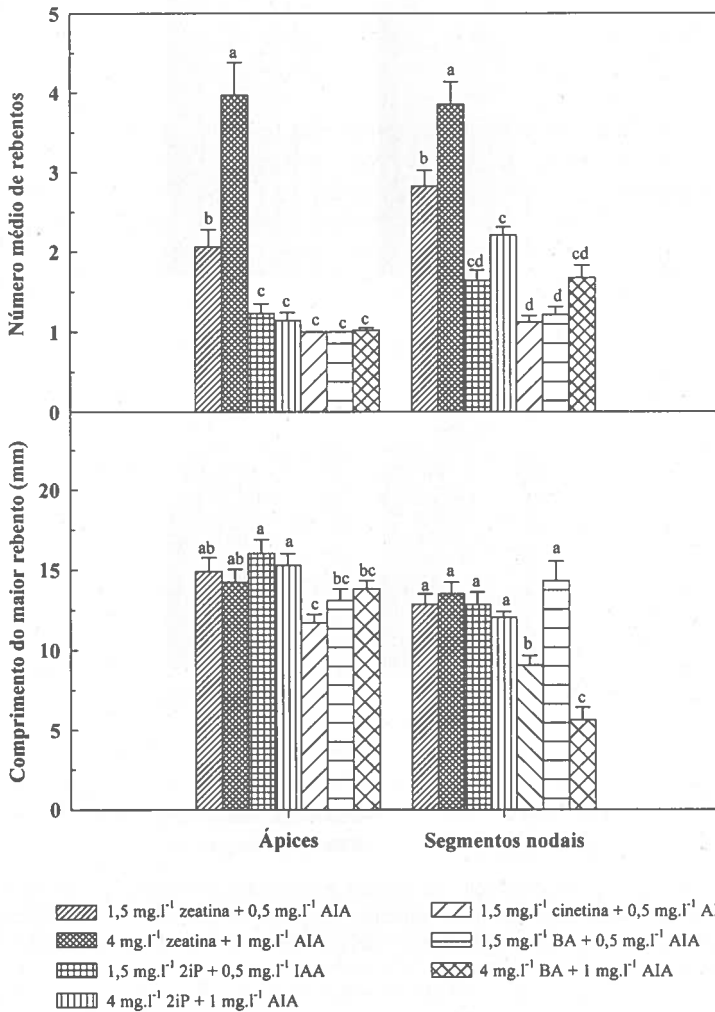


Figura 1. Influência do balanço citocinina:auxina no número de rebentos e no comprimento do maior rebento, no final do período de multiplicação (8 semanas). Para cada tipo de explantado e variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

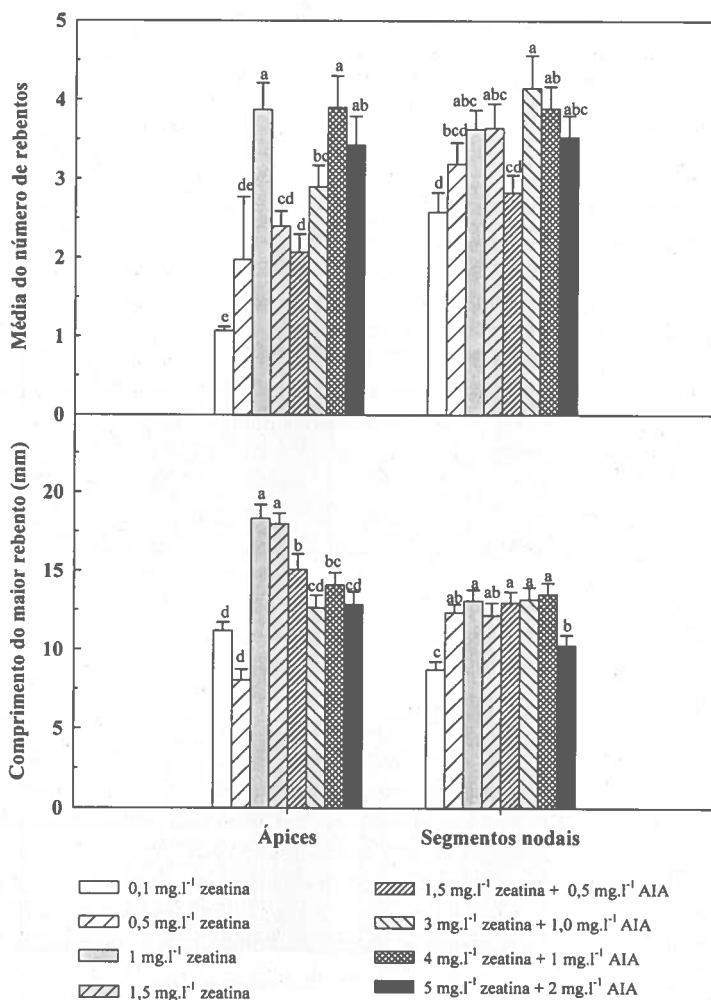


Figura 2. Influência da concentração de zeatina e do balanço zeatina:AIA no número de rebentos e no comprimento do maior rebento, no final do período de multiplicação (8 semanas). Para cada tipo de explantado e variável letras diferentes representam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

No final do período de multiplicação os rebentos com tamanho adequado (cerca de 1,5 cm, Fig. 2) para serem enraizados foram transferidos para meio de cultura sem reguladores de crescimento, onde foram mantidos durante uma semana (Est. 1C). Este procedimento teve como objectivo libertar os rebentos da acção das citocininas tornando-os mais reactivos ao estímulo auxínico (BOLLMARK & ELIASSON, 1986)

Enraizamento *in vitro*

Para que o enraizamento *in vitro* de rebentos micropropagados de adelfeira seja um processo viável torna-se necessário recorrer ao uso de auxinas uma vez que na sua ausência a frequência de enraizamento foi de apenas 10%. Os rebentos inoculados em meio contendo AIA não desenvolveram raízes. Este resultado poderá ter ocorrido devido à acção desta auxina decrescer rapidamente no tempo, quando os meristemas radiculares estão em formação (DE KLERK *et al.*, 1999).

Embora o enraizamento seja principalmente controlado pelas auxinas, outros factores endógenos e exógenos influenciam o sucesso deste processo, nomeadamente o meio de cultura. Neste trabalho verificou-se formação de raízes em todos os meios de cultura suplementados com auxinas. O meio $\frac{1}{2}$ And permitiu obter frequências de enraizamento superiores para ambas as auxinas e concentrações testadas, à excepção de 1 mg.l^{-1} de ANA (Fig. 3).

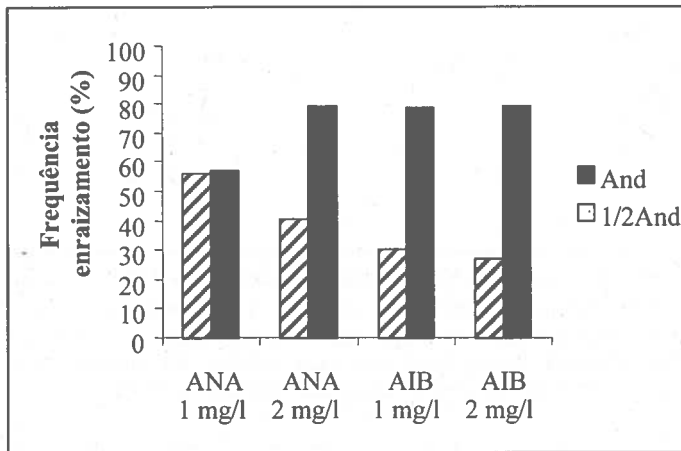


Figura 3. Influência do meio de cultura (And e $\frac{1}{2}$ And) e das auxinas ANA (1 e 2 mg.l^{-1}) e AIB (1 e 2 mg.l^{-1}) na frequência de enraizamento.

A redução dos sais no meio de cultura parece favorecer a formação e desenvolvimento das raízes de *Rhododendron* à semelhança do que tem sido observado em outras espécies lenhosas (KOOI *et al.*, 1999; KAMENICKA & LANAKOVA, 2000; SAADAT & HENNEERTY, 2001).

Relativamente à imersão basal dos rebentos, verificou-se que em qualquer dos casos a frequência de enraizamento foi elevada, variando entre os 91% e os 100% de rebentos enraizados (Tab. 1).

A escuridão durante a primeira semana de enraizamento, não provocou um aumento considerável da frequência de enraizamento, à semelhança de resultados obtidos por CABONI *et al.* (1992) em macieira.

Tabela 1. Efeito do meio basal (And e 1/2And), das auxinas (ANA e AIB, 1 g.l⁻¹) aplicadas por imersão basal dos rebentos, da luz ou escuro, durante a primeira semana de enraizamento, na frequência de enraizamento, número de raízes desenvolvidas por rebento e comprimento da raiz mais longa.

Meio	Auxina	Tratamento	% Enraizamento	Número de raízes	Comprimento da raiz mais longa (mm)
And	ANA	Luz	96	7 ± 1 b	5,86 ± 0,64 bc
And	ANA	Escuro	96	6 ± 1 b	6,02 ± 0,52 c
1/2And	ANA	Luz	91	7 ± 1 b	6,46 ± 0,79 c
1/2And	ANA	Escuro	100	7 ± 0 b	6,04 ± 0,53 c
And	AIB	Luz	93	6 ± 0 b	8,00 ± 0,86 bc
And	AIB	Escuro	94	9 ± 1 a	7,85 ± 0,66 bc
1/2And	AIB	Luz	94	10 ± 1 a	9,29 ± 0,87 b
1/2And	AIB	Escuro	100	10 ± 1 a	14,49 ± 1,29 a

Análise ANOVA

Meio (A)	***	**
Auxina (B)	***	***
Tratamento (C)	ns	ns
A × B	**	***
A × C	ns	**
B × C	ns	**
A × B × C	ns	*

Os valores representam as médias ± ep. Efetuou-se uma análise ANOVA tri-fatorial; ns, *, **, ***, representam não significativo, significativo para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. Efetuou-se uma análise de variância simples e o teste de Duncan (Duncan's New Multiple Range Test) para cada variável. Na mesma coluna valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Utilizando o meio basal 1/2And, AIB e escuro, durante a primeira semana de enraizamento, conseguiu-se obter simultaneamente elevada frequência de enraizamento e elevado número e comprimento das raízes (Tab. 1, Est. 1D).

Aclimatização

A maioria das espécies necessita de um período de aclimatização às novas condições, de modo a garantir que as plantas sobrevivam à transferência para o solo. As dificuldades de aclimatização das plantas produzidas *in vitro* resultam principalmente do fraco controle da perda de água por parte das folhas (PREECE & SUTTER, 1991; ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO, 2003).

A taxa de sobrevivência de plantas micropropagadas de *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* no final do primeiro ano de aclimatização foi de 33%, e o crescimento mais acentuado (25 cm) verificou-se entre os 9 e os 12 meses de aclimatização (Fig. 4).

A fase de aclimatização apresenta-se como um obstáculo ao sucesso de propagação *in vitro* de *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* pelo que se torna importante a optimização de metodologias que permitam o aumento da sobrevivência das plantas micropropagadas.

Novos ensaios de aclimatização estão a decorrer no sentido de serem optimizados estes resultados, bem como as condições de adaptação das plantas ao seu habitat natural.

Presentemente as plantas micropropagadas, com dois anos, encontram-se em fase de endurecimento no exterior (Est. 1F), com vista ao seu transplante para um antigo eucaliptal situado na zona da Foia (Serra de Monchique).

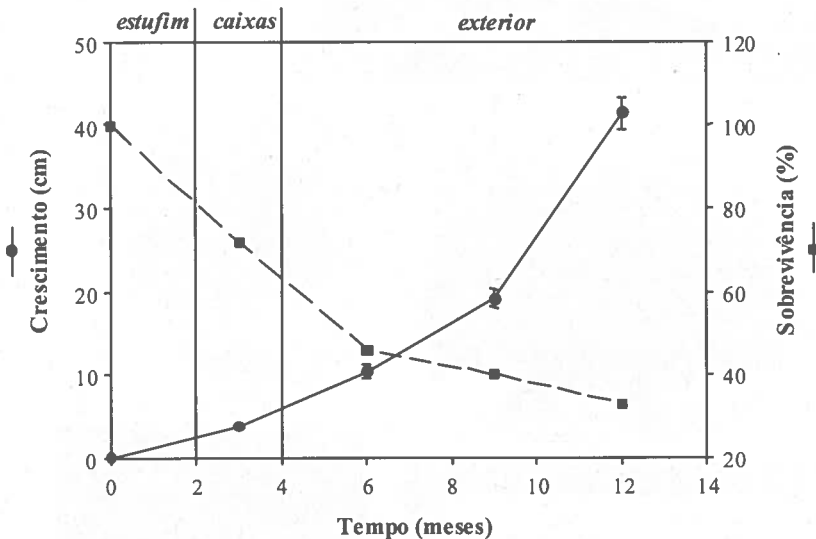
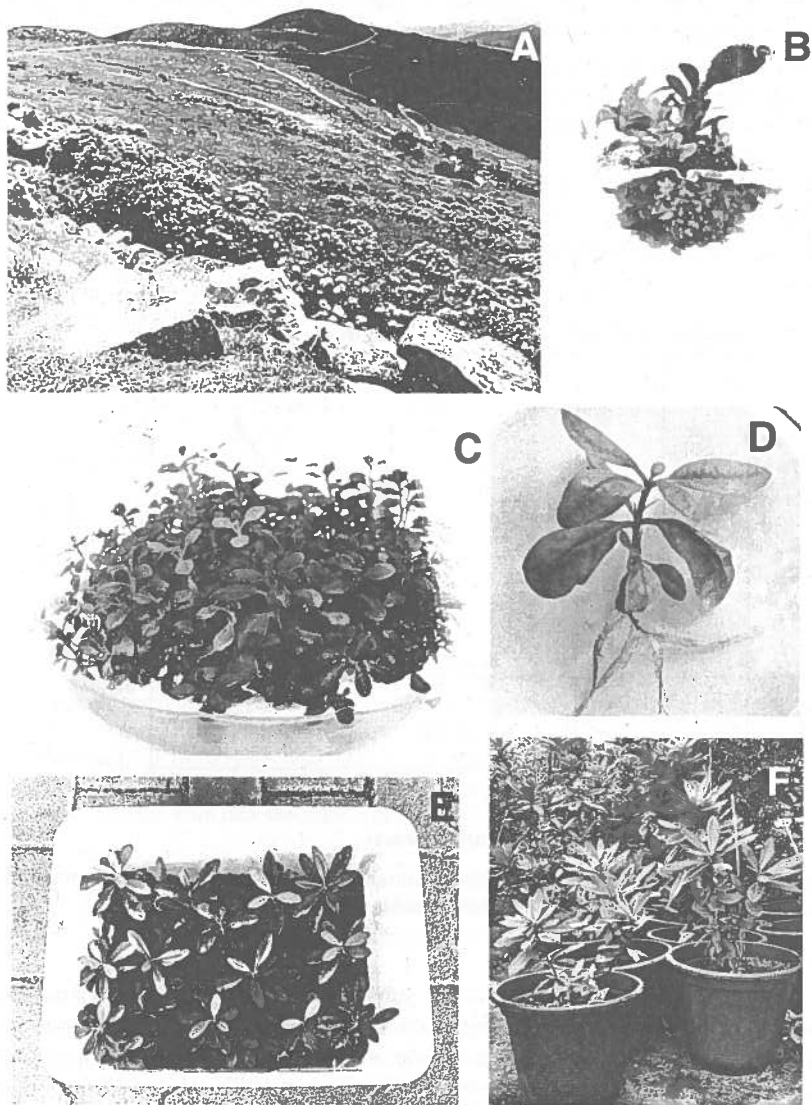


Figura 4. Taxa de sobrevivência e crescimento ao longo do período da aclimatização de plantas micropropagadas de *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*.

CONCLUSÕES

A adelfeira (*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*) pode ser cultivada *in vitro* em meio de cultura suplementado com zeatina. Os rebentos micropropagados podem ser enraizados recorrendo à imersão basal dos rebentos em AIB (1 g.l^{-1}) e posterior inoculação em meio 1/2And, com 100% de sucesso. Contudo, a fase de aclimatização necessita ser optimizada de forma a incrementar a percentagem de plantas sobreviventes. Para tal pretendem-se realizar ensaios de enraizamento *ex vitro*.

Os resultados obtidos permitem perspectivar a utilização, com sucesso, destas metodologias, demonstrando como a biotecnologia vegetal pode ser um contributo relevante na conservação e gestão dos recursos genéticos vegetais.



Estampa 1. Diferentes aspectos do processo de propagação *in vitro* de adelfeira. A - Plantas de adelfeira em flor no seu habitat natural (Fóia-Monchique); B - Cultura em fase de multiplicação, sendo visíveis numerosos rebentos desenvolvidos a partir do *callus* basal; C - Rebentos aptos a serem enraizados; D - plântula enraizada *in vitro*; E - Plantas no final do primeiro mês de aclimatização; F - Plantas com dois anos em fase de endurecimento ao ar livre.

AGRADECIMENTOS

Trabalho desenvolvido no âmbito do projecto "Micropropagação de adelfeira (*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*) e sua reintrodução em solos degradados na serra de Monchique", financiado pelo Programa AGRO Medida 8 - Acção 8.1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, M. L. R. 1991. *Plantas do Algarve*. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza. 113 pp.
- ANDERSON, W. C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 343-347.
- BENSON, E. E., DANAHAR, J. E., PIMBLEY, I. M., ANDERSON, C. T., WAKE, J. E., DALEY, S. & ADAMS, L.K. 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodivers. Conserv.* 9: 711-726.
- BHATIA, P., BHATIA, N. P. & ASHWATH, N. 2002. *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): a rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biodivers. Conserv.* 11: 1469-1477.
- BOLLMARK, M. & ELIASSON, L. 1986. Effects of exogenous cytokinins on root formation of pea cuttings. *Physiol. Plantarum* 68: 662-666.
- CABONI, E., BOUMIS, G. & DAMIANO, C. 1992. Effects of phenols, gibberellic acid and carbohydrates on the rooting of the apple rootstock M9 Jork. *Agronomie* 12: 789-794.
- COSTA, J. 1996. Flora expontânea – Boas perspectivas em jardinagem e restauro de ecossistemas degradados, *Resumos do 1º Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais, Associação Portuguesa de Horticultura*, Vilamoura. pp. 25.
- DE KLERK, G., KRIEKEN, W. D. V. & JONG, J. C. 1999. Review the formation of adventitious roots: news concepts, new possibilities. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 35: 189-197.
- DEBERGH, P. C. & ZIMMERMAN, R. H. (eds). 1991. *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- DIAS, M. 1986. A Flora e a vegetação do Algarve – Achegas para o seu conhecimento e protecção. *Actas do 4º Congresso do Algarve, 2º Vol. Racal Clube*. pp. 705-710.
- DIAS, M. M. P. & NOGUEIRA, G. B. S. 1973-74. Notas sobre *Rhododendron ponticum* L. ssp. *baeticum* (Boiss. & Reuter) Handel-Mazzetti no Conselho de Vouzela. *Boletim da Sociedade Broteriana*. Série 2, 47 (sup.): 125-132.
- FAY, M. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant* 28: 1-4.
- FORDHAM, I., STIMART, D.P. & ZIMMERMAN, R.H. 1982. Axillary and adventitious shoot proliferation of ex-bury azaleas *in vitro*. *Hort. Sci.* 17:738-739.
- HAWKES, J. G., MAXTED, N. & FORD-LLOYED, B. V. 2000. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- IANKOVA, E., CANTOS, M., LIÑAN, J., ROBEVA, P. & TRONCOSO, A. 2001. *In vitro* propagation of *Angelica panicii* Vauds., an endangered plant species in Bulgaria. *Seed Sci. Tecnol.* 29: 477-482.
- KAMENICKA, A. & LANAKOVA, M. 2000. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of magnolia *in vitro*. *Acta Physiol. Plant.* 22: 129-134.

- KOOI, L. T., KENG, C. L. & HOE, C. T. K. 1999. *In vitro* rooting of sentag shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 35: 396-400.
- MABBERLEY, D. J. & PLACITO, P. J. 1993. *Algarve Plants and Landscape. Passing tradition and ecological change*. Oxford University Press. 300 pp.
- MACOBOY'S, S. 1992. What shrub is that? – Weldon Publishing. 368 pp.
- MARIZ, J. 1901. Subsídios para o estudo da flora portuguesa – *Caprifoliaceas, Vacciniaceas e Ericineas*. In: Neves C.M.B. 1964. Uma preciosidade botânica a proteger: a loendreira ou adelfeira (*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*). *Gazeta das Aldeias* 2512: 99-101.
- MCCOWN, B. H. & LLOYD, G. D. 1983. A survey of the response of *Rhododendron* to *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2: 77-85.
- MEJÍAS, J. A., ARROYO, J. & OJEDA, F. 2002. Reproductive ecology of *Rhododendron ponticum* (*Ericaceae*) in relict Mediterranean populations. *Bot. J. Linn. Soc.* 140: 297-311.
- MINOCHA, S. 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. In: J. Bonga e D. Durzan (eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, vol 1. Martins Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 50-66.
- MOLINA, H. A., PÉREZ, P. J., CUETO, R. M. & PALLARÉS, N. A. 1997. Utilización de flora autoctona com fines ornamentales. *Actas de Horticultura, Vol. 17, II Congresso Iberoamericano III Congresso Ibero de Ciências Horticolas*, Vilamoura. pp. 142-146.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, E. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- NEVES, C. M. B. 1964. Uma preciosidade botânica a proteger: a loendreira ou adelfeira (*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*). *Gazeta das Aldeias* 2512: 99-101.
- NORTON, C. R. & NORTON, M. E. 1989. *Rhododendrons* In: Y. P. S. Bajaj (ed). *Bio-technology in Agriculture and Forestry*, vol. 5 Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 429-434.
- PAGE, S. & OLDS, M. 1999. *Botanica: the illustrated A-Z of over 10000 garden plants and how to cultivate them*, 3rd edition. Random House. 1020 pp.
- PEREIRA COUTINHO, A. X. P. 1939. *Flora de Portugal*, 2^a ed., Bertrand, Lisboa. pp. 349.
- PREECE, J. & SUTTER, E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: P. Debergh & R. Zimmerman (eds). *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 71-93.
- ROMANO, A. & MARTINS-LOUÇÃO, M. A. 2003. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plants. *Acta Hort.* (no prelo)
- SAADAT, Y. A. & HENNEERTY, M. J. 2001. The effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on the rooting performance of Persian walnut (*Juglans regia* L.) microshoots. *Acta Hort.* 544: 473-480.
- SUDHA, C. G., KRISHNAN, P. N. & PUSHPAHGADAN, P. 1998. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. *In vitro Cell Dev. Biol. – Plant* 34: 57-63.
- TAJI, A. M. & WILLIAMS, R. R. 1996. Overview of plant tissue culture. In: Taji, A. & Williams, R. (eds). *Tissue culture of Australian plants*. Armidale, University of New England.

A CONSERVAÇÃO DE *COREMA ALBUM* NO LITORAL ATLÂNTICO DA PENÍNSULA IBÉRICA; A INFLUÊNCIA DE DISPERSORES ANIMAIS NA REGENERAÇÃO NATURAL

A. Clavijo¹, M. C. Díaz Barradas¹, M. Zunzunegui¹, F. Ain-Lhout¹, L. Alvarez Cansino¹,
O. Correia² & F. García Novo¹

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apartado 1095. 41080 Sevilla. ESPANHA. diaz@us.es

²Centro de Ecologia e Biologia Vegetal. Departamento de Biologia Vegetal. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Bloco C2. Campo Grande. 1700 Lisboa.

Clavijo, A., Díaz Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Alvarez Cansino, L., Correia, O. & García Novo, F. (2003). A conservação de *Corema album* no litoral atlântico da Península ibérica; a influência de dispersores animais na regeneração natural. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 43-56.

Corema album é uma espécie dióica endémica da costa Atlântica da Península Ibérica. Esta espécie cresce em solos dunares que estão muito ameaçados em diversos pontos da sua área de distribuição, devido à crescente pressão urbanística das zonas litorais e às reflorestações intensas com pinheiros, acácias, retamas e outras espécies exóticas. Com a finalidade de poder estabelecer no futuro planos de conservação e regeneração desta espécie, é preciso conhecer a sua biologia reprodutiva e a capacidade de regeneração natural.

Os indivíduos femininos produzem bagas esféricas, de cor branca ou suavemente rosada, ricas em água e açúcar, que são consumidas por numerosos animais, especialmente coelhos, raposas e diversas aves como melros e gaivotas. A produção de frutos é muito variável, quer entre zonas, quer entre indivíduos da mesma zona. O número de frutos/m² de cobertura de planta varia entre 200 em indivíduos velhos da praia de Monte Velho em Santo André e na mata de Monte Gordo ambos em Portugal, até valores de 10.000 em São Jacinto (Portugal) e no Asperillo (Espanha).

Na zona de Asperillo estudámos a germinação natural e pudemos observar que no Outono há numerosos frutos sobre a areia, especialmente junto a plantas femininas adultas, mas também há sementes nos excrementos fundamentalmente de coelhos. Após as primeiras chuvas começam a germinar as novas plântulas mas com um padrão de distribuição muito

irregular, geralmente em zonas abertas associadas a latrinas destes animais. A probabilidade de sobrevivência destas plântulas depende do padrão de distribuição das chuvas, cerca de 80% morre ainda na fase de cotilédones e só um 1-2% das plântulas pode chegar ao ano seguinte.

Os ensaios de germinação em condições de laboratório, foram realizados com frutos recolhidos em Setembro, dos quais foram extraídas as sementes. Estas foram sujeitas a diferentes tratamentos experimentais: sementes sem qualquer tratamento, tratamento mecânico e tratamento químico com ácido clorídrico. Foram também isoladas sementes a partir de excrementos de animais colhidos no campo (coelhos e raposas) que foram postas a germinar nas mesmas condições experimentais das anteriores. As sementes foram controladas diariamente ao longo de 5 meses. Não se verificou germinação nas sementes procedentes dos frutos em qualquer dos tratamentos e só as sementes provenientes de excrementos de animais germinaram (14% para coelhos e 6% raposas).

Estes resultados permitem demonstrar que a regeneração natural de *C. album* está completamente dependente de vectores animais que actuam como elementos facilitadores, permitindo a quebra de dormência. De facto, em zonas mais perturbadas onde os animais são raros as populações estão formadas por indivíduos muito velhos sem regeneração natural. É importante investir em novas metodologias de germinação, para obtenção de plantas em viveiros, que possam ser usadas em programas de repovoamento desta espécie com vista à sua conservação nos ecossistemas litorais.

Palavras chave: baga, coelhos, dispersão, dunas, esforço reprodutor, germinação, raposas.

Clavijo, A., Díaz Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Alvarez Cansino, L., Correia, O. & García Novo, F. (2003). The conservation of *Corema album* in the Atlantic coast of the Iberian Peninsula, the role of animal dispersers for its natural regeneration. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 43-56.

Corema album is a dioecious species, endemic of the Atlantic coast of the Iberian Peninsula. This species grows on sandy soils, which are severely in regression in many places due to the increasing urbanistic pressure in many coastal areas and to the plantation of large areas with pines, acacias and other exotic species. With the aim to establish conservation and regeneration projects it is important to study the reproductive biology and the natural regeneration of this species.

Female plants produce white berries in summer, rich in water and sugar, which are eaten by several animals, as rabbits,

foxes and birds like seagulls and blackbirds. Fruit production is variable, both between zones and plants of the same area. The number of fruits per square meter ranges from 200 in old individuals of Monte Velho in St. André and Monte Gordo, to 10.000 in some plants of São Jacinto and Asperillo.

Natural regeneration was studied in the Asperillo where many fruits lie on the sands (under female plants) in autumn and there are also many seeds in animal faeces (especially from rabbits and foxes). Seedling emergence occurs after the first rains but with an irregular distribution pattern. The probability of seedling survival depends on rainfall distribution, and microhabitat characteristics, but more than 80% of seedlings die during the first weeks and only 1-2% can reach the following year.

To develop germination experiments, fruits were collected in the field in September of 2001 and transported to the laboratory where seeds were isolated. They were subjected to different experimental treatments: control (without any treatment), mechanical and acid scarification. Seeds were also isolated from animal faeces (rabbits and foxes). All the seeds were placed in humid Petric plates and controlled every day for 5 months. There was no germination in the seeds obtained from the fruits independent of the treatment, only seeds from animal faeces germinated (14% for rabbits and 6% for foxes).

These results show that natural regeneration in *C. album* is dependent of animal dispersers. In fact in more disturbed areas where animals are scarce, populations of *C. album* are formed by old plants without natural regeneration. It is necessary to invest in new methodologies to improve germination in order to obtain seedlings of this species for plantations in natural coastal habitats.

Keywords: berry, dispersion, fox, germination, rabbit, reproductive effort, sand dunes.

INTRODUÇÃO

Na natureza, os recursos são limitados para a maior parte dos organismos, sendo canalizados preferencialmente pelas diferentes funções vitais. No caso das plantas, os órgãos fotossintéticos são os elementos produtores de energia química posteriormente distribuída pelas diferentes funções, como o crescimento e a reprodução. De um modo geral, um maior gasto em reprodução, isto é uma maior produção em frutos e sementes, tem como consequência uma redução noutras funções como o crescimento vegetativo e a própria sobrevivência (STEARNS, 1989, GARCÍA & EHRLÉN 2002, OBESO 2002).

Além disso, a dispersão e germinação das sementes e a sobrevivência das plântulas, são factores cruciais na regeneração natural das populações vegetais.

Nestas etapas, onde existe uma maior taxa de mortalidade, as condições ambientais são particularmente importantes (HARPER 1977).

Muitas espécies de plantas superiores apresentam uma dispersão de sementes por animais frugívoros, com os quais mantêm relações de tipo mutualista, originando processos de coevolução (JANZEN 1983, HERRERA, 1982, 1987). As plantas proporcionam aos animais substâncias nutritivas e água e estes por sua vez, actuam como agentes de dispersão. As sementes de espécies com frutos suculentos são dispersas via defecação ou regurgitação dos animais que consomem estes frutos, chegando a sítios muito diversos conferindo-lhes grande capacidade de colonização de diferentes habitats. Em teoria, um animal será um bom agente de dispersão para uma planta, se for capaz de levar as sementes a sítios onde as plântulas têm uma maior probabilidade de sobreviver (CALVIÑO 2002) ou transportá-las a novos habitats suscetíveis de ser colonizados.

As dunas litorais são exemplos clássicos onde ocorrem processos de sucessão primária. Nestes ambientes a deposição de areias deixa novos sítios a descoberto, deste modo uma planta pioneira nestes habitats deverá ser capaz de colonizar as superfícies dunares recentemente expostas.

Apesar da sua aparente homogeneidade, as dunas litorais mostram uma notável heterogeneidade, espacial e temporal (DAVY & FIGUEROA 1993). Dada a sua heterogeneidade, GARCÍA NOVO *et al.* (in press) consideram as manchas de vegetação nas dunas como ilhas ambientais que podem ser estudadas dentro de um modelo de metapopulações com imigrações e extinções recorrentes. Neste contexto, os agentes de dispersão permitem a conectividade entre as manchas e a persistência dessas metapopulações.

Na Península Ibérica muitos destes sistemas dunares estão a sofrer uma pressão antropogénica crescente, fundamentalmente com fins urbanísticos e recreativos, o que origina que essa associação entre plantas e animais que actuam de agentes de dispersão esteja a desaparecer de maneira alarmante.

Corema album (L.) D. Don (*Empetraceae*) é um arbusto dióico, endémico dos sistemas dunares da costa atlântica da Península Ibérica. No Verão as plantas femininas produzem frutos carnudos, bagas brancas ou suavemente rosadas que são consumidas pelos animais e também pelas populações humanas das zonas litorais. Esta espécie está ameaçada em muitas zonas da sua área de distribuição devido à crescente degradação das zonas litorais e às reflorestações intensas com pinheiros, acácias, retamas e outras espécies exóticas. Muitas populações estão fragmentadas (CLAVIJO *et al.* in press), e às vezes reduzidas a poucos indivíduos velhos de grandes dimensões.

Com vista ao estabelecimento no futuro de planos de conservação e regeneração desta espécie, os objectivos deste trabalho foram os seguintes:

1. Estudar a biologia reprodutiva de *Corema album*.
2. Estudar a sua capacidade de regeneração natural.

3. Avaliar os factores que controlam a dispersão das sementes e a sua germinação, quer no campo quer em laboratório.
4. Estudar a distribuição e sobrevivência das plântulas em condições naturais.

MATERIAL E MÉTODOS

Corema album

Corema album (L.) D. Don (camarinha) é um arbusto dióico, com polinização anemófila e folhas ericoides, com uma altura média de 40 a 50 cm, podendo atingir vários metros de extensão lateral. A distribuição dos sexos e a possível existência de dimorfismo sexual a nível morfológico foram estudados ao longo da sua área de distribuição por DÍAZ BARRADAS *et al.* (2000). Ocasionalmente, encontraram-se alguns indivíduos com flores hermafroditas, mas só na zona do Asperillo em Huelva e na mata de Monte Gordo no Algarve (DÍAZ BARRADAS *et al.* 2002). A biologia reprodutiva desta espécie foi estudada por GUITIÁN *et al.* (1997), na zona de Camariñas (Galiza).

Os indivíduos femininos de *Corema album* produzem, durante o Verão, frutos suculentos, de cor branca ou suavemente rosada, com 6,6 mm de diâmetro e uma polpa rica em água (75% do peso fresco) e açúcar (77,1% do peso seco dos frutos), dados obtidos para as populações da Andaluzia estudadas por HERRERA (1987). Estes frutos são consumidos por diferentes vertebrados, como coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), raposas (*Vulpes vulpes*), melros (*Turdus merula*) e gaivotas (*Larus cachinnans*). Na época estival este recurso pode ser muito importante para os animais como fonte de água, sobretudo nas zonas de clima mediterrânico onde a chuva é muito escassa no verão. Cada fruto contém geralmente três sementes com 9,9 mg de peso (HERRERA, 1987) e $0,48 \pm 0,01$ mm de comprimento cada uma (CALVIÑO, 2002), com um endocarpo lenhoso, extremamente rijo.

ÁREA DE ESTUDO

Ao longo de toda a área de distribuição de *C. album* escolheram-se seis populações representativas: Camariñas, São Jacinto, Fonte da Telha na costa da Caparica, praia de Monte Velho em St. André, mata de Monte Gordo (Vila Real de St. António) e Asperillo (costa de Huelva). A localização das zonas em estudo na costa Atlântica da Península Ibérica e o respectivo diagrama ombrotérmico encontram-se representados no mapa da Figura 1.

A zona do Asperillo, com a maior população de *C. album* da costa da Andaluzia no Parque Natural de Doñana, foi seleccionada para a realização de estudos sobre a germinação natural no campo, e aqui foram também colhidos frutos maduros e excrementos de raposas e coelhos, para os ensaios de germinação no laboratório.

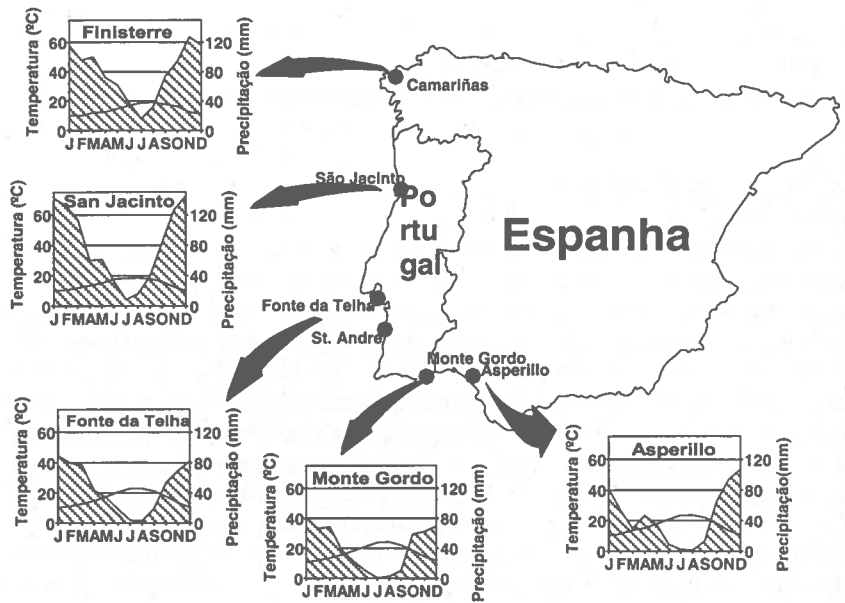


Figura 1. Localização das zonas de estudo na costa Atlântica da Península Ibérica e diagrama ombrotérmico de cada uma das zonas estudadas.

MÉTODOS

Em cada zona de estudo mediu-se a densidade e cobertura de todos os indivíduos de ambos sexos em transectos com 10 parcelas de 10 x 10 m cada um, separadas 10 m entre si. Em cada transecto escolheram-se aleatoriamente 10 indivíduos de cada sexo onde foram realizadas medidas do Índice de Área Foliar (LAI ou Leaf Area Index), com o LAI-2000 (LI-COR). A metodologia utilizada está descrita em DÍAZ BARRADAS *et al.* (2000) e CLAVIJO *et al.* (in press).

No final de Maio princípio de Junho, fez-se uma estimativa da produção de frutos e do tamanho dos mesmos, tendo sido recolhidos os frutos maduros em Setembro para a sua pesagem. De cada zona, escolheram-se aleatoriamente 100 frutos que foram pesados em blocos de 10.

Para estimar a produção de frutos, escolheram-se em cada zona, 10 indivíduos femininos isolados representativos da população, mediu-se em cada um o diâmetro maior e menor da copa com o fim de estimar a cobertura (tomando uma elipse como forma da projecção, que corresponde à das plantas isoladas). Na copa de cada um, tomou-se, aleatoriamente, um sector de 50x50 cm de superfície onde foram contados todos os frutos. Considerando que *C. album* tem uma forma de crescimento em monocamada e que a distribuição de frutos é homogénea em toda a superfície, pode-se desta forma estimar a produção total dos frutos e a produção por m² de copa. Em cada uma destas plantas, colheu-se uma amostra

aleatória de frutos que foram pesados em fresco e em seco para comparar as diferentes zonas.

Na zona do Asperillo seleccionaram-se três microhabitats para os estudos de germinação natural, (i) uma zona no alto da duna, com escassa cobertura vegetal, (ii) uma zona baixa, entre dunas com maior cobertura de *C. album* e de outras espécies fundamentalmente *Pinus pinea* (pinheiro manso) tipo arbustivo, *Halimium halimifolium* (sargaça) e *Stauracanthus genistoides* (tojo) e (iii) ainda na zona baixa, mas junto das copas de indivíduos adultos de *C. album*. Em cada um destes microhabitats realizou-se a seguinte amostragem:

1. Zona alta - foram realizados dois transectos paralelos de 15 quadrados de 1 m², distanciados de 1 m.
2. Zona baixa - com cobertura vegetal e distribuição aleatória foi realizado um transecto de 15 quadrados de 1 m², distanciados de 1 m.
3. Na mesma zona baixa, seleccionaram-se 15 quadrados situados junto do limite das copas de indivíduos de *C. album* adultos.

Em cada quadrado registou-se o número de plântulas de *C. album* em Janeiro, Maio e Setembro de 2001.

Em Setembro de 2001, também na zona de Asperillo, colheram-se frutos maduros das plantas femininas de *C. album* e também excrementos de coelhos que continham sementes e de raposas com restos de frutos e sementes. Todo este material foi levado para o laboratório, onde as sementes foram isoladas e contadas.

As 4500 sementes extraídas dos frutos maduros foram sujeitas a dois tratamentos experimentais: controlo, sementes sem qualquer tratamento, tratamento mecânico, por escarificação com areia e tratamento químico, com ácido clorídrico. Estas últimas foram tratadas com o ácido concentrado durante 15 minutos e posteriormente lavadas cuidadosamente.

As 1500 sementes extraídas dos excrementos (75% de coelhos e 25% de raposa) foram isoladas e lavadas. No caso dos coelhos, fez-se uma contagem em 120 excrementos e em média cada excremento continha 2,93 sementes, com um desvio de 2,15. Também obtivemos sementes a partir de dejectos de coelhos do ano anterior (Verão de 2000) que tinham sido colhidas no campo e armazenadas no laboratório.

Todas as sementes foram colocadas a germinar a temperatura ambiente, em caixas de Petri, com papel de filtro saturado em água (300 sementes/placa) e controladas diariamente ao longo de 5 meses. Foram colocadas réplicas de todos os tratamentos no frigorífico a 4 °C, para testar se as temperaturas baixas tinham efeito sobre a germinação.

RESULTADOS

A cobertura vegetal e LAI dos indivíduos femininos, a produção de frutos e o peso fresco dos mesmos nas seis localidades estudadas estão resumidos na

Tabela 1. A população de Monte Gordo formada por indivíduos velhos, com grande cobertura, apresenta a menor produção de frutos e de menor tamanho. Além disso, muitos dos frutos produzidos não chegam a desenvolver-se e abortam. Pelo contrário, as populações de Camariñas e São Jacinto, constituídas por indivíduos jovens, com valores de cobertura e de LAI inferiores, apresentam uma maior produção de frutos e de maior tamanho, principalmente a população de São Jacinto. A maior produção e peso dos frutos foi encontrada no Asperillo, com um valor médio de 6978 frutos/m² de cobertura vegetal e um peso fresco de 0,51 g/fruto.

Observa-se que, numa mesma população, a produção de frutos é muito variável, plantas aparentemente muito semelhantes em termos estruturais, apresentam um número muito elevado de frutos e outras uma produção muito baixa, o que explica os valores tão elevados dos desvios em todos os casos estudados (Tabela 1).

O peso fresco dos frutos é maior na população do Asperillo, não existindo contudo diferenças significativas. Somente em Monte Gordo o peso dos frutos é significativamente menor que nas outras zonas.

Tabela 1. Valores médios de cobertura vegetal (m² /planta) e LAI (índice de área foliar, m².m⁻²) dos indivíduos femininos, produção de frutos (nº de frutos/m² planta) e peso fresco dos frutos (g/fruto) nas seis localidades estudadas (os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão).

Localidade	Cobertura da copa (m ² /planta)	LAI (m ² .m ⁻²)	Produção de frutos (Nº de frutos/m ² planta)	Peso fresco (g/fruto)
Camariñas (Espanha)	0,8	1,50 (0,41)	1480 (520)	0,29 (0,050)
São Jacinto (Portugal)	0,5	1,55 (0,48)	6120 (3630)	0,34 (0,041)
Caparica (Portugal)	1,8	2,61 (0,60)	4600 (2570)	0,42 (0,037)
St. André (Portugal)	1,6	2,36 (0,69)	1930 (900)	0,31 (0,025)
Mte. Gordo (Portugal)	2,6	-----	500 (225)	0,053 (0,01)
Asperillo (Espanha)	1,3	1,69 (0,51)	6978 (4142)	0,51 (0,050)

A partir dos dados da Tabela 1 e dos estudos de HERRERA (1987) sobre a composição dos frutos (77,1% açúcares não estruturais, 5,8% lípidos, 2,2% de proteínas, 11,2% de fibra sobre peso seco), pode fazer-se um cálculo do esforço reprodutor dos indivíduos femininos em *C. album*. Os resultados para as populações de Asperillo encontram-se na Tabela 2. Pode observar-se que o esforço reprodutor médio dos indivíduos femininos é muito grande; uma planta

feminina pode apresentar cerca de 2 kg de frutos/m² de cobertura vegetal, o que equivale a 470 g de peso seco, com um conteúdo em açúcar de 360 g. A relação entre a biomassa de frutos e a biomassa de folhas é de 0,9.

Tabela 2. Cálculo do esforço reprodutor em indivíduos femininos do Asperillo. As alíneas permitem ajudar a explicar os cálculos efectuados.

a) Produção média de frutos (nº frutos/m ²)	6978
b) Peso fresco (g/fruto)	0,27
c) Peso fresco frutos (g/ m ²) a x b	1884
d) % de água dos frutos	75%
e) Peso seco frutos (g/ m ²) c x (100-d)	471
f) Açúcar dos frutos (g/ m ²)	363
g) Lípidos dos frutos (g/ m ²)	27
h) Proteínas dos frutos (g/m ²)	10
i) Fibra dos frutos (g/m ²)	52
f) Esclerofilia folhas (mg/cm ²)	32
g) Peso seco folhas (g/ m ²) LAI x f	540
h) Peso seco frutos/ P.s. folhas e / g	0,87

Os resultados da germinação natural na zona do Asperillo indicam que a germinação é maior nas zonas abertas, sem cobertura vegetal (Tabela 3), o que geralmente corresponde às latrinas dos coelhos. Contudo, o êxito reprodutor nessas zonas é muito baixo, e a maior parte das plântulas morre ao chegar a Primavera, pois logo que exista um período de alguns dias sem precipitação a superfície da areia seca rapidamente e pode atingir temperaturas muito elevadas, superiores aos 50°C. Este período de stress para as plântulas aumenta ainda com a chegada do Verão e as poucas sobreviventes morrem durante a estação estival.

Tabela 3. Germinação em condições naturais e mortalidade das plântulas em diferentes micro-habitats no Asperillo ao longo do ano 2001.

Microhabitat	Densidade de plântulas (Nº/m ²) Janeiro	% Mortalidade em Maio	% Mortalidade em Setembro
Zona alta 1	10,4	97,1	100
Zona alta 2	5,07	92,1	98,7
Zona baixa	1,07	93,8	100
Margem das copas	1,7	42,3	69

Os resultados da Tabela 3 indicam que nas zonas abertas poucas plântulas podem atingir o Outono seguinte. Contudo, essa probabilidade aumenta notavelmente para as plântulas que germinaram sob a influência das copas dos indivíduos adultos que exercem uma melhoria das condições microclimáticas na área da sua influência. É nestas manchas de indivíduos adultos de *C. album* que o êxito reprodutor, medido como a taxa de sobrevivência das plântulas, atinge os valores mais elevados, cerca de 30% de taxa de sobrevivência.

Nas experiências de germinação no laboratório, as sementes só começaram a germinar um mês depois do início do estudo. Contudo, só germinaram as sementes obtidas a partir de excrementos de animais, principalmente de coelhos. Os resultados foram nulos nas sementes extraídas directamente dos frutos, independentemente do tratamento. Na Figura 2 apresentam-se os resultados das experiências de germinação em valores diários absolutos (Figura 2a) e acumulados (Figura 2b).

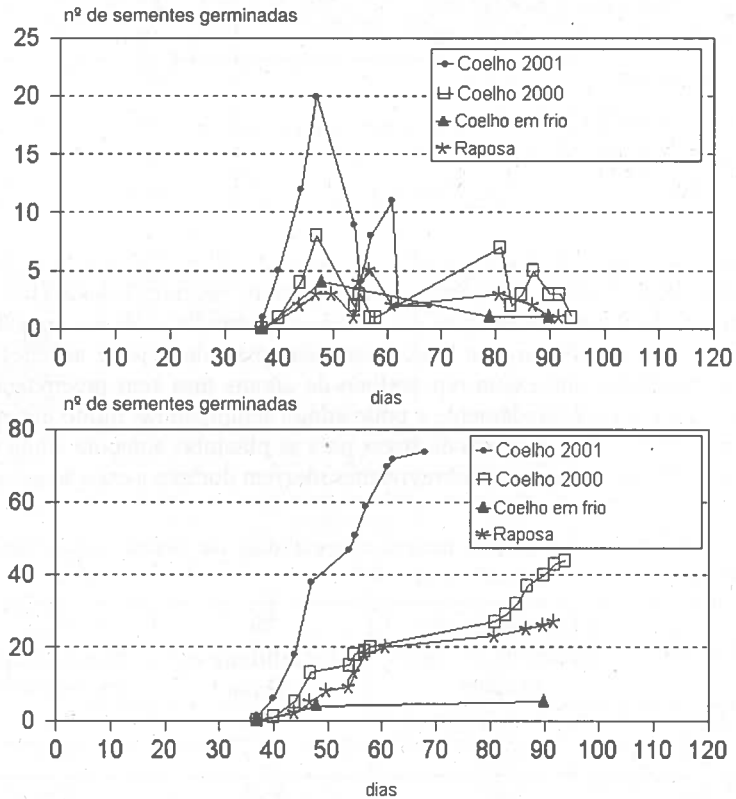


Figura 2. Resultados das experiências de germinação no laboratório. Na Figura 2a apresenta-se o número de sementes germinadas por dia e na Figura 2b o número acumulado ao longo do período de estudo.

No caso das sementes colocadas no frio, no frigorífico, só germinaram as sementes extraídas dos dejectos dos coelhos, mas os valores foram muito inferiores à germinação ocorrida à temperatura ambiental. As sementes obtidas a partir de dejectos de coelhos, colhidos no ano anterior (2000), também germinaram, mas em número inferior às colhidas em 2001.

A percentagem máxima de germinação obtida nas nossas experiências foi de 14% nas sementes extraídas de excrementos de coelhos de 2001 e de 2% nas sementes extraídas dos excrementos das raposas. Os resultados foram nulos para as sementes isoladas dos frutos, em todos os tratamentos experimentais (Figura 3).

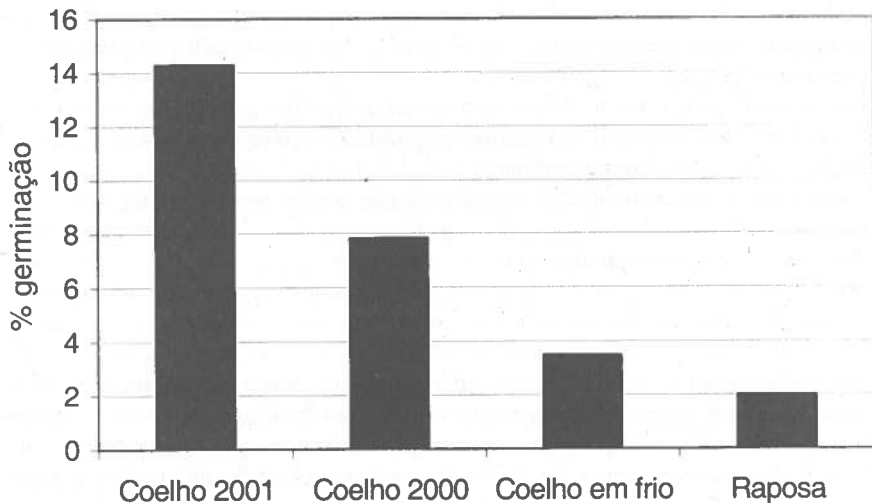


Figura 3. Percentagem de germinação das sementes de *Corema album* obtidas a partir de excrementos de animais.

DISCUSSÃO

Em habitats de recursos limitados, os obtidos pelas plantas devem ser canalizados para três funções: para o crescimento, permitindo uma maior capacidade competitiva, para a defesa anti-herbivoria que favorece a sobrevivência e para a reprodução que permite manter a população e colonizar novos habitats. Segundo OBESO (2002) a alocação dos recursos pode ser vista como uma redistribuição segundo um modelo triangular entre estas três funções que competem entre si, existindo a nível fisiológico sistemas de controlo que permitem canalizar a sua distribuição para cada uma delas.

No caso de *C. album* os nossos dados permitem demonstrar que o esforço reprodutor é enorme nesta espécie, mas também é bastante variável entre populações e entre indivíduos da mesma população, o que nos leva a sugerir a

existência de um mecanismo de controlo do esforço reprodutor. Segundo FONT QUER (1992), *C. album* só frutifica de dois em dois anos, no entanto em todas as populações estudadas observou-se que todos os indivíduos adultos produziram flores e frutos, durante vários anos seguidos, apenas variando a produção anual de frutos. Outros estudos de campo mostraram que o crescimento vegetativo anual apresenta oscilações inter-anuais o que parece estar relacionado com a competição entre os gastos vegetativos e reprodutores (CLAVIJO, *et al.* dados não publicados).

Provavelmente, os valores baixos de produção de frutos e tamanho dos mesmos que se encontrou na população de Monte Gordo, serão devido ao facto desta ser constituída por indivíduos velhos, com elevada competição com pinheiros e retamas, canalizando, por essa razão, grande parte dos recursos disponíveis para o crescimento e manutenção, deixando muito pouco disponível para a reprodução.

A grande produção de frutos que existe nalgumas populações, como a de Asperillo, deve constituir um recurso importante no Verão, proporcionando aos animais água e hidratos de carbono.

No mês de Setembro só 10% das dejectos de coelho recolhidas não continham sementes de *C. album*. No caso das raposas os dejectos continham uma mistura de sementes e frutos mal digeridos.

Os resultados deste estudo, sugerem que em Asperillo, o coelho é o principal agente da dispersão das sementes. A maior densidade de plântulas germinadas nas zonas abertas, no cimo das dunas sem cobertura vegetal, parece estar associada a latrinas destes animais. Inclusive nestas zonas encontramos plântulas germinadas no próprio excremento do coelho. Noutros lugares, como no Parque Natural das Ilhas Cíes (Galiza) as gaivotas são quantitativamente mais importantes como agentes de dispersão, pois a densidade de coelhos é muito baixa nesta zona (CALVIÑO 2002). Noutras espécies o papel dos coelhos como agentes de dispersão das sementes é também muito importante (WELCH 1985, MALO & SUÁREZ 1995) especialmente em comunidades herbáceas. Também a regeneração natural de *Juniperus phoenicea* no Parque Nacional de Doñana parece estar dependente dos coelhos como agentes de dispersão e facilitadores da germinação (MUÑOZ REINOSO 1993)

O padrão de dispersão das sementes permite-nos observar quais as preferências de habitat e microhabitat dos animais que actuam como elementos de dispersão (LEVELY, 1988, CALVIÑO 2002). Os pássaros frugívoros como por exemplo o melro (*Turdus merula*) preferem pousar nas moitas das plantas onde se alimentam, favorecendo um padrão de dispersão à volta da planta mãe (HERRERA 1984, HERRERA *et al.* 1994, DEBUSSCHE & ISENMANN 1994). Tanto as gaivotas, como os coelhos preferem zonas abertas, como se pode demonstrar neste estudo e no de CALVIÑO (2002), enquanto as raposas deixam as suas fezes nas moitas de *Ulex* e *Stauracanthus* como se observou ao longo

deste estudo. O papel das raposas como agentes de dispersão foi estudado por BUSTAMANTE *et al.* (1992).

Nos ambientes dunares, as plantas especializadas nestes habitats devem ser capazes de colonizar novas superfícies de deposição, e também de manter-se no seu habitat. Neste contexto, os coelhos e as gaivotas permitem transportar as sementes para novas superfícies expostas, no entanto a aridez do Verão neste ambiente mediterrânico não permite a possibilidade de uma grande sobrevivência.

Não foi possível determinar quais os agentes mais importantes na dispersão e germinação das sementes à volta da planta mãe, ou se outros agentes mais especializados, como por exemplo as aves frugívoras, terão algum papel importante nestas populações. Neste microhabitat, a sobrevivência das plântulas é maior, provavelmente devido a uma melhoria significativa nas condições microclimáticas e edáficas. Nas populações de *C. album* é típico encontrar grandes manchas mono-específicas formadas por indivíduos dos dois sexos, que podem atingir vários metros de diâmetro, a origem destas manchas pode ser devida a relações de facilitação entre plântulas e plantas adultas.

As experiências de germinação indicam que a passagem das sementes através do aparelho digestivo dos animais é um processo chave que facilita a quebra da dormência e a sua germinação. Nas zonas mais intervencionadas, é provável que a ausência de germinação seja devida à escassez de animais que actuem como agentes de dispersão das sementes e facilitadores da germinação. Este estudo parece sugerir que a disponibilidade de vectores animais e o clima são factores chaves na regeneração natural das populações de *C. album*.

A nível de conservação, é necessário investir nos estudos de germinação, de forma a obter plântulas em viveiros para manter e reintroduzir esta espécie nos ecossistemas litorais da Península Ibérica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças a uma bolsa de colaboração para alunos do 5º ano da Licenciatura de Biología, na Universidade de Sevilha, que possibilitou que Leonor Alvarez Cansino realizasse os ensaios de germinação. Os autores também agradecem a ajuda financeira da Universidade de Sevilha (Plan Propio de la Universidade de Sevilha) que possibilitou as viagens realizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUSTAMANTE, R. O., SIMONETTI, J. A. & MELLA, J. E. 1992. Are foxes legitimate and efficient seed dispersers? A field test. *Acta Oecologica* 13: 203-208.
- CALVIÑO-CANCELA, M. 2002. Spatial patterns of seed dispersal and seedling recruitment in *Corema album* (Empetraceae): the importance of unspecialized dispersers for regeneration. *Journal of Ecology* 90: 775-784.
- CLAVIJO, A., DÍAZ BARRADAS, M. C., AIN-LHOUT, F., ZUNZUNEGUI, M. & CORREIA, O. (in press). A fragmentação e as espécies invasoras como causa principal da redução do hábitat de *Corema album* na sua área de distribuição. *Revista Biol. (Lisboa)* 20: 109-120.

- DAVY, A. J. & FIGUEROA, M. E. 1993. The colonization of strandlines. In: MILES, J. & WALTON, D. W. H. (Eds). *Primary succession on land*. Blackwell. Oxford: 113-131.
- DEBUSSCHE, M. & ISENMANN, M. 1994. Bird-dispersed seed rain and seedling establishment in patchy Mediterranean vegetation. *Oikos* 69: 414-426.
- DÍAZ BARRADAS, M. C., CORREIA, O., ZUNZUNEGUI, M., AIN-LHOUT, F., CLAVIJO, A., SILVA, P. & FERREIRA, S. 2000. Distribuição de sexos na espécie dióica *Corema album* ao longo de um gradiente climático. *Revista Biol. (Lisboa)*, 18: 7-22.
- DÍAZ BARRADAS, M. C., CLAVIJO, A., ZUNZUNEGUI, M., AIN-LHOUT, F., CORREIA, O. & GARCÍA NOVO, F. 2002. Ecosistema peninsulares. Dunas de camarina. *Investigación y Ciencia* (Mayo 2002): 36-37.
- FONT QUER, P. 1992. *Plantas medicinales. El Dioscórides renovado*. De Labor. Barcelona.
- GARCÍA, M. B. & EHRLÉN, J. 2002. Reproductive effort and herbivory timing in a perennial herb: fitness components at the individual and population levels. *American Journal of Botany* 89: 1295-1302.
- GARCÍA NOVO, F., DÍAZ BARRADAS, M. C., ZUNZUNEGUI, M., GARCÍA MORA, R. & GALLEGO FERNÁNDEZ, J. B. (in press). Plant functional types in coastal dune habitats. In: M.L. Martínez, N. Psuty, & R. Lubke (eds). *Coastal sand dunes: Ecology and restoration*. Ecological Studies series. Springer Verlag. Heidelberg.
- GUTIÁN, P., MEDRANO, M. & RODRÍGUEZ, M. 1997. Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don. (*Empetraceae*) in the northwest Iberian Peninsula. *Acta Botanica Gallica* 144: 119-128.
- HARPER, J. L. 1977. *Population biology of plants*. Academic Press, London.
- HERRERA, C. M. 1982. Seasonal variation in the quality of fruits and diffuse coevolution between plants and avian dispersers. *Ecology* 63: 773-785.
- HERRERA, C. M. 1984. Seed dispersal and fitness determinants in wild rose: combined effects of hawthorn, birds, mice, and browsing ungulates. *Oecologia (Berlin)* 63: 386-393.
- HERRERA, C. M. 1987. Vertebrate-dispersed plants of the Iberian Peninsula: a study of fruit characteristics. *Ecological Monographs* 57: 305-331.
- HERRERA, C. M., JORDANO, P., LÓPEZ SORIA, L. & AMAT, J. A. 1994. Recruitment of a mast-fruiting, bird-dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monographs* 64: 314-344.
- JANZEN, D. H. 1983. Dispersal of seeds by vertebrate guts. In: D. J. Futuyma & M. Slatkin, editors. *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 232-262 pp.
- LEVELY, D. J. 1988. Spatial and temporal variation in Costa Rican fruit and fruit-eating bird-abundance. *Ecological Monographs* 58: 251-269.
- MALO, J. E. & SUÁREZ, F. 1995. Herbivorous mammals as seed dispersers in Mediterranean dehesa. *Oecologia* 104: 246-255.
- MUÑOZ REINOSO, J. R. 1993. Consumo de gálbulos de sabina (*Juniperus phoenicea* ssp. *Turbinata* Guss, 1891) y dispersión de semillas por el conejo (*Oryctolagus cuniculus* L.) en el Parque Nacional de Doñana. *Doñana, Acta Vertebrata* 20: 49-58.
- OBESO, J. R. 2002. The cost of reproduction in plants. *New Phytologist* 155: 321-348.
- STEARNS, S. C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology* 3: 259-268.
- WELCH, D. 1985. Studies in the grazing of heather moorland in Northeast Scotland UK, 4. Seed dispersal and plant establishment in dung. *Journal of Applied Ecology* 22: 461-472.

MACROBENTHIC CRUSTACEA OF THE BAY OF S. TORPES (PORTUGAL)

S. Carvalho¹, J. C. Marques², M. M. Banha³ & L. Cancela da Fonseca^{1,3*}

¹INIAP/IPIMAR, Av. 5 de Outubro, P-8700-305 Olhão; ²IMAR, Dept. de Zoologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, P-3000 Coimbra;

³IMAR, Laboratório Marítimo da Guia, Estrada do Guincho, P-2750 Cascais

*Corresponding author: lfonseca@ualg.pt

Carvalho, S., Marques, J. C., Banha, M. M. & Fonseca, L. C. (2003). Macrobenthic crustacea of the Bay of S. Torpes (Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 57-70.

The macrobenthic Crustacea from the Bay of S. Torpes were characterised in the present work both from hard and soft bottoms. Within hard bottom stations, animals were removed from quadrats of 25x25cm. Soft bottom samples were collected over a 0.1m² area with a hand-corer at the intertidal zone and with a suction-sampler at the subtidal area. The data collected were analysed by a combination of uni- and multivariate statistical methods. Multidimensional analysis and the SIMPER routine have revealed clear differences between the assemblages from both substrates. Despite hard bottom samples being clearly dominated by the cirriped *Chathamalus* spp. at the Midlittoral Zone, the amphipods *Hyale stebingii* and *Melita hergensis* were also considered characteristic species at this shore level. *Dexamine spiniventris* and *Apherusa jurinei* dominated the Infralittoral Fringe. Within the Infralittoral Zone samples, although the cirriped *Verruca stroemia* was clearly the dominant species, *Pisidia* cf. *longicornis*, *Balanus amphitrite*, *Aora gracilis*, *Caprella fretensis* and *Phtisica marina* were also important for the characterisation of this depth zone. Soft bottom samples were dominated by the amphipod *Haustorius arenarius* and the cirrolanid isopod *Eurydice pulchra* at Midlittoral Zone and Infralittoral Fringe, respectively. Within the Infralittoral Zone, the decapods *Anapagurus curvidactylus* and *Diogenes pugilator* and the tanaid *Apseudes* cf. *spinosus* were the dominant species. The crustacean assemblages analysed in the present work were in agreement with other studies for this region and also along other areas from the Portuguese coast. Although with some restrictions, as we have only analysed crustacean data, it was possible to recognise depth zonation patterns in both hard and soft bottoms.

Keywords: Macrobenthos, Crustacea, hard bottom, soft bottom.

Carvalho, S., Marques, J. C., Banha, M. M. & Fonseca, L. C. (2003). Crustáceos macrobentónicos da Baía de S. Torpes (Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 57-70.

O presente trabalho teve por objectivo a caracterização dos povoamentos de crustáceos macrobentónicos (substratos móvel e rochoso) da Baía de S. Torpes. Nas estações referentes ao substrato rochoso, os organismos foram removidos de áreas quadrangulares de 25x25cm. As amostras de substrato móvel foram obtidas numa área de 0,1m² com auxílio de um corer, na zona intertidal, e com uma sugadora, na área subtidal. Os resultados obtidos foram analisados recorrendo a métodos estatísticos do tipo uni- e multivariado. As análises multidimensionais e a rotina SIMPER do programa PRIMER revelaram que os povoamentos de crustáceos macrobentónicos de ambos os substratos apresentavam claras diferenças. Apesar das amostras de substrato rochoso serem claramente dominadas pelo cirrípede *Chathamalus* spp. na Zona Mediolitoral, os anfípodes *Hyale stebingii* e *Melita hergensis* foram igualmente considerados como espécies características a este nível da praia. *Dexamine spiniventris* e *Apherusa jurinei* foram as espécies dominantes na Franja Infralitoral. Ao nível da Zona Infralitoral, a espécie dominante foi o cirrípede *Verruca stroemia*, ainda que *Pisidia* cf. *longicornis*, *Balanus amphitrite*, *Aora gracilis*, *Caprella fretensis* e *Phtisica marina* tenham também sido consideradas espécies importantes para a caracterização desta zona. As amostras de substrato móvel foram dominadas pelo anfípode *Haustorius arenarius* e pelo isópode *Eurydice pulchra* ao nível da Zona Mediolitoral e Franja Infralitoral, respectivamente. Na Zona Infralitoral, os decápodes *Anapagurus curvidactylus*, *Diogenes pugilator* e o tanaidáceo *Apeudes* cf. *spinus* foram as espécies dominantes. Os povoamentos de crustáceos analisados no presente trabalho estão em concordância com outros estudos desenvolvidos, quer nesta região, quer em outras áreas ao longo da costa portuguesa. Ainda que com algumas restrições, devido ao facto de apenas se terem analisado os dados relativos aos crustáceos, foi possível reconhecer os padrões gerais de zonação com a profundidade.

Palavras chave: Macrobenthos, Crustacea, substrato móvel, substrato rochoso.

INTRODUCTION

Although the biological study of sandy beaches has progressed substantially, it is lacking behind that of rocky shores (BROWN & MCLACHLAN, 1990). This could be related to the fact that within rocky shores many animals are large, sessile or very slow moving, highly coloured and may be observed without much effort during low tide (BROWN & MCLACHLAN, 1990). On the other hand, intertidal sandy beaches seem almost devoid of life (BROWN & MCLACHLAN, 1990; DEGRAER *et al.*, 1999). Nevertheless, sandy beaches constitute the most widely distributed type of intertidal environment throughout the world (DEXTER, 1986/87, 1988), and over 70% of the exposed Portuguese coastline (DEXTER, 1988). Along the Portuguese coast, few studies are available regarding sandy beach macrofauna (REIS *et al.*, 1982; DEXTER, 1988, 1990; JONES & PIERPOINT, 1997; FERREIRA, 2001). The most complete work was performed by DEXTER (1988) on 58 beaches from Esposende (NW Portugal) to Manta Rota (Algarve, south Portugal). Regarding rocky shores much more information is available (*e.g.* ALMAÇA, 1960, 1990; SALDANHA, 1974; MARQUES *et al.* 1993; CRUZ, 1999; BOAVENTURA, 2000; BOAVENTURA *et al.*, 2002).

A common issue on rocky and sandy shores has been the depth zonation pattern. DAHL (1952 *in* BROWN & MCLACHLAN, 1990) described a scheme for sandy beach zonation including three zones, comparable to those accepted for rocky shores. While peracarids are important in defining sandy beach's zonation, within rocky shores this role belongs to the cirripeds (barnacles). Although the material analysed in the present study has been collected 20 years ago, it is the only available information on the macrobenthic crustaceans of this area before the construction of a Thermoelectric Power Plant in the bay. These data were only recently analysed regarding the depth-related zonation patterns within both substrates and the results are compared with the commonly accepted zonation schemes.

MATERIAL AND METHODS

Study area and sampling strategy

Sampling was undertaken every three months between 1981 and 1982 at the Bay of S. Torpes (Sines, western coast of Portugal) (Figure 1). The study area comprises 17 sampling stations, including soft and hard substrates, from intertidal and subtidal zones (depths ranging from +2m to -28 m). Hard bottom comprises stations S1, S5 (+2m), S3, S7 (0m), S11 (-14m), S15 (23m), S13 and S17 (-28m). Soft bottom comprises stations S2, S6 (+2m), S4, S8 (0m), S10, S12 (-14m), S14, S16 (-23m) and S18 (-28m). For the purpose of the classification analysis, sampling periods were labelled A, B, C and D, respectively Autumn, Winter, Spring and Summer. The samples were assigned to three different fringes according to depth, Midlittoral Zone (ML, +2m), Infralittoral Fringe (IF, 0m) and Infralittoral Zone (IZ, -14m, -23m and -28m). At the hard bottom stations,

animals were scrapped from a 0.2 m² area (three quadrats of 25x25 cm), both within intertidal and subtidal zones. The material removed was then preserved in plastic bags with seawater, and preserved in 10% buffered formalin solution.

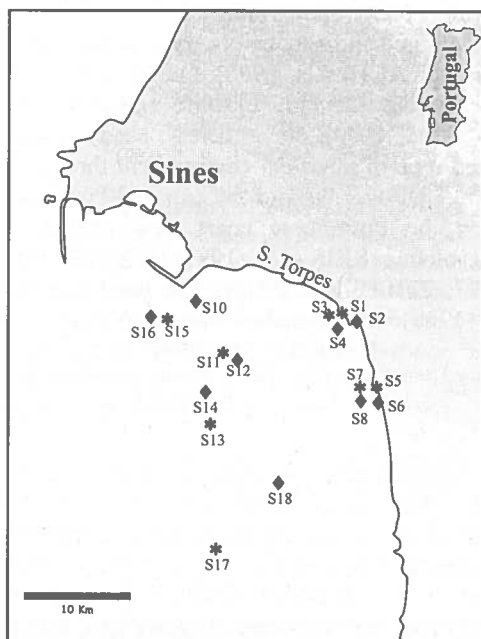


Figure 1. Location of sampling sites. (*) Hard bottom stations; (♦) Soft bottom stations.

Three replicate soft bottom samples were collected at the intertidal zone with a hand-corer (19.6cm i.d.) and at the subtidal area with a suction-sampler (0.03 m² area). Within both substrates, subtidal samples were obtained by scuba diving. Soft bottom sediments were sieved *in situ* through a 1mm-mesh sieve and the retained material was preserved in 10% buffered formalin. In the laboratory, crustaceans were sorted into the main taxonomic groups. Specimens were identified to the lowest possible taxonomic level and counted under a binocular stereomicroscope.

Data analysis

The crustaceans were analysed regarding the number of species (S) and abundance (A). These parameters were calculated for each sampling station using the mean value of the four sampling periods. Data analysis was performed using the statistical package PRIMER v5.2.4 (CLARKE & WARWICK, 1994). Similarity between faunal data was analysed by cluster and ordination techniques (non-metric MDS) based on the Bray-Curtis similarity coefficient after log (x+1) transformation (CLARKE, 1993). The cluster analysis applied the unweighted pair group average algorithm (CLARKE & WARWICK, 1994). The MDS plots

were represented in two dimensions (vertical and horizontal axes), with the stress value. Stress value is a measure of goodness-of-fit in representing the triangular matrix in two dimensions (CLARKE & WARWICK, 1994). Stress values above 0.2 indicate that the results are difficult to interpret and thus should not be considered as a truthful representation of the multidimensional matrix; values below 0.1 are indicative of good representations (CLARKE & WARWICK, 1994). Samples S 10A, S 18D (soft bottom), S 1D and S 17 B (hard bottom) were excluded from multivariate analysis, as they did not present any individual. Species' contribution to dissimilarity among substrates and among fringes within each substrate was investigated using the similarity percentages routine (SIMPER).

RESULTS

A total of 17,700 individuals from 155 different *taxa* were identified. Species were distributed among 7 main taxonomic groups: Cirripedia (8 species), Cumacea (2 species), Tanaidacea (4 species), Mysidacea (5 species), Isopoda (19 species), Decapoda (39 species) and Amphipoda (78 species). The relative abundance of each group for both substrates analysed (soft and hard bottom) is presented in Figure 2.

Although the Cirripedia was the most abundant group, the analysis of Figure 2 showed that this dominance was restricted to hard bottom samples, due to *Chthamalus* spp. (*Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui*) and *Verruca stroemia*. In general, the amphipods were the dominant group regarding species number, followed by the decapods. The majority of the species (80.6%) was exclusive of a single substrate, 32.9% on soft bottom and 47.7% on hard bottom. Only 30 species (19.4%) occurred on both substrates analysed.

Multivariate analysis performed on hard and soft bottom samples showed that in general both substrates were different (Figure 3). The results from both analyses showed that in general both substrates were different. MDS also pointed out that for both substrates differences were more evident at the two upper fringes (ML and IF) and less clear within the Infralittoral Zone. From all the species identified, SIMPER's analysis (Table I) has indicated that species mainly found in hard bottom samples such as *Chthamalus* spp., *Verruca stroemia*, *Pisidia* cf. *longicornis*, *Apherusa jurinei*, *Hyale stebbingi*, *Dexamine spiniventris* and *Balanus amphitrite* and dominant species from soft bottom samples such as *Eurydice pulchra*, *Anapagurus curvidactylus* and *Haustorius arenarius* were the species that presented higher contribution to both substrates separation. This Primer's routine indicated that both substrates presented an average dissimilarity of 99.32%. As both substrates were associated with two different crustacean assemblages, the analysis regarding depth zonation will be hereafter performed separately.

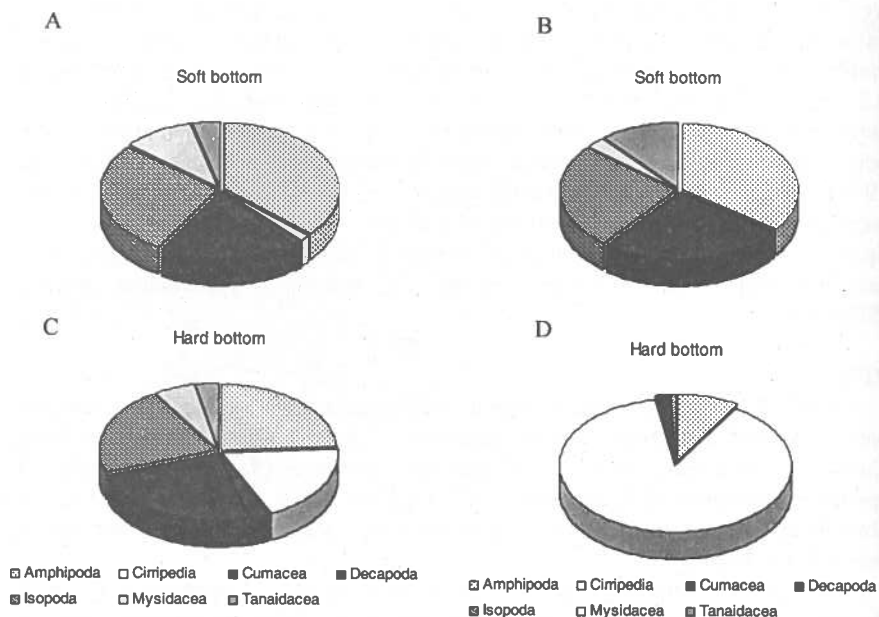


Figure 2. Relative abundance and number of *taxa* of the taxonomic groups identified from soft and hard bottom samples. A - Soft bottom relative abundance; B - Soft bottom relative number of species; C - Hard bottom relative abundance; D - Hard bottom relative number of species.

Table I. Differences in mean abundance (> and <) of species that most contribute to dissimilarity between both hard and soft bottoms (SIMPER).

	Soft		Hard
<i>Chthamalus</i> spp.	0.00	<	442.13
<i>Verruca stroemia</i>	0.00	<	52.17
<i>Pisidia</i> cf. <i>longicornis</i>	0.00	<	5.37
<i>Eurydice pulchra</i>	5.82	>	0.17
<i>Apherusa jurinei</i>	0.00	<	5.87
<i>Anapagurus curvidactylus</i>	2.85	>	0.63
<i>Hyale stebbingi</i>	0.00	<	3.00
<i>Dexamine spiniventris</i>	0.00	<	11.2
<i>Haustorius arenarius</i>	3.18	>	0.00
<i>Balanus amphitrite</i>	0.00	<	2.07

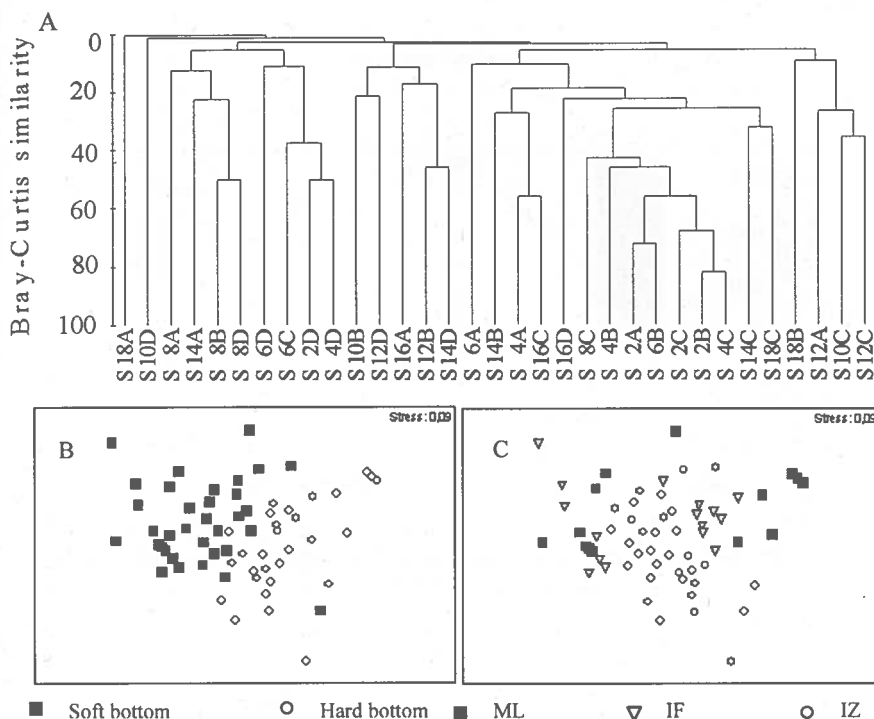


Figure 3. Classification (A) and ordination (B, C) diagrams. (A) – Autumn; (B) – Winter; (C) – Spring; (D) – Summer. ML –Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

Hard bottom

Within hard bottom samples, the Infralittoral Fringe showed the highest number of species closely followed by the Infralittoral Zone. The abundance pattern was highly determined by the cirripeds. The highest mean abundance was found at the Midlittoral Zone (1887 individuals of *Chtamallus* spp.), followed by a sharp decrease at the IF and at the IZ (Figure 4).

MDS plot (Figure 5) pointed out a gradient from the ML to IZ samples. Based on species contribution, three faunal groups were recognised within hard bottom samples matching those three zones defined *a priori*. From the analysis of SIMPER's results (Table II) it was observed that the ML was characterised by large numbers of the cirriped *Chtamallus* spp. and by the amphipods *Hyale stebbingi* and *Melita hergensis*. The Infralittoral Fringe was dominated by the amphipods *Apherusa jurinei* and *Dexamine spiniventris*. The Infralittoral Zone was mainly characterised by *Verruca stroemia*, although *Pisidia cf longicornis*, *Balanus amphitrite*, *Aora gracilis*, *Caprella fretensis* and *Phtisica marina* were also important species.

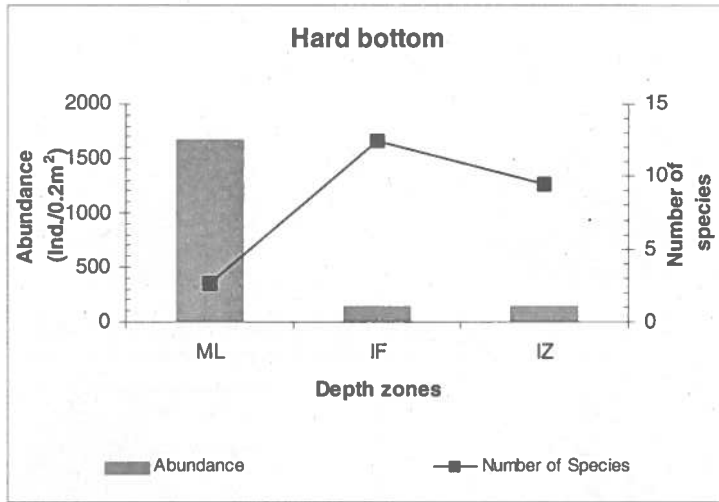


Figure 4. Mean abundance and mean number of species along the depth profile for hard bottom samples. ML –Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

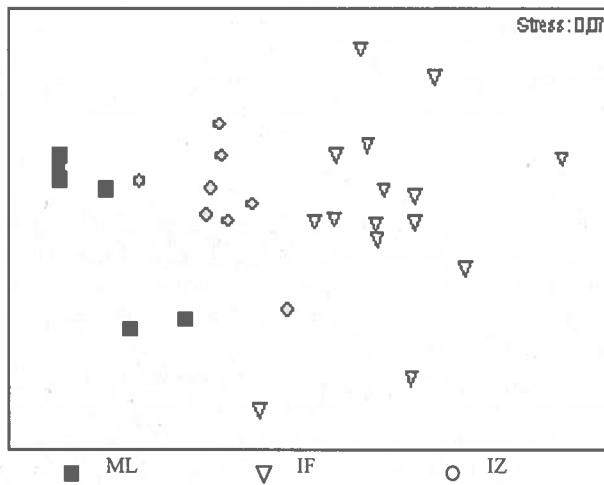


Figure 5. MDS plot for hard bottom samples. ML –Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

Table II. Differences in mean abundance (Ind./0.2m²) (> and <) of species that most contribute to dissimilarity between the three fringes within hard bottom samples (SIMPER). ML – Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

	ML		IF		IZ
<i>Chthamalus</i> spp.	1887.29	>	6.63	>	0.00
<i>Hyale stebbingi</i>	10.43	>	2.13	>	0.00
<i>Apherusa jurinei</i>	0.57	<	21.38	>	0.07
<i>Dexamine spiniventris</i>	0.00	<	41.25	>	0.4
<i>Melita hergensis</i>	7.29	>	0.00		0.00
<i>Verruca stroemia</i>	0.00		0.00	<	104.33
<i>Pisidia</i> cf. <i>longicornis</i>	0.00		0.00	<	10.73
<i>Balanus amphitrite</i>	0.00		0.00	<	4.13
<i>Aora gracilis</i>	0.00		0.00	<	3.73
<i>Caprella fretensis</i>	0.00		0.00	<	2.87
<i>Pthtistica marina</i>	0.00	<	0.13	<	3.87

Soft bottom

Within soft bottom samples, the mean number of species and abundance showed a general increase towards the Infralittoral Zone (Figure 6).

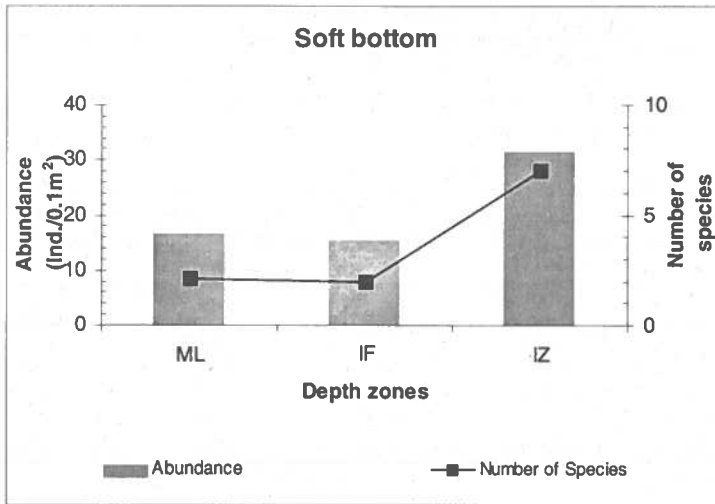


Figure 6. Mean abundance and mean number of species along the depth profile for soft bottom samples. ML – Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

Regarding depth zonation, MDS showed a less clear pattern compared to the one observed for hard bottom, although it was also perceptible the existence of some differences from ML and IF to IZ samples (Figure 7). SIMPER's analysis

indicated, however, that the three fringes were characterised by different species (Table III). The average dissimilarity between fringes was always above 89.19%. While the ML was dominated by the amphipod *Haustorius arenarius*, the cirrolanid isopod *Eurydice pulchra* was the dominant species at the IF. The IZ presented a richer and more diverse fauna, mainly characterised by the decapods *Anapagurus curvidactylus* and *Diogenes pugilator* and the tanaid *Apseudes cf. spinosus*.

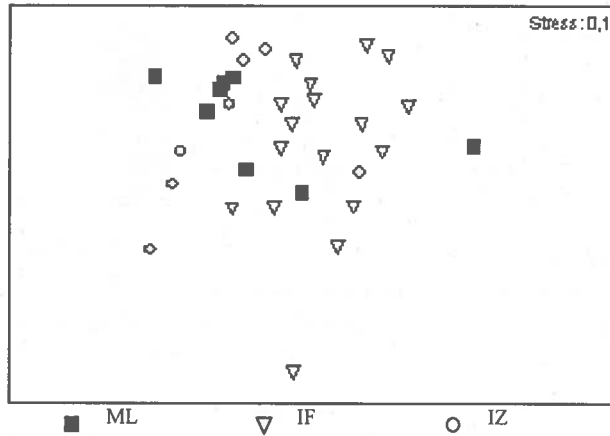


Figure 7. MDS plot for soft bottom samples. ML – Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

Table III. Differences in mean abundance (Ind./0.1m²) (> and <) of species that most contribute to dissimilarity between the three fringes within soft bottom samples (SIMPER). ML – Midlittoral Zone; IF – Infralittoral Fringe; IZ – Infralittoral Zone.

	ML		IF		IZ
<i>Haustorius arenarius</i>	13.25	>	0.25	>	0.00
<i>Eurydice pulchra</i>	1.88	<	12.75	>	4.5
<i>Anapagurus curvidactylus</i>	0.00		0.00	<	5.39
<i>Diogenes pugilator</i>	0.00		0.00	<	3.56
<i>Apseudes cf. spinosus</i>	0.00		0.00	<	4.11

DISCUSSION

The analysis of the crustacean data showed that, within the study area, both substrates presented two different assemblages. This was expected as benthic colonization results from the combination of both biotic (e.g. competition, predation, larval availability) and abiotic (e.g. grain size, hydrodynamic regime, sediment stability, organic and microbial content) factors (see reviews by RODRÍGUEZ *et al.*, 1993; SNELGROVE & BUTMAN, 1994; ÓLAFSSON *et*

al., 1994; WALTERS & WETHEY, 1996). As expected, within hard bottom samples, benthic fauna was clearly dominated by cirripeds, namely *Chthamallus* spp. (*C. montagui* + *C. stellatus*) at Midlittoral Zone, and *Verruca stroemia* at the Infralittoral Zone. The amphipods *Apherusa jurinei*, *Hyale stebbingi*, *Dexamine spiniventris*, the decapod *Pisidia* cf. *longicornis* and the cirriped *Balanus amphitrite* were also characteristic species from this type of substrate. Concerning soft bottom faunal composition, the peracarids *Eurydice pulchra* (isopod) and *Haustorius arenarius* (amphipod) and the decapod *Anapagurus curvidactylus* were the dominant species.

Regarding hard bottom samples, it was observed a clear depth zonation pattern from ML to IZ fringe. The number of species increased considerably from ML towards the two other deeper fringes. In contrast, abundance was higher at the ML followed by a sharp decrease at the IF and IZ fringes. These results were mainly due to *Chthamallus* spp. distribution. This taxon was highly abundant at the ML (1887 ind./0.2m²), and the competition for space possibly did not allow many other species to colonize the substrate. Each fringe seemed to be clearly associated with different species. The ML was characterised by large numbers of *Chthamallus* spp. and by the amphipods *Hyale stebbingi* and *Melita hergensis*, being the latter exclusive of this area. The Infralittoral Fringe was dominated by the amphipods *Apherusa jurinei* and *Dexamine spiniventris*. Within the Infralittoral Zone, although *Verruca stroemia* was clearly the dominant species, *Pisidia* cf. *longicornis*, *Balanus amphitrite*, *Aora gracilis*, *Caprella fretensis* and *Phtisica marina* were also important for the characterisation of this depth zone.

Within soft bottom biotopes, it was observed a general increase in the number of species and abundance towards the Infralittoral Zone. Concerning faunal composition, the amphipod *Haustorius arenarius* dominated in the ML, which was expected, as this species is characteristic of intertidal areas up to the water mark (LINCOLN, 1979). At the IF the cirrolanid isopod *Eurydice pulchra* was the dominant species, while the IZ presented a richer and more diverse fauna, mainly characterised by the decapods *Anapagurus curvidactylus* and *Diogenes pugilator* and the tanaid *Apseudes* cf. *spinosus*. The dominance of *Eurydice pulchra* within an intermediate beach level and the existence of a rich and diverse fauna at the Infralittoral Zone was also observed by RODRIGUES *et al.* (2002) for an estuarine beach and by DEGRAER *et al.* (1999) for a macrotidal, ultra-dissipative sandy beach. Within soft bottom crustaceans, the depth zonation patterns was not as evident as for hard bottoms. Distribution of macrobenthos on sandy beaches exhibits patchiness, resulting namely from passive sorting by the waves and swash and from localised food concentrations (BROWN & MCLACHLAN, 1990). Thus, it was not surprising that samples of the two upper fringes (+2m and 0m) were less clear separated, as this area is much more influenced by waves and swash, than the Infralittoral Zone.

The crustacean assemblages analysed in this study suggested instability, as the majority of the species did not show a regular distribution pattern during the

several sampling periods. This could be related to periods of either high sedimentation rates or high hydrodynamic conditions, which are not only supported by *in situ* observations, but also by unusual distributions of some crustacean species. The occurrence within hard bottom samples of *Iphinoe trispinosa*, *Gastrosaccus spinifer*, *Cyathura carinata*, *Lekanesphaera rugicauda*, *Pisidia* cf. *longicornis* and *Pirimela denticulata* is an example of such disturbances. All these species are characteristic of soft sediments (PÉRÈS & PICARD, 1964; GLÉMARÉC, 1969), although differing in grain-size preferences. *Pirimela denticulata* was indicated by PÉRÈS & PICARD (1964) as being associated with photophylic algae in areas under sedimentation. On the other hand, it was observed *in situ* the existence of a sediment layer over most of the hard bottom subtidal samples, which can also justify the presence of these unusual species within this type of substrate. Evidences of high hydrodynamics are given by the presence within soft bottom samples of *Processa* cf. *macroptalma*, *Processa* cf. *elegantula*, *Pisidia* cf. *longicornis*, *Ebalia tuberosa*, *Ebalia cranchi*, *Thia scutellata* and *Atelecyclus rotundatus*, which are usually associated to gravel and coarse sands (PÉRÈS & PICARD, 1964; GLÉMARÉC, 1969).

The crustacean assemblages analysed in the present work were in agreement with other studies for this region and also along other areas from the Portuguese coast (ZARIQUIEY ALVAREZ, 1968; SALDANHA, 1974; DEXTER, 1988; MARQUES *et al.*, 1993; BOAVENTURA, 2000; FERREIRA, 2001). Regarding depth related patterns, the already established zonation patterns both for hard and soft bottoms were in general recognisable in the present work. The absence of the characteristic talitrid amphipods was probably due to the lack of samples on the upper part of the beach (Dahl's sub-terrestrial fringe). Although we could observe the existence of the characteristic barnacle-delimited area [corresponding to eulittoral zone on STEPHENSON & STEPHENSON (1949) scheme], it was not possible to detect the other fringes, as crustaceans, the only group analysed in this study, do not define them.

REFERENCES

- ALMAÇA, C. 1960. Contribuição para o estudo da zonação marinha do litoral português. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* 8: 201-208.
- ALMAÇA, C. 1990. Structure and interactions in the crab community inhabiting sabelariid worm colonies at Praia da Ribeira d'Ilhas (Ericeira, Portugal). *Arquivos do Museu Bocage, Nova Série* 1 (37): 505-519.
- BOAVENTURA, D. M. 2000. Patterns of distribution in intertidal rocky shores: the role of grazing and competition in structuring communities. PhD Thesis, Universidade do Algarve: 149 pp.
- BOAVENTURA, D., CANCELA DA FONSECA, L. & HAWKINS, S. J. 2002. Analysis of competitive interactions between the limpets *Patella depressa* Pennant and *Patella vulgata* L. on the northern coast of Portugal. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 271: 171-188.

- BROWN, A. C. & MCLACHLAN, A. 1990. *Ecology of sandy shores*. Elsevier, Amsterdam: 328 pp.
- CLARKE, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143.
- CLARKE, K. R. & WARWICK, R. M. 1994. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Natural Environment Research Council; Plymouth: 140 pp.
- CRUZ, T. 1999. Settlement patterns of *Chthamalus* spp. at Praia da Oliveirinha (SW Portugal). *Acta Oecologica* 20: 285-287.
- DEGRAER, S., MOUTON, I., DE NEVE, L. & VINCX, M. 1999. Community structure and intertidal zonation of the macrobenthos on a macrotidal, ultra-dissipative sandy beach: summer-winter comparison. *Estuaries* 22 (3B): 742-752.
- DEXTER, D. M. 1986/87. Sandy beach fauna of Mediterranean and Red Sea coastlines of Israel and the Sinai Peninsula. *Israel Journal of Zoology* 34: 125-138.
- DEXTER, D. M. 1988. The sandy beach fauna of Portugal. *Arquivos do Museu Bocage, Nova Série*, I (8): 101-110.
- DEXTER, D. M. 1990. The effect of exposure and seasonality on sandy beach community structure in Portugal. *Ciênc. Biol. Ecol. Syst. (Portugal)* 10(1/2): 31-50.
- FERREIRA, M. A. O. 2001. Comunidades intertidais de substrato arenoso na Península de Tróia (Setúbal, Portugal). Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa: 111 pp.
- GLEMAREC, M. 1969. Les peuplements benthiques du plateau continental Nord-Gascogne. Thèse Sc. Paris, Brest, Fc. Sc. 167 pp.
- JONES, D. A. & PIERPOINT, C. J. 1997. Ecology and taxonomy of the genus *Eurydice* (Isopoda: Cirolanidae) from sand beaches on the Iberian Peninsula. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 77: 55-76.
- LINCOLN, R. J. 1979. *British Marine Amphipoda: Gammaridea*. British Museum (Natural History): 658 pp.
- MARQUES, J. C., RODRIGUES, L. B. & NOGUEIRA, A. J. A. 1993. Intertidal macrobenthic communities structure in the Mondego estuary (Western Portugal): reference situation. *Vie Milieu* 43 (2-3): 177-187.
- ÓLAFSSON, E. B., PETERSON, C. H. & AMBROSE, W. G. Jr. 1994. Does recruitment limitation structure populations and communities of macro-invertebrates in marine soft sediments: The relative significance of pre- and post-settlement processes. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 32: 65-109.
- PÉRÈS, J. M. & PICARD, J. 1964. Nouveau manuel de bionomie benthique de la mer Méditerranée. *Recl. Trav. Stn. Mar. Endoume* 31 (47): 5-137.
- REIS, C. S., MARQUES, V. M., CALVÁRIO, J., MARQUES, J. C., MELO, R. & SANTOS, R. 1982. Contribuição para o estudo dos povoamentos bentónicos (substrato móvel) da costa ocidental portuguesa. *Oecologia aquatica* 6: 91-105.
- RODRIGUES, C., SUBIDA, D., SOUSA, A., SILVA, J., ARAÚJO, R. & CUNHA, M. 2002. Zonation on an intertidal estuarine beach of Canal de Mira (Ria de Aveiro, NW Portugal). XII Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino. Abstract Book, p. 156.
- RODRÍGUEZ, S. R., OJEDA, F. P. & INESTROSA, N. C. 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 97: 193-207.
- SALDANHA, L. 1974. Estudo do povoamento dos horizontes superiores da rocha litoral costa da Arrábida (Portugal). *Arquivos do Museu Bocage, 2ª Série* 1: 1-382.

- SNELGROVE, P. V. R. & BUTMAN, C. A. 1994. Animal-sediment relationships revisited: cause versus effect. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 32: 111-117.
- STEPHENSON, T. A. & STEPHENSON, A. 1949. The universal features of zonation between tidemarks on rocky coasts. *Journal of Ecology* 38: 289-305.
- WALTERS, L. J. & WETHEY, D. S. 1996. Settlement and early post-settlement survival of sessile marine invertebrates on topographically complex surfaces: the importance of refuge dimensions and adult morphology. *Marine Ecology Progress Series* 137: 161-171.
- ZARIQUIEY ALVAREZ, R. 1968. Crustáceos decápodos Ibericos. *Inv. Pesq.* 32: XV + 510 pp.

ANNUAL CYCLE OF THE BENTHIC COMMUNITY OF A COASTAL LAGOON: LAGOA DE MELIDES (GRÂNDOLA, SW PORTUGAL)

A. M. Costa¹, M. Cristo² & L. Cancela da Fonseca³

¹ IMAR and Dep. Ecologia, Univ. de Évora, R. Romão Ramalho 59, P-7000 Évora

² CCMar and Univ. do Algarve - FCMA, Campus de Gambelas, P-8005-139 Faro

³ IPIMAR-CRIPSul, Av. 5 de Outubro, P-8700-305 Olhão and LMG/IMAR

Costa, A. M., Cristo, M. & Cancela da Fonseca, L. (2003). Annual cycle of the benthic community of a coastal lagoon: Lagoa de Melides (Grândola, SW Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 71-89.

As a part of an ecological evaluation of the coastal lagoons of the littoral "Alentejo" (SW Portugal) a one year sampling programme was carried out from March 1988 to March 1989, in the Lagoa de Melides. This brackish coastal lagoon with an elongate shape along a NE - SW axis, is in the municipality of Grândola north of the locality of Sines, and spreads over an average area of approximately 38 ha receiving water from an hydrographic basin of approximately 63 km². The communication with the sea, that could provide its renewal, only very seldom establishes naturally. However, due to the adjacent exploited rice fields, a man-made channel, which connects the lagoon with the ocean and prevents the rising of brackish water and its overwash to the rice fields, is established whenever it is necessary. This can be revealed by the range of salinity values (1 to 36‰), and by the faunal composition of the macrozoobenthos. Of the 94 invertebrate taxa found, 31.9% can be considered, as continental, 24.5% of lagoonal affinities, and 41.9% may be included in a marine and/or estuarine group. Polychaetes, Oligochaetes, Gastropods and Dipterans were the only taxonomic groups with a high number of individuals recorded. It was possible to identify in this lagoon a benthic community based on a few taxa known from lagoon environments (*Nereis diversicolor*, *Potamopyrgus jenkinsi*, *Lekanesphaera hookeri*, *Naucoris maculatus* and *Chironomidae*), which constitute the main taxa present throughout the year with regularity. The other identified organisms (from an aquatic continental or an

estuarine/marine pool of species) only appear in the lagoon under favourable environmental conditions. The communication with the sea silts up naturally by action of the sea currents. The renewal with marine components (vivification *sensu* the Italian authors) and the maintenance of the brackish characteristics are essential for the productivity of the system, and seems to prevent its eutrophication as it occurs in other brackish environments.

Key words: Melides, Macroinvertebrate community, Mesohaline lagoons.

Costa, A. M. , Cristo, M. & Cancela da Fonseca, L. (2003). Ciclo anual da comunidade bentónica de uma lagoa costeira: Lagoa de Melides (Grândola, SW Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 71-89.

Na Lagoa de Melides, foi realizada uma monitorização anual, entre Março de 1988 e Março de 1989, como parte de um projecto de avaliação ecológica das lagoas costeiras do litoral alentejano (SW Portugal). Esta lagoa costeira salobra, com uma forma alongada segundo um eixo NE-SW, situa-se no conselho de Grândola, a norte de Sines e distribui-se por uma área de aproximadamente 38 ha, recebendo água de uma bacia hidrográfica com cerca de 63 km². A comunicação com o mar, que permite a sua renovação, só muito esporadicamente se estabelece naturalmente. No entanto, sempre que é necessário, nomeadamente para impedir que a água salobra invada os arrozais adjacentes, é aberta uma comunicação com o mar. Este facto é bem notório pela variação dos valores de salinidade (1 to 36‰), e pela composição faunística do macrozoobentos. Dos 94 *taxa* de invertebrados encontrados, 31.9% podem ser considerados como continentais, 24.5% como de afinidades lagonais, e 41.9% podem ser incluídos num grupo marinho e/ou estuarino. Poliquetas, Oligoquetas, Gastrópodes e Dipteros foram os únicos grupos que registaram um número elevado de indivíduos. Nesta lagoa, foi possível identificar uma comunidade bentónica baseada num pequeno número de *taxa* de ambientes lagunares (*Nereis diversicolor*, *Potamopyrgus jenkinsi*, *Lekanesphaera hookeri*, *Naucoris maculatus* and *Chironomidae*), e que se encontram, com regularidade, ao longo de todo o ano. Os restantes organismos identificados (espécies de origem marinha/estuarina ou lagunares continentais) só são encontrados na lagoa em condições ambientais favoráveis. A comunicação com o mar é interrompida naturalmente pela acção das correntes marinhas. A renovação com elementos de origem marinha (vivificação

sensu autores italianos) e a manutenção de características salobras, são essenciais para a produtividade do sistema, e para impedir a eutrofização, como acontece em outros ambientes lagunares salobros.

Palavras chave: Melides, Comunidade de macroinvertebrados, Lagoas mesohalinas.

INTRODUCTION

Coastal lagoons are important reservoirs of continental material where, as a rule, exceptional primary production conditions prevail. Each lagoon is a case onto itself. They are also comparatively simple systems and in a typical lagoon the exchange and mixture of saltwater and freshwater is irregular. Its hydrography may show fluctuations daily, seasonally, and over long periods of time (COLOMBO, 1977). Discharge to the ocean is frequently prevented by active beach-ridges, forcing the water to accumulate in small coastal lagoons. The accumulation of large amounts of water can lead to an inlet opening, re-establishing the communication with the sea. Therefore, the ecology of coastal lagoons is largely determined by the freshwater inputs and by mixing and exchange processes with the adjacent sea. The water budget of a lagoon, with its freshwater and marine components, also determines its sedimentation rate and sediment patterns (POSTMA, 1981). Part of the accumulated allochthonous and autochthonous material is exported to the sea, from which an important biological component is imported. Interactions between sea and lagoonal environments are of major importance for the biogeochemical and ecological cycles.

The most important characteristics of lagoonal sediments are the large quantities of organic matter and the high water content of the bottom deposits. A shallow water body with a high nutrient content provides ideal conditions for high production (BARNES, 1980) and due to their shallowness, sunlight is able to reach the bottom and increase the primary production of benthic and water column communities. Generally, a restricted export concentrates the organic matter and the accumulation of this material leads to silting and rapid ageing of lagoons.

Along the Portuguese SW coast several environments show different degrees of ageing, related to their status in terms of exchanges with the sea (COSTA *et al.*, 1985; MAGALHÃES *et al.*, 1987; CANCELA DA FONSECA, 1989; CANCELA DA FONSECA *et al.*, 1989). The marine renewal seems to be essential to maintain a steady state and these systems may be included among the "permanent habitats with seasonal changing environmental conditions" (CANCELA DA FONSECA, 1979). Summer ecological changes generally referred to as "dystrophic crises" have been observed (BERNARDO *et al.*, 1988). According to the magnitude of episodic fresh- and seawater inputs in

winter, anoxic conditions in the stagnant bottom water may develop (CANCELA DA FONSECA *et al.*, in press).

The Melides, Santo André and Sancha lagoons, located in the Alentejo coast, SW Portugal, have been studied during several years as part of a program of ecological characterisation of the littoral lagoonal environments of Setúbal district (COSTA *et al.*, 1985; BERNARDO *et al.*, 1988; CANCELA DA FONSECA, 1989; CANCELA DA FONSECA *et al.*, 1987, 1989, 1990, 1999, *in press*; BERNARDO, 1990; DUARTE *et al.*, 1990, 2002; CRISTO & CANCELA DA FONSECA, 1994). These lagoons present different senescence degrees, where the spontaneous communication with the sea only seldom occurs.

"Lagoa de Melides" is a small coastal brackish lagoon located 20 Km north to Sines (39° 08' N, 8°47' W) (Fig. 1), near the village of Melides and is isolated from the sea by a sand barrier, with an almost regular shape which spreads along a NE-SW axe. A mean surface of 38 ha was maintained during all the year due to the frequent opening of an inlet. This procedure assures a regular communication between lagoon and sea, and a periodical colonisation by marine species. The freshwater comes from "Ribeira de Melides", a 14 Km stream with a catchments area of 65 Km². This stream is also the main origin of the continental pool of species that colonise the lagoonal environment. Sinuous and branchy channels which cross the bottom assure the water circulation in the entire lagoon (FONSECA, 1992).

The renewal of the lagoon marine faunal community (vivification to SACCHI 1961, 1979) is determined by the frequency of man-made sea openings. These are established whenever it is necessary to prevent the rising of brackish water and its overwash to the rice fields. The inlets provide the main exchanges between lagoon and sea (discharge of retained materials and input of marine species), which extends by a variable period (few days to few weeks) until the sealing off by sea currents.

The aims of this study were to define the structure of macro invertebrate community through the year and to identify the factors that affect its succession and seasonal changes.

METHODS

From March 1988 to March 1989 (13 month period), samples were collected monthly at 6 stations (Fig.1).

Several environmental parameters were registered in water: temperature, salinity, pH, dissolved oxygen and turbidity. Monthly bottom water samples were also obtained with a 3L Van Dorn bottle sampler for nutrient analyses, which were carried out in unfiltered water replicates following standard procedures described by STRICKLAND & PARSONS (1972) for phosphate, nitrate, nitrite and silicate and by GRASSHOFF (1976) for ammonia. Chlorophyll *a* (Chlor.a) and pheopigments (Pheop) were determined spectropho-

tometrically in the filtered material obtained in Whatman GF/C filters, after extraction with 90% acetone in cool and dark conditions (LORENZEN, 1967). The National Meteorological Institute provided rainfall data.

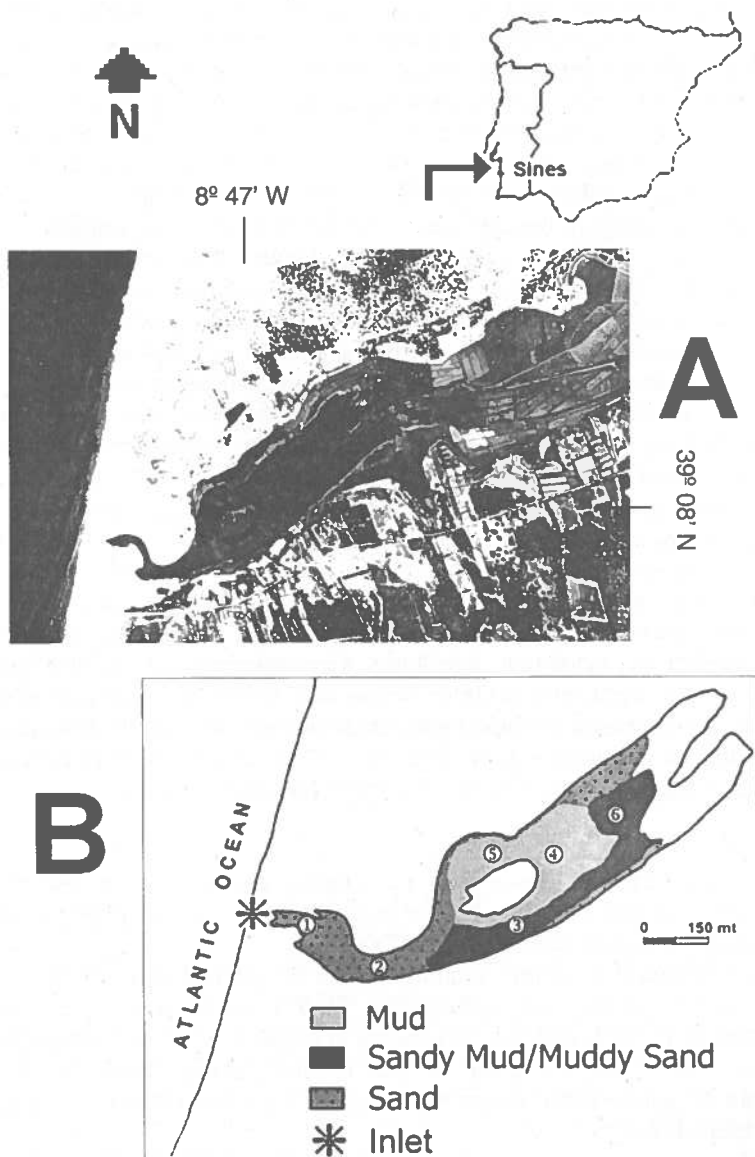


Figure 1. Melides lagoon: location on the Iberian Peninsula, aerial photograph (A) and main sediment types and sampling stations (B).

For the studies of sediments and benthic communities, samples were obtained with a modified Van Veen grab ("Sousa Reis"/LMG 83, 0.05 m²).

Macroinvertebrates were sorted from samples sieved *in situ*, through a 1mm² square mesh sieve and preserved in a 10% formalin solution stained with Rose Bengal. After sorting, samples were kept in 4% buffered formalin solution. All organisms were counted and identified to the lowest possible taxonomical level. Total number of *taxa* (S), total number of individuals (N), Shannon-Wiener diversity (H', bits), equitability (Pielou's J'), Margalef's species richness (d) and Simpson's dominance (D) indices (KREBS, 1994) were calculated using PRIMER 5.2.4 (CLARKE & GORLEY, 2001) software package.

Estimates of sediment organic matter content (%) for the top centimetre were obtained by weight loss on ignition ($\pm 450^{\circ}\text{C}$ during a 24h period), after drying for 24h at 65°C. Macrophyte biomass, measured as ash free dry weight (AFDW g.m⁻²), was determined using the above method, with the material sorted from samples collected for the study of the benthos. Two seasonal (winter and summer) sediment samples were collected, for grain size determinations.

For data analysis, stations were grouped by sediment type (sand, muddy sand/sandy mud, mud) and by month. Data on faunal abundance were square root transformed and cluster analysis (Q mode) was done on the similarity matrix obtained using the Bravais-Pearson correlation coefficient. Doing this large counts do not totally dominate the coefficient (CLARKE & WARWICK, 1994). Non-metric scaling analysis (MDS Ordination) was performed on the same similarity matrix. Cluster analysis (R mode - Bravais-Pearson correlation coefficient) was also done on environmental and community descriptors. Environmental and taxonomic descriptors were superimposed one at a time on the faunal MDS ordination as circles whose sizes reflect the magnitude of these variables, to emphasise a visual relationship between the sample grouping and the variable in consideration. NTSYS PC 2.02 (ROHLF, 1998) and PRIMER 5.2.4 (CLARKE & GORLEY, 2001) software packages were used.

RESULTS

Sediments of Melides lagoon show a distribution pattern between sand, muddy sand/sandy mud and mud (Fig. 1). The average organic content (top centimetre) of the sediments, range from 2 to 12% (Table 1).

Climatic conditions - mainly rainfall - define the annual pattern of the system, since it influences the water salinity (Fig. 2). The lagoon can be classified as poly-euhaline (> 25‰ salinity), mesohaline or oligohaline (<5‰ salinity) during the year, due to the increasing or lack of precipitation (Table 1). Diurnal dissolved oxygen recorded values were low (<6 mg/l) from May to January, but never reached zero.

Month average values of dissolved nutrients, chlorophyll *a* and pheopigments in near bottom water are presented in Table 1. The higher values of nitrate are

related to continental drainage after heavy rainfall periods. Silicate average values may depend on lack of dissolved oxygen near the bottom or on runoff due to rainfall increase. That could explain its gradual increase from July to November. During summer, phosphate and ammonia concentrations may also depend on lack of dissolved oxygen near the bottom, but due to the presumed consumption by producers only slightly higher values were recorded during this period. Average values of chlorophyll *a* and pheopigments seem to present the same pattern.

Table 1. Melides lagoon: monthly average values of environmental parameters over the sampling period, March/1988 - March/1989.

Environmental parameters	Year 1988												Year 1989		
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar
Rainfall (mm)	1536	464	107	179	357	679	214	0	15	1411	1821	107	71	54	36
Temperature (°C)	-	-	18.6	20.3	23.8	25.3	22.8	23.0	23.0	19.2	17.7	14.6	12.8	15.8	16.3
Salinity (%)	-	-	33.9	21.5	16.2	7.9	3.3	2.0	0.8	0.4	0.4	13.0	7.0	3.8	1.5
Oxigen mg/l	-	-	13.3	11.5	4.1	5.7	3.2	4.3	2.2	6.4	4.4	5.2	4.3	8.7	10.1
pH	-	-	7.6	8.0	8.7	9.3	8.1	8.0	8.5	8.5	7.3	-	8.6	-	8.8
Nitrate (mg/l)	-	-	9.2	6.1	0.3	0.7	4.5	0.2	2.2	0.7	0.4	0.3	1.5	0.8	0.3
Nitrite (mg/l)	-	-	0.36	0.22	0.01	0.05	0.11	0.19	0.34	0.02	0.03	0.11	0.16	0.08	0.05
Ammonia (mg/l)	-	-	2.18	0.00	4.71	0.65	5.61	2.18	1.99	2.18	6.51	10.57	1.01	0.79	1.11
Phosphates (mg/l)	-	-	0.23	0.33	0.09	0.12	1.54	0.44	0.92	0.36	0.21	0.75	0.33	0.42	0.40
Silicates (mg/l)	-	-	8.0	19.9	3.1	14.0	33.8	46.9	84.4	101.0	127.2	27.2	27.3	15.3	7.0
Turbidity (NTU)	-	-	2.52	2.62	2.25	2.65	4.23	10.42	6.75	3.83	4.85	-	3.20	-	2.33
Chlorophyll <i>a</i> (mg/m ³)	-	-	0.60	6.13	3.00	1.62	0.94	12.16	13.22	4.18	13.60	7.78	3.96	15.98	2.97
Pheopigments (mg/m ³)	-	-	0.15	2.15	1.31	1.09	1.42	9.48	6.63	1.70	9.90	5.83	5.48	15.13	2.22
Sedim. Org. Mat (%)	-	-	2.33	10.23	6.35	6.48	8.07	9.90	6.77	5.60	6.32	8.33	8.68	7.40	12.06
Macrophytes (g/m ²)	-	-	154.5	189.1	237.0	191.6	245.0	232.5	180.1	207.3	216.2	195.7	182.7	141.3	201.9

During summer, water volume decreases, and in July the global average macrophyte biomass reaches a maximum (245g AFDW. m⁻² - Table 1). *Ruppia maritima* was the main macrophyte species, either present in the sampled area of the lagoon, or in upstream areas near to the rice fields, *Potamogeton pectinatus* was also collected. Macrophyte biomass distribution decreases from the central part of the lagoon towards the inlet zone, to the deeper area and to the *P. pectinatus* area (Fig. 3a). Average macrophyte distribution also matches sediment types (Figs. 1 and 3a). Sediment organic content and macrophyte biomass are well correlated (Fig. 3b).

A total of 18502 individuals from 94 different *taxa* were identified. Species were distributed among 7 main taxonomic groups: Cnidaria (1 species),

Annelida (27 species), Mollusca (28 species), Crustacea (7 species), Insecta (20 species), Bryozoa (2 species), Echinodermata (2 species) and Chordata (5 species). Month occurrences of all recorded *taxa* by sediment type are presented in Table 2.

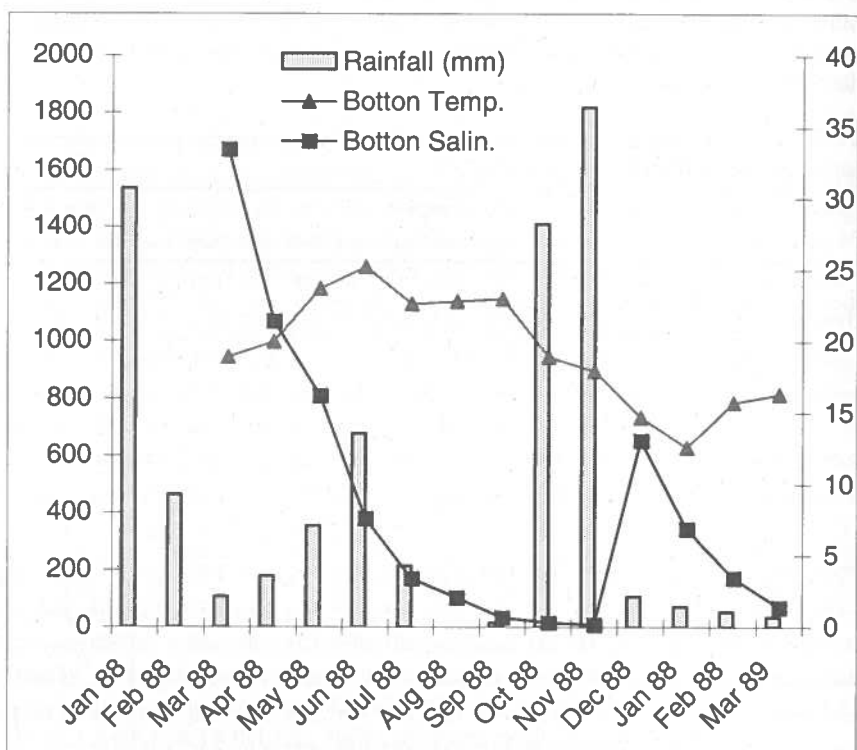
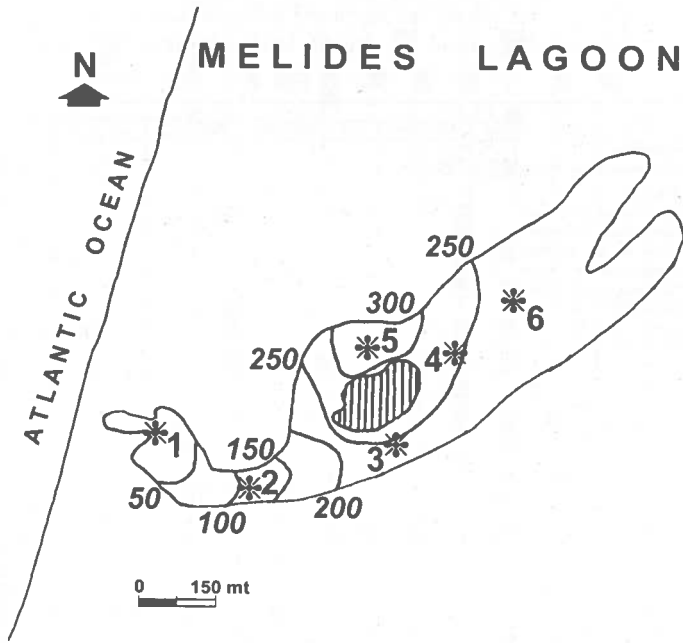


Figure 2. Melides lagoon: month rainfall and average values of bottom water temperature and salinity.

The main variation of *taxa* distribution by sediment types emphasise the importance of sand and muddy areas for differences in benthic communities (Table 2; Fig. 4a). Fig. 4b shows that monthly distribution of number of *taxa* is positively correlated with global density (individuals/0.15m²) of benthic organisms.

Multivariate analysis on month *taxa* abundances and distribution by different sediment types (Fig. 5a) allowed the separation of three main clusters: i) Two groups of samples recollected in sand - A (March to July 1988) and C (February 1989), and ii) one group with the all the other samples - B the remaining months and all the different sediment types (sand, muddy sand/sandy mud and mud).

a)



b)

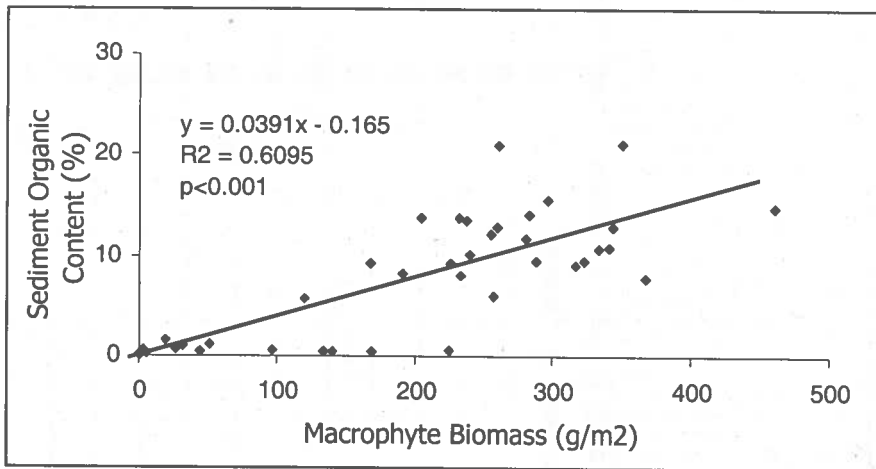


Figure 3. Melides lagoon: a) average distribution of the macrophyte biomass (AFDW g.m⁻²). b) relation between sediment organic content and macrophyte biomass.

Table 2 (Cont.)

	1 9 8 8												1 9 8 9		
	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar		
CRUSTACEA															
<i>Simocephalus vetulus</i> (O.F. Müller)															
<i>Tanais dulongii</i> (Audouin)															
<i>Lekanesphaera hookeri</i> (Leach)															
<i>Tytos europaeus</i> (Audouin)															
<i>Gemmanus chevreauxi</i> Sexton															
<i>Athyaephyra desmaresti</i> (Millet)															
Hyperiitidae sp1															
INSECTA															
<i>Centropilum</i> sp															
<i>Cloeon</i> sp															
<i>Baetis</i> sp															
<i>Ischnura elegans</i> (Van der Linden)															
<i>Ischnura graellsii</i> Rambur															
<i>Ischnura pumilio</i> (Charp.)															
<i>Aeshna affinis</i> (Van der Linden)															
<i>Crocothemis erythraea</i> (Brullé)															
Corixidae n.d.															
<i>Plea leachi</i> McGregor & Kirk															
<i>Naucoris maculatus</i> Fabricius															
<i>Aepophilus cf. bonnai</i> Signoret															
<i>Haliphus</i> sp															
<i>Berosus</i> sp															
<i>Philydrus</i> sp															
Diptera n.d.															
Culicidae n.d.															
Chironomidae n.d.															
Ceratopogonidae n.d.															
Ichneumonidae n.d.															
BRYOZOA															
<i>Victorella pavidia</i> Saville Kent															
<i>Conopeum seurati</i> (Canu)															
ECHINODERMATA															
<i>Amphipholis squamata</i> (D. Chiaje)															
<i>Amphura</i> sp															
CHORDATA															
Ascidiacea n.d.															
<i>Anguilla anguilla</i> (L.)															
<i>Syngnathus abaster</i> Risso															
<i>Atherina boyeri</i> Risso															
<i>Atherina</i> sp															

MDS ordination (Fig. 5b) highlights these groups and allows the separation of subgroups A₁, A₂, B₁ and B₂, which become associated with: A₁ – Crustacea (Fig. 5h); A₂ – Polychaeta (Fig. 5f) and Bivalvia (Fig. 5g); B₁ – Gastropoda (Fig. 5j); B₂ – Insecta (Fig. 5i); C- Oligochaeta (Fig. 5k). The stress values (0.09) points to a good ordination (CLARKE & WARWICK, 1994).

Circles proportional to values of salinity, macrophyte biomass and organic sediment content plotted on MDS ordination stress the importance of these parameters on the separation of groups A and B (Fig. 5b, 5c, 5d and 5e).

Cluster analysis (R mode) on the month average values of sediment organic matter, macrophyte biomass, water physical-chemical and benthic community parameters by different sediment types shows an opposition between a group formed by macrophyte biomass, sediment organic matter and Simpson's D, and another one assembling all the other parameters (Fig.6). In the latter two

subgroups are enhanced, in which is possible to see salinity associated with S, d and H', and N, Chlor. *a*, Pheop with the nutrients related to oxygen depletion (phosphate, ammonia and silicate).

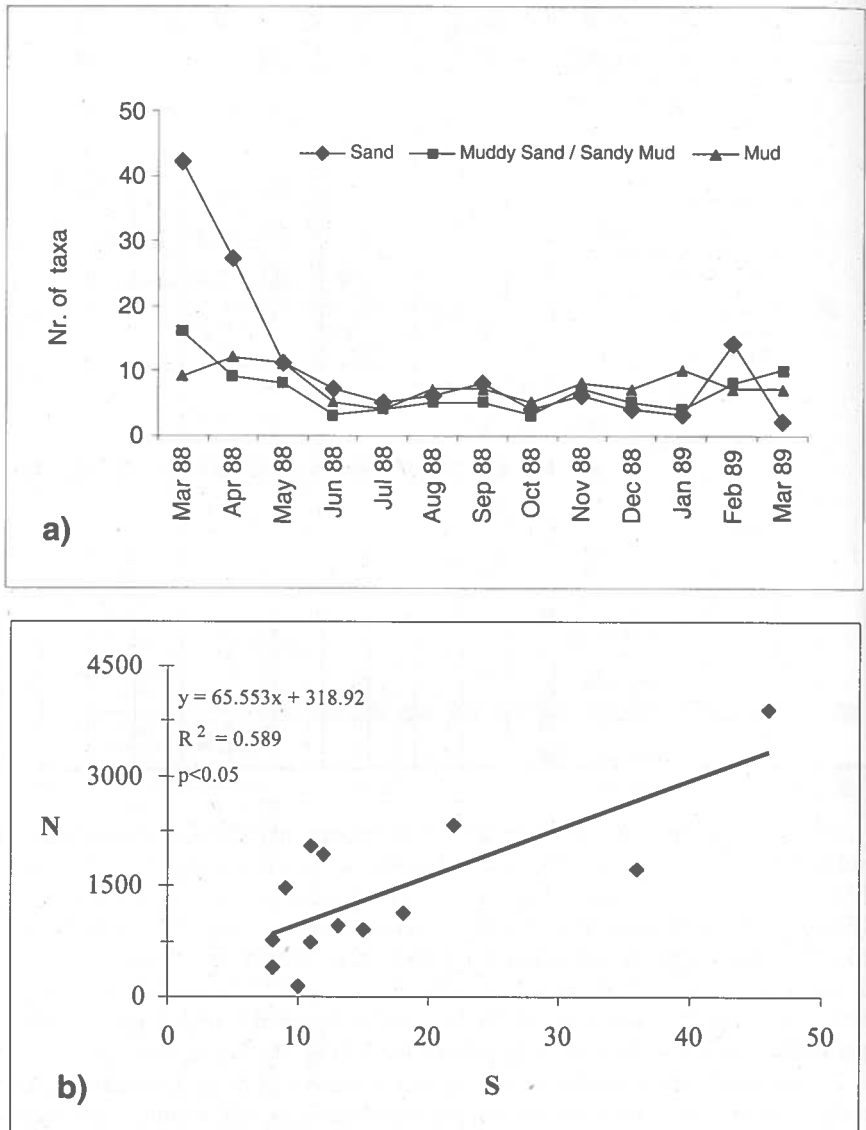


Figure 4. Melides lagoon: a) Monthly distribution of number of taxa per sediment type. b) relation between month total number of taxa (S) and number of individuals (N).

DISCUSSION

Values of salinity depend on annual climatic conditions, but in contrast with other estuarine/lagoonal environments of the Portuguese Southwest coast, where salinity always decreases in Autumn-Winter due to runoff, and increases in Spring-Summer periods due to sea-connections and evaporation (ANDRADE, 1986; MAGALHÃES *et al.*, 1987; CANCELA DA FONSECA, 1989), the Melides lagoon revealed abnormal conditions.

The salinity increase that was noticed after periods of heavy rainfall (Fig. 2), and that could lead to a poly-mesohaline situation, is a result of sand barrier overwash by the seawater. In other SW Portugal coastal lagoons a similar pattern was observed in winter months during severe storms (MAGALHÃES *et al.*, 1987). This fact associated with a great volume of water in lagoon basin could promote natural openings to the sea, which is the case in February/March 1988 (Fig. 2).

During the sampling period precipitation occurred every month excepting August. In October and November, strong rainfalls were recorded (Fig. 2). This could explain the sudden decline and disappearance of marine/estuarine *taxa*, and the low number of species that could subsist all year long (Table 2). Further more, the incoming of seawater in winter months represents a new disturbance and restrains population development of remaining species, consequently in Melides lagoon the reduction of *taxa* was not followed by an increase on the density of benthic organisms (Fig. 4b) as it occurs in Sancha and St. André, other neighbouring brackish lagoons (CANCELA DA FONSECA, 1989; CANCELA DA FONSECA, *et al.*, 1999).

As in other brackish environments (cf: VERHOEVEN & VIERSEN, 1978; BARNES, 1980; VIERSEN & VERHOEVEN, 1983; CANCELA DA FONSECA, 1989; QUINTINO & RODRIGUES, 1989), the benthic community of this lagoon depends on environmental fluctuations, and its bottom communities are strongly influenced by salinity which seems to be the main ecological factor controlling the seasonal change of benthic *taxa*.

Of the 94 invertebrate *taxa* found (Table 2), only the Annelida *Nereis diversicolor*, the Mollusca *Potamopyrgus jenkinsi*, the Crustacea *Lekanesphaera hookeri*, and the Insecta *Naucoris maculatus* and Chironomidae spp. can be considered constant in the lagoon. The other identified organisms (from an aquatic continental or an estuarine/marine pool of species) only appear in the lagoon under favourable environmental conditions. However, from all recorded *taxa*, 31.9% can be considered as continental, 24.5% of lagoonal affinities, and 41.9% may be included in a marine and/or estuarine group, according with QUINTINO (1988), CANCELA DA FONSECA (1989) and QUINTINO & RODRIGUES (1989).

The dynamic of sediments of Melides lagoon reflects two main situations: periods of sea-lagoon connection, which supplies sand to the lagoonal environment, and those of heavy continental runoff, carrying silt and clay to the lagoon.

The same situation occurs with other brackish lagoons of the Portuguese coast (CANCELA DA FONSECA *et al.*, 1987; QUINTINO, 1988; FONSECA, 1992).

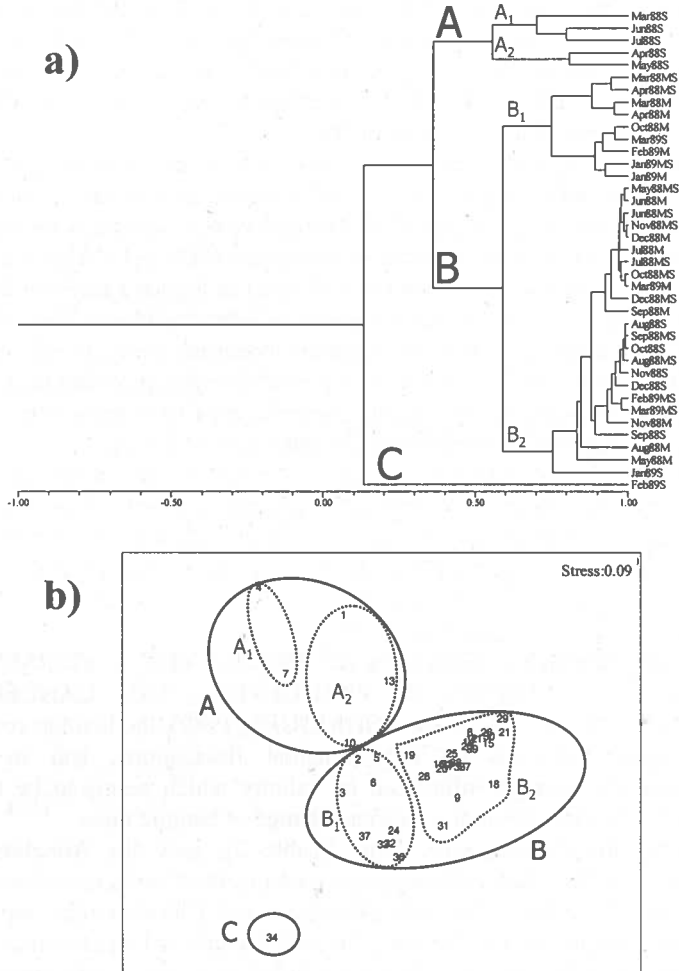


Figure 5. Melides lagoon: Multivariate (Cluster and MDS) analysis and environmental and taxonomic descriptors superimposed on the faunal MDS ordination: a) cluster analysis (Q mode- Bravais-Pearson correlation coefficient) of square-root transformation of species abundance; b) MDS ordination referred to the cluster analysis (numbers refer to sediment type and month of the sample as in Table 2); c) Salinity circles over MDS; d) Macrophyte biomass circles over MDS; e) Sedim. organic content circles over MDS; f) Polychaeta circles over MDS; g) Bivalvia circles over MDS; h) Crustacea circles over MDS; i) Insecta circles over MDS; j) Gastropoda circles over MDS; k) Oligochaeta circles over MDS (the circle size reflect the magnitude of the retained variables).

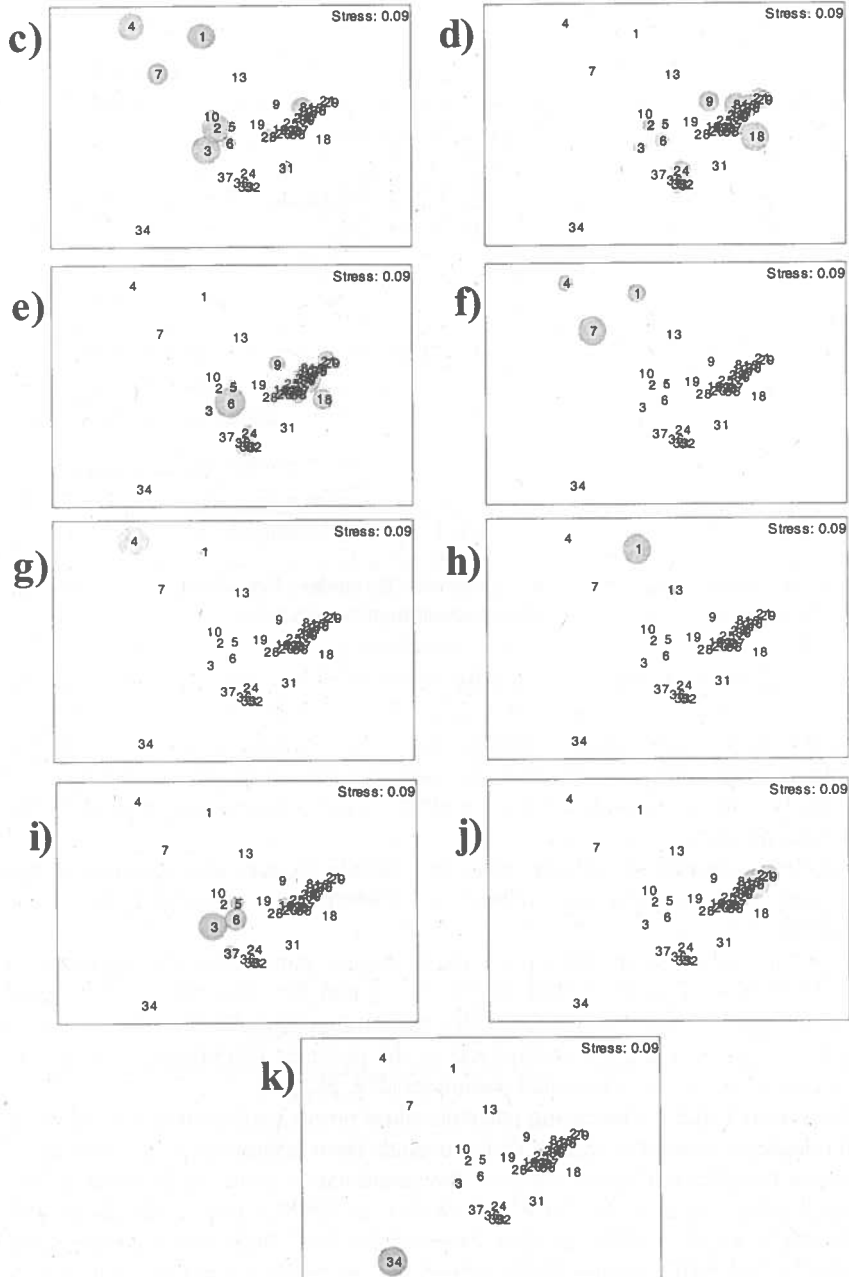


Figure 5. (Cont.). Legend previous page.

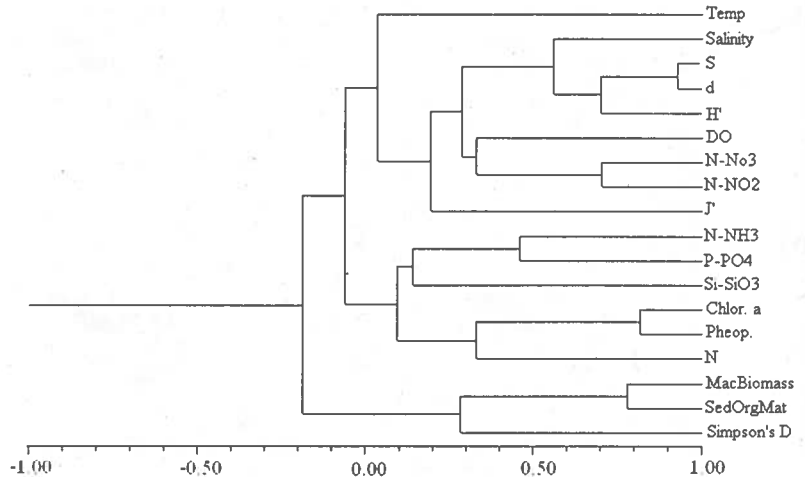


Figure 6. Melides lagoon: Cluster analysis (R mode- Bravais-Pearson correlation coefficient) on water, sediment and benthic community parameters.

Distribution of number of *taxa* by sediment types stresses that sands are colonised by a greater number of species (Table 2 and Fig. 4a). These may be assigned to a marine and/or estuarine group (poly-euhaline species related to higher salinity values) recorded at the sand stations during the first months of this study. The sea-lagoon connection allows colonisation of those areas by the referred species.

Species occurring in muddy areas are mainly insects and gastropods and excepting chironomids, are related to macrophytes occupying the same substrates.

From all registered environmental and biological parameters, salinity explains the distribution of group A (Fig. 5b, 5c, 5f, 5g and 5h); Macrophytes correlated with sediment organic content (Fig. 3b), can explain group B (Fig. 5b, 5d, 5e, 5i and 5j). Group C though characterized by the presence of *Oligochaetes* can not be assigned to any environmental parameter (Fig. 5k).

Data from Table 1 concerning nutrient values points to: i) an internal recycling and release of ammonia, silicate and phosphate from sediments; ii) an increase of nitrogen (nitrate) due to runoff from the catchment's basin. As pointed out for neighbouring lagoons by BERNARDO *et al* (1988) and CANCELA DA FONSECA *et al.* (1999) the first case results from high water temperatures leading to low bottom water dissolved oxygen. So, as shown in Fig. 6, the higher average values recorded for chlorophyll *a* and pheopigments seem to correspond to nutrients supplied by summer internal release from sediments.

Considering the dynamics of salinity, macrophyte biomass and organic matter and to their influence on *taxa* distribution, it is clear that the communication with the sea inhibits macrophyte development and contributes to prevent lagoon eutrophication as in Santo André lagoon (ANCELA DA FONSECA *et al.*, *in press*).

As pointed out by BAMBER *et al.* (1992), lagoons with communities dominated by "lagoonal specialists" may be considered relevant for conservation as "ecological islands". That may be the case of Melides lagoon (Table 2) in which a restricted number of species ('marine' lagoonal or 'continental' lagoonal species, cf. ANCELA DA FONSECA, 1989) appeared to tolerate the wide environmental variations that occur throughout the year. Due to this, the benthic community of Melides lagoon can also be considered as a "physically controlled community" (cf. SANDERS, 1969).

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Martinho Rangel, Fernando Simões and Assunção Rebelo for assistance in field sampling and in laboratory work, and to Miguel Wallenstein, Gabriela Ramos and Maria Monteiro for sorting out the organisms from samples. Thanks are also due to Filomena Gaspar for her help on identifying insects. This study was supported by the ICN (former SNPRCN) and the E.E.C., under the project "Estudos Base de Caracterização Física, Química e Biológica dos Biótopos Lagunares Costeiros das Lagoas de Santo André, Melides e Sancha".

REFERENCES

- ANDRADE, F. 1986. *O estuário do Rio Mira: Caracterização geral e análise quantitativa da estrutura dos macropovoamentos bentónicos*. Tese de Doutoramento, Univ. Lisboa 393pp.
- BAMBER, R. N., BATTEN, S. D., SHEADER, M. & BRIDGWATER, N. D. 1992. On the ecology of brackish water lagoons in Great Britain. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2:65-94.
- BARNES, R. S. K. 1980. *Coastal Lagoons*. Cambridge University Press, Cambridge. 1-106 pp.
- BERNARDO, J. M. 1990. *Dinâmica de uma lagoa costeira eutrófica (Lagoa de Santo André)*. Tese de Doutoramento, Univ. Lisboa, VI+322pp.
- BERNARDO, J. M., COSTA, A. M. & ANCELA DA FONSECA, L. 1988. Nutrient dynamics and dystrophy in a brackish coastal lagoon (St. André, SW Portugal). *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 31(2): 61.
- ANCELA DA FONSECA, J.-P. 1979. Species colonisation models of temporary ecosystems habitats. In: G. S. INNIS & R. V. O'NEILL (Eds.). *Systems Analysis of Ecosystems*. Statistical Ecology Series, Vol.9. International Co-operative Publishing House. Burtonsville. 125-195pp.
- ANCELA DA FONSECA, L. 1989. *Estudo da influência da "abertura ao mar" sobre um sistema lagunar costeiro: A Lagoa de Santo André*. Tese de Doutoramento. Univ. Lisboa, 355pp.

- CANCELA DA FONSECA, L., COSTA, A. M., BERNARDO, J. M. & FONSECA, R. 1987. Lagoa de Santo André (SW Portugal): Phytopigments as sedimentary tracers. *Limnética* 3(2): 299-306.
- CANCELA DA FONSECA, L., COSTA, A. M. & BERNARDO, J. M. 1989. Seasonal variation of benthic and fish communities in a shallow land-locked coastal lagoon (St. André, SW Portugal). *Scient. Mar.* 53(2-3): 663-669.
- CANCELA DA FONSECA, L., COSTA, A. M. & BERNARDO, J. M. 1990. Changes on benthic community promoted by an artificial sea-connection in a brackish coastal lagoon (St. André, SW Portugal). *Rapp. Comm. int. Mer Médit.* 32(1): 78.
- CANCELA DA FONSECA, L., COSTA, A. M., MAGALHÃES, F. & CRISTO, M. 1999. The benthic macroinvertebrate community of lagoa da Sancha: A coastal lagoon in SW Portugal. *Limnetica* 16: 39-48.
- CANCELA DA FONSECA, L., BERNARDO, J. M., COSTA, A.M., FALCÃO, M., & VALE, C. *in press*. Seasonal chemical changes and eutrophication of a land-locked coastal lagoon (St. André, SW Portugal). *Bol. Mus. Mun. Funchal*.
- CLARKE, K. R. & GORLEY, R. N. 2001. *PRIMER v5: User manual/Tutorial*. PRIMER-E. Plymouth. 91 pp.
- CLARKE, K. R. & WARWICK, R. M. 1994. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Natural Environment Research Council. Plymouth. 144 pp.
- COLOMBO, G. 1977. Lagoons. *In*: R. S. K. BARNES, (Ed.). *The Coastline*. John Wiley & Sons, Chichester. 63-82.
- COSTA, A. M., BERNARDO, J. M. & CANCELA DA FONSECA, L. 1985. Breve caracterização da evolução recente da Lagoa de Santo André (1978-1985). *1º Congresso sobre o Alentejo* 3: 1429-1439.
- CRISTO, M. & CANCELA DA FONSECA, L. 1994. Growth of the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant) and the common shrimp *Crangon crangon* (L.) in the St. André Lagoon (SW Portugal). *Gaia* 8: 33-37.
- DUARTE, P., MAGALHÃES, F., FRANCO, J. E. & CANCELA DA FONSECA, L. 1990. Trophic group patterns of macrobenthos: a way to understand macrobenthic communities? *9th Report on the Benthos Ecology Working Group* – ICES. 49-53 pp.
- DUARTE, P., BERNARDO, J. M., COSTA, A. M., MACEDO, F., CALADO, G. & CANCELA DA FONSECA, L. 2002. Analysis of a coastal lagoon metabolism as a basis for management. *Aquatic Ecology* 36: 3-19.
- FONSECA, R. 1992. Caracterização morfológica actual dos sistemas lagunares de Santo André e Melides. *Geonovas: "A Geologia e o Ambiente"*, nº especial: 31-41.
- GRASSHOFF, K. (Ed.). 1976. *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim: 1-317.
- KREBS, C. J. 1994. *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance*. (4th edition). Harper Collins College Publishers. xiv+801pp.
- LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- MAGALHÃES, F., CANCELA DA FONSECA, L., BERNARDO, J. M., COSTA, A. M., MOITA, I., FRANCO, J. E. & DUARTE, P. 1987. Physical characterisation of Odeceixe, Aljezur and Carrapateira lagoonal systems (SW Portugal). *Limnetica* 3(2): 211-218.

- POSTMA, H. 1981. Processes in the sediments and in the water-sediment interface. UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci. 33: 111-117.
- QUINTINO, V. 1988. *Structure et cinétique comparées des communautés de macrofaune benthique de systèmes lagunaires de la cote ouest du Portugal: Óbidos et Albufeira*. These Doc. Univ. Paris 6, 333pp.
- QUINTINO, V. & RODRIGUES, A. M. 1989. Environment gradients and distribution of macrozoobenthos in three Portuguese coastal systems: Óbidos, Albufeira and Alvor. In: J. S. RYLAND & P. A. TYLER (Eds.) *Reproduction, genetics and distributions of marine organisms*. Olsen & Olsen (Pub.), Fredensborg, Dk. 441-450pp.
- ROHLF, F..J. 1998. *NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software, NY.
- SACCHI, C. F. 1961. L'évolution récente du milieu dans l'étang saumâtre dit "Lago di Patria" (Naples) analysée par sa macrofaune invertébrée. *Vie Milieu* 12(1): 37-65.
- SACCHI, C. F. 1979. The coastal lagoons of Italy. in: R.L. JEFFRIES & A.J. DAVY (Eds.) *Ecological processes in coastal environments*. Blackwell. Oxford. 593-601pp.
- SANDERS, H. L. 1969. Benthic marine diversity and the Stability-Time Hypothesis. *Brookhaven Symp. Biol.* 22:71-81.
- STRICKLAND, J. D. & PARSONS, T. R. 1972. A practical handbook for seawater analysis (2nd ed.). *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 167: 1-310.
- VERHOEVEN, J. T. A. & VIERSEN, W. 1978. Structure of macrophyte dominated communities in two brackish lagoons on the island of Corsica, France. *Aquatic Botany* 5: 77-86.
- VIERSEN, W. & VERHOEVEN, J. T. A. 1983. Plant and animal communities in brackish supralittoral pools ('dobben') in the northern part of the Netherlands. *Hydrobiologia* 98: 203-221.

CONDIÇÕES DE ACLIMATAÇÃO DE *MESOPODOPSIS SLABBERI* (VAN BENEDEEN), (CRUSTACEA: MYSIDACEA) NUM SISTEMA SEMI-ESTÁTICO

A. M. Sardo^{1,2*}, U. Azeiteiro³ & F. Morgado¹

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

² Departamento de Zoologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

³ IMAR, Universidade de Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal

Sardo, A. M., Azeiteiro, U. & Morgado, F. (2003). Condições de aclimação de *Mesopodopsis slabberi* (van Beneden) (Crustacea: Mysidacea) num sistema semi-estático. *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 91-102.

Mesopodopsis slabberi é um misidáceo eurihalino e suprabêntico, que apresenta uma vasta distribuição geográfica, sendo uma das espécies de misidáceos mais abundantes nas águas costeiras pouco profundas. Várias espécies de misidáceos (p. ex., *Mysidopsis* sp, *Neomysis integer*) têm sido cultivadas em laboratório e são frequentemente utilizadas em testes ambientais. No entanto, em relação a *M. slabberi* as referências a condições de aclimação são extremamente escassas, apesar da sua relevância ecológica e dominância. Para a utilização dos organismos em laboratório, é fundamental a existência prévia de um protocolo de aclimação claro e rigoroso, que se possa seguir sempre que necessário. Assim, com este trabalho pretendeu-se contribuir para a optimização das condições de aclimação desta espécie. Não foram obtidas variações importantes nos parâmetros físicos e químicos medidos (salinidade, temperatura da água, pH e %O₂) antes e após a mudança de água, assim como em todo o período de aclimação (12 dias) e a mortalidade foi bastante baixa (6.7%). Conclui-se que o controlo da qualidade da água, assim como da densidade de misidáceos (30 L⁻¹) e a escolha de uma dieta adequada (nauplii de *Artemia*), conduzem à aclimação de *M. slabberi* com sucesso.

Palavras-chave: Aclimação, *Mesopodopsis slabberi*, qualidade da água, dieta.

Sardo, A. M., Azeiteiro, U. & Morgado, F. (2003). Acclimation conditions of *Mesopodopsis slabberi* (van Beneden) (Crustacea: Mysidacea) to a semi-static system. *Revista Biol. (Lisboa)* **21**: 91-102.

Mesopodopsis slabberi is a euryhaline and suprabenthic mysid that presents a wide geographic distribution and is one of the most abundant mysid species in coastal shallow waters. Several mysid species (e.g., *Mysidopsis* sp, *Neomysis integer*) have already been cultured in laboratory and are frequently used in environmental tests. As for *M. slabberi* there is few published information about a possible acclimation, despite its dominance and ecological importance. In order to perform laboratory tests, the optimization of an acclimation protocol is needed. The main goal of the present study was the optimization of this mysid species acclimation. No important variations in the physicochemical parameters (salinity, water temperature, pH and %O₂) were observed, neither before nor after water change, during the whole acclimation period (12 days), and a very low mortality occurred (6.7%). In conclusion, the water quality and mysid density (30 L⁻¹) control, as well as the choice of a proper diet (*Artemia nauplii*), are important factors for a successful acclimation of *M. slabberi*.

Key words: Acclimation, *Mesopodopsis slabberi*, water quality, diet.

INTRODUÇÃO

Os misidáceos constituem um grupo de crustáceos, predominantemente marinho, com grande capacidade de adaptação, que inclui algumas espécies de águas doces e muitas estuarinas. Sobretudo suprabentónicos, ocupam um largo espectro de habitats com diversidade de recursos alimentares, que exploram com sucesso. Costumam nadar perto do fundo durante o dia, enquanto que à noite efectuam migrações verticais em direcção à superfície (MAUCLINE, 1980). A razão entre sexos varia com a época do ano, mas tende a favorecer as fêmeas (MAUCLINE, 1980) e a coesão do grupo parece ser muito importante numa comunidade de misidáceos (OHTSUKA *et al.*, 1995). A maioria das espécies é filtradora e não selecciona as suas presas (DAUBY, 1995), tendo sido observado canibalismo em culturas laboratoriais (REITSEMA & NEFF, 1980; DOMINGUES *et al.*, 1998). Em termos alimentares são omnívoros e podem alimentar-se de pequenos organismos planctónicos como copépodes, diatomáceas e detritos orgânicos (MAUCLINE, 1980). Vários estudos têm sido efectuados sobre a composição das comunidades suprabentónicas, sendo os misidáceos muitas vezes um dos grupos mais importante e mesmo dominante (DRAKE *et al.*, 1997; MEES *et al.*, 1993, 1995). Na Ria de Aveiro foi observada uma tendência semelhante, podendo a dominância dos misidáceos estar associada a ambientes com uma maior dinâmica e imprevisibilidade (CUNHA *et al.*, 1999).

Mesopodopsis slabberi (van Beneden 1861) é membro de um grupo de espécies pertencentes ao género *Mesopodopsis*. A taxonomia do género *Mesopodopsis* Czerniavsky e, em particular, da espécie *slabberi*, tem sido alvo de controvérsia. Em 1861, van Beneden descreveu a primeira espécie de *Podopsis slabberi* e, erradamente, atribui-a a um género de decápode. Dois anos depois Gões transferiu correctamente para o género *Mysis* Latreille (WITTMANN, 1992). *M. slabberi* é um misidáceo eurihalino (GREENWOOD *et al.*, 1989) e suprabentónico, exibindo migrações mareais e verticais diárias e horizontais / longitudinais sazonais (WEBB & WOOLDRIDGE, 1990). Durante o dia é essencialmente hiperbentónico, agrupando-se em grandes e densos enxames, perto do substrato. Sob condições de baixa luminosidade, como águas turvidas ou à noite, vagueia frequentemente entre o fundo e a superfície, como organismo planctónico. Exibe uma independência em relação ao substrato, mais visível que nos restantes Mysidae hiperbentónicos e pode ser encontrado em quase todos os tipos de substratos nas águas costeiras com profundidade inferior a 50 m. Alimenta-se sobretudo de seston e de outros pequenos organismos (WITTMANN, 1992).

Apresenta uma vasta distribuição geográfica (GREENWOOD *et al.*, 1989), sendo uma das espécies de misidáceos mais importantes nas águas costeiras pouco profundas (GOMOIU, 1978). Ocorre frequentemente em sistemas estuarinos (MACQUART-MOULIN, 1965) onde é, na maior parte das vezes, o misidáceo mais abundante (WEBB & WOOLDRIDGE, 1987; GREENWOOD *et al.*, 1989), estando presente em salinidades entre 1.3 e 43 (WITTMANN, 1992). *M. slabberi* abunda não só em sistemas estuarinos como marinhos, tais como Atlântico-NE, Báltico oeste, todo o Mediterrâneo, Mares da Marmara, Negro e Azov, 30-59°N, 10 °W-41°E (WITTMANN, 1992).

É facilmente distinguido, uma vez que apresenta um corpo delgado e transparente e olhos de um comprimento invulgar – o dobro do diâmetro da carapaça na região gástrica. Numa amostra destaca-se, uma vez que nada activamente e parece uma pequena vara, que termina em olhos pretos (GOMOIU, 1978). Os organismos vivos são transparentes com os olhos azuis escuros e os pequenos cromatóforos presentes no corpo podem expandir-se para pequenas tiras cinzentas, na maioria dos organismos, ou para um par de pontos avermelhados localizados nos urópodes. A carapaça pode apresentar entre 14 a 27 poros e os ovos (embriões) variam entre transparentes a amarelados opacos, ou raramente verdes (WITTMANN, 1992).

Alguns estudos indicam que é uma das presas preferidas dos peixes, ocorrendo em 30 a 40% dos estômagos analisados (HOSTENS & MEES, 1999). Apresenta um papel ecológico importante (GREENWOOD *et al.*, 1989) e é sem dúvida uma das espécies dominantes, tal como mostram diversos estudos (DRAKE *et al.*, 1997; MEES *et al.*, 1993, 1995). Estão também disponíveis informações sobre produção (AZEITEIRO *et al.*, 1999), bioquímica (AZEITEIRO *et al.*, 2001) e histologia (PASTORINHO *et al.*, 2003) desta espécie.

Em trabalhos de laboratório, é fundamental a existência de um protocolo de aclimação bem definido e rigoroso, que se possa seguir sempre que necessário. O presente estudo está integrado num trabalho de ecotoxicologia, utilizando *M. slabberi* como espécie teste. Constituindo a aclimação o primeiro passo em qualquer teste de toxicidade, o objectivo principal da presente investigação foi conseguir reunir um conjunto de condições que permitissem otimizar a aclimação deste misidáceo, que possibilitassem a sua manutenção em laboratório por um período de tempo considerável. Partindo do conhecimento das condições ambientais, tentou-se adaptar os organismos a condições laboratoriais impostas. A existência de um protocolo de aclimação de *M. slabberi* poderá permitir a sua utilização em inúmeros ensaios de ecotoxicologia, ou mesmo possibilitar a sua cultura em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Métodos de colheita

A recolha de organismos ocorreu na Ria de Aveiro, no Canal da Cidade (Figura 1), com profundidades que oscilaram entre os 5 e os 7 metros, cerca de 2 horas após a preia-mar e a uma salinidade de 35. Todas as amostras foram colhidas durante o dia, uma vez que se sabe que, nesse período, os misidáceos suprabentónicos encontram-se perto do fundo (MEES *et al.*, 1993). A captura foi realizada com recurso a um trenó suprabentónico com copo de colheita (Figura 2), ambos de malha 500 μm , operado a partir de uma embarcação, com arrastos de 3 a 4 minutos, realizada sensivelmente a meio do Canal e sempre contra a corrente. O conteúdo do copo de colheita foi colocado em contentores de 20 L de capacidade (com o auxílio de um esguicho com água do local), de forma a manter os organismos vivos até ao laboratório.

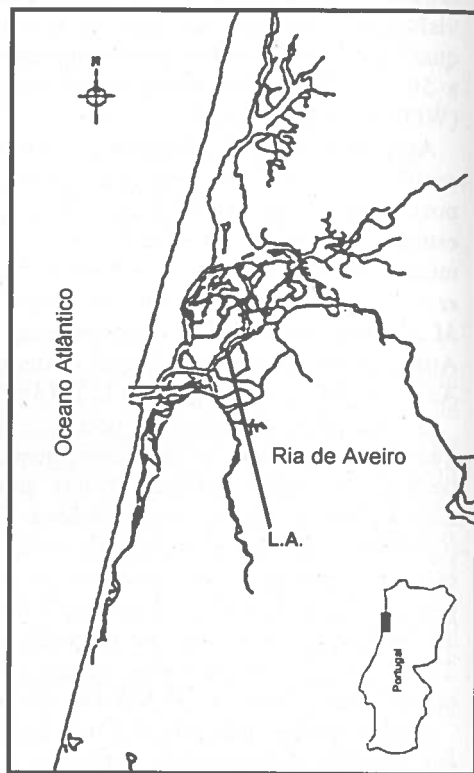


Figura 1. Localização da Ria de Aveiro, com indicação do local de amostragem (L.A.).

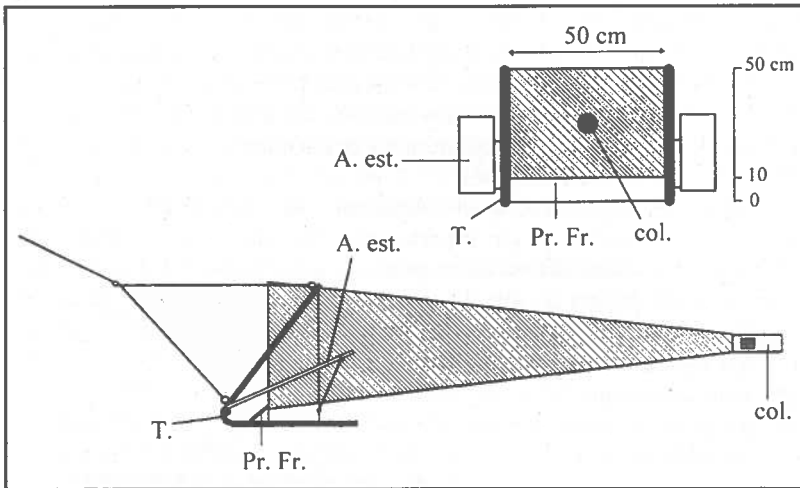


Figura 2. Esquema do trenó suprabentônico utilizado nas colheitas realizadas na entrada do Canal de Mira (adaptado de CUNHA *et al.*, 1999). Col.: copo colector; T.: trenó; A. est.: asas estabilizadoras; Pr. Fr.: prato frontal.

Métodos laboratoriais

Após triagem das amostras presentes nos contentores, foram colocados 10 organismos (pertencentes à mesma classe de tamanho) em cada frasco de vidro, contendo 500 mL de solução ASTM (ASTM, 1980) com salinidades progressivamente decrescentes (35, 30, 25, 20, 16, 10 e 6), sem sedimento e com arejamento permanente. Após 2 a 3 horas (que, em testes prévios se revelou suficiente para salvaguardar o choque osmótico) de estarem numa salinidade, os organismos foram cuidadosamente transferidos para a salinidade imediatamente inferior. Este ensaio decorreu numa sala com temperatura e fotoperíodo controlados, 20°C e 14h de luz.

Numa segunda abordagem, efectuou-se um procedimento idêntico, mas em que 15 espécimes de *M. slabberi* foram colocados numa solução de água do mar artificial, preparada através da diluição de sal marinho SERA PREMIUM® em água destilada, com uma salinidade de 25 (GREENWOOD *et al.*, 1989) e sem sedimento. Esta solução foi previamente arejada e, durante toda a aclimação, o arejamento foi mantido. Esta experiência consistiu em 4 réplicas e a aclimação ocorreu durante um período de 12 dias, durante os quais, diariamente, se procedeu à contabilização da mortalidade e monitorização da temperatura, pH, salinidade e percentagem de saturação de O₂ da água, assim como à substituição de 250 mL (sistema semi-estático). Os parâmetros físicos e químicos foram medidos utilizando sondas digitais (condutímetro WTW LF330, oxímetro WTW Oxi330i e medidor de pH WTW pH330). A medição dos parâmetros foi sempre feita antes e após a mudança de água.

Colocou-se uma rede de malha muito fina no interior dos frascos, para que não houvesse possibilidade de retirar espécimes enquanto se pipetavam os 250 mL. A água nova foi cuidadosamente introduzida, com o auxílio de uma vareta de vidro e por escorrência através das paredes do frasco. Os organismos foram colocados numa sala com temperatura do ar e fotoperíodo controlados (20 °C e 14 horas de luz, respectivamente).

Inicialmente experimentou-se alimentar os organismos com *Artemia* congelada, mas, além de ser superior em tamanho a *M. slabberi*, diminuía drasticamente a qualidade da água, pelo que esta hipótese foi abandonada. Em experiências de cultura de misidáceos, nauplii de *Artemia* são tradicionalmente utilizados como alimento (DOMINGUES, 2000). Os cistos de *Artemia* foram eclodidos em condições de luz intensa, temperatura de 25 °C, salinidade média de 27, com arejamento forte e permanente.

Os organismos foram alimentados diariamente com *Artemia* eclodida há 24 horas, *ad libitum*, uma vez que os misidáceos são canibais e comem-se uns aos outros se não estiver disponível alimento suficiente (DOMINGUES, 2000). Sempre que se julgou necessário, removeu-se o excesso de alimento acumulado no fundo dos frascos.

RESULTADOS

A utilização do meio ASTM foi abandonada após várias tentativas, uma vez que se revelou letal: os organismos morreram num período de tempo variável entre as 2 e as 5h ou, apesar de resistirem à transferência progressiva de salinidades, não sobreviveram por mais de 12h.

Pelo contrário, a solução de água do mar preparada em laboratório mostrou-se de alta tolerância para estes organismos. Na Tabela I encontram-se as condições que conduziram ao sucesso na aclimação de *M. slabberi*. Alguns itens podem ser alterados: o número de organismos por frasco (nunca mais de 20 em 500 mL de água), a quantidade de água por frasco (dependendo do número de organismos) e a quantidade de água mudada (nunca inferior a 250 mL por dia). Por outro lado, condições como o tipo e frequência de alimentação, frequência de mudança de água, arejamento e temperatura do ar, devem ser seguidas conforme este protocolo e mantidas o mais constante possível.

Os parâmetros físicos e químicos, medidos antes e após a mudança de água, mantiveram-se estáveis enquanto durou a aclimação: a salinidade (Figura 3) variou ente 25.0 e 27.0 (erro-padrão: 0.170 antes da mudança de água; 0.140 após a mudança de água); a temperatura da água (Figura 4) oscilou entre 19.8 e 20.9 °C; o nível de oxigénio (Figura 5) esteve entre 61.1 e 81.6; o pH (Figura 6) apresentou valores de 7.55 a 8.42. Os valores de salinidade, com excepção do primeiro dia, foram sempre superiores antes da mudança de água. A água de substituição é preparada a salinidade 25 e a introdução de alimento implica um aumento na salinidade (uma vez que a eclosão de *Artemia* envolveu a utilização de um meio com salinidade superior à do meio de aclimação), embora este

aumento só seja visível algumas horas após a introdução – daí que o valor de salinidade do dia seguinte seja sempre superior. Os valores de pH apresentaram um padrão semelhante, sendo este também devido à renovação da água. A maior variação verifica-se nos valores do nível de oxigénio, o que é facilmente explicado pelo constante arejamento a que estão submetidas as soluções e que não permite a total estabilização da sonda (para tal é necessário que não existam quaisquer movimentos na solução monitorizada).

Tabela I. Resumo das condições gerais, durante os 12 dias de aclimação.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Tipo de teste	Semi-estático
Salinidade	25 ± 2 PSU
Temperatura	20 ± 2°C
Fotoperíodo	14:10h (luz artificial)
Tipo de frasco	Vidro, transparente, com tampa
Tipo de água	Do mar artificial (SERA PREMIUM® em água destilada)
Volume de água	500 mL
Mudança de água	250 mL dia ⁻¹
Arejamento	Constante, moderado
Nº de misidáceos	15 adultos
Nº de réplicas	4
Alimento	<i>Artemia</i> 24h; <i>ad libitum</i>
Sedimento	Sem sedimento
Monitorização	Diária

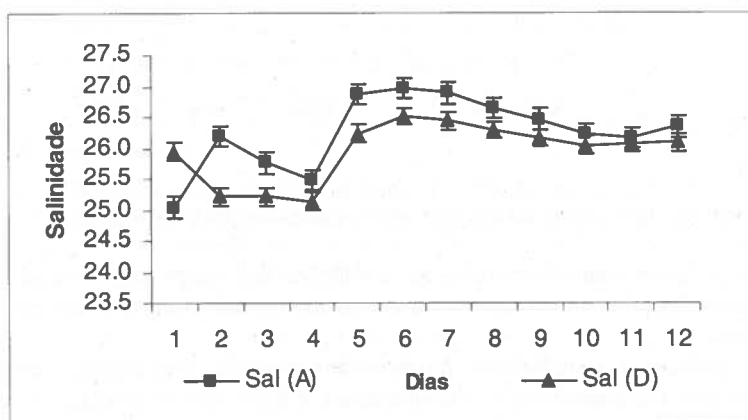


Figura 3. Variação média da salinidade antes (A) e após (D) a mudança de água, durante o período de aclimação, nas 4 réplicas (média ± erro-padrão).

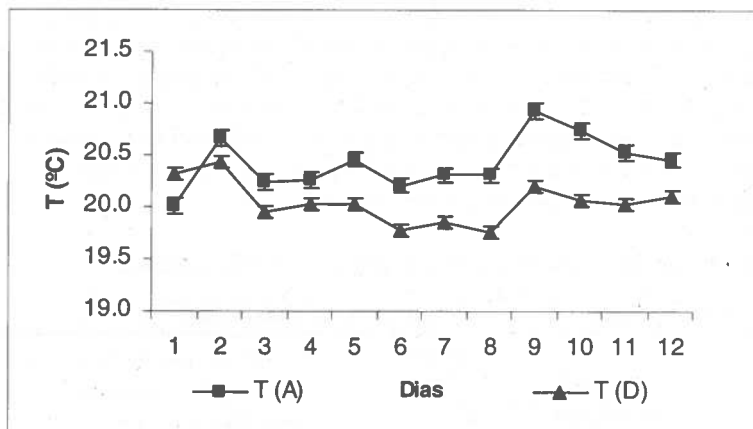


Figura 4. Variação média da temperatura da água (°C) antes (A) e após (D) a mudança de água, durante o período de aclimação, nas 4 réplicas (média \pm erro-padrão).

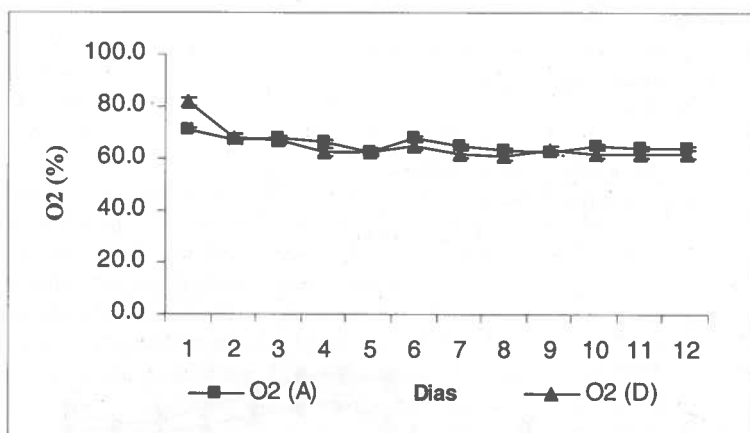


Figura 5. Variação média do nível de oxigénio (%) antes (A) e após (D) a mudança de água, durante o período de aclimação, nas 4 réplicas (média \pm erro-padrão).

Foi possível manter estáveis as condições ao longo de 12 dias, o que demonstra a eficácia do protocolo proposto, quando aplicado de uma forma rigorosa.

Em relação à mortalidade, também monitorizada diariamente, apresentou valores relativamente baixos. Verificaram-se 2 baixas no sexto dia e outras 2 no sétimo. Assim, num total de 60 espécimes morreram 4, o que corresponde a uma mortalidade de 6.7 %, um valor bastante aceitável, se tivermos em conta a duração da aclimação face ao curto ciclo de vida desta espécie (WITTMANN,

1992). É curioso notar que se verifica uma maior mortalidade a meio do período de aclimação, contrariamente ao que seria de esperar, uma vez que os dias mais críticos seriam os primeiros, em que os organismos se estariam a adaptar a um novo meio e suas características particulares.

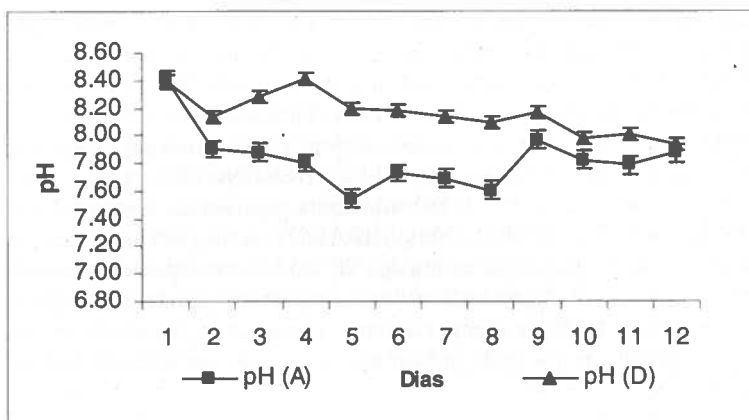


Figura 6. Variação média do valor de pH antes (A) e após (D) a mudança de água, durante o período de aclimação, nas 4 réplicas (média \pm erro-padrão).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Um sistema de água estático, em culturas de misidáceos, apresenta várias vantagens e desvantagens quando comparado com sistemas de renovamento contínuo. Enquanto que em sistemas estáticos os misidáceos não têm que despende muita energia para manter a sua posição, uma vez que não existe qualquer corrente (DOMINGUES *et al.*, 1998), nos sistemas com renovamento constante, os organismos são orientados para a corrente (MAUCLINE, 1980). Outra desvantagem dos sistemas com renovamento constante é que os nauplii de *Artemia* são constantemente arrastados para o filtro, onde ficam aprisionados, obstruindo esta estrutura (WARD, 1991). Por outro lado, um sistema estático permite a acumulação de produtos de excreção e outros desperdícios, originando uma água de baixa qualidade. Elevadas concentrações de amónia, nitrato e nitrito e escasso oxigénio dissolvido são condições que conduzem a um aumento da mortalidade dos misidáceos (BRANDT *et al.*, 1993). Assim, não só num sistema de cultura, mas também num processo de aclimação como é o do presente estudo, a escolha do tipo de sistema é muito importante para uma manutenção satisfatória de misidáceos. O sistema utilizado (semi-estático) reúne as vantagens do estático devido à não existência de corrente e as de um sistema de renovamento constante, uma vez que há uma mudança periódica e controlada da água. Através dos dados fornecidos pela monitorização diária dos parâmetros físicos e químicos e dos valores de mortalidade, pode afirmar-se que o sistema

semi-estático funcionou muito bem e é apropriado para o processo de aclimação de *M. slabberi*. A logística e materiais utilizados para manter o sistema de aclimação como descrito são simples e económicos e podem facilmente ser instaladas noutros laboratórios.

Outro factor importante para que a aclimação seja alcançada com sucesso é a densidade de misidáceos. Se, por um lado, maior densidade significa que mais misidáceos vão crescer no mesmo espaço, o que é importante devido à baixa fecundidade destes organismos, por outro aumenta as possibilidades de ocorrência de canibalismo e conduz a uma diminuição da qualidade da água (DOMINGUES *et al.*, 1999). Os valores obtidos na literatura para densidades de misidáceos são muito variáveis: 50 ind.L⁻¹ (DOMINGUES *et al.*, 1998) e 6 ind.L⁻¹ (REITSEMA & NEFF, 1980) utilizando *Mysidopsis almyra*; 2.4 ind.L⁻¹ para *Mysidopsis bahia* (WARD, 1991). BRANDT *et al.* (1993) sugere que, em culturas de *Neomysis mercedis*, acima dos 20 ind.L⁻¹ são esperadas mortalidades elevadas. O número de organismos utilizado por frasco foi de 15 em 500 mL e não foi observado nenhum comportamento competitivo, canibalismo ou uma elevada mortalidade, o que pode indicar que se trata de um número adequado de misidáceos.

A alimentação não constitui um problema técnico na aclimação de *M. slabberi* em sistemas semi-estáticos, uma vez que a eclosão de cistos de *Artemia* é fácil e rápida. No entanto, os custos associados à utilização de *Artemia* representam uma elevada despesa. Apesar de os nauplii de *Artemia* terem sido muito utilizados nos últimos anos em culturas de misidáceos, o preço dos cistos é muito elevado e tem vindo a aumentar, tornando-se numa dieta dispendiosa em culturas de misidáceos em larga escala (DOMINGUES *et al.*, 1998). Experiências realizadas de comparação de dietas de *Artemia* e de *Artemia* enriquecida mostram que a utilização de um factor de enriquecimento não conduz a um aumento na reprodução, mas melhora significativamente a sobrevivência de juvenis (DOMINGUES *et al.*, 2002). Neste trabalho foi inicialmente experimentada, em testes preliminares, uma dieta de *Artemia* congelada. No entanto, para além de diminuir a qualidade da água, não era comida por *M. slabberi*. WARD (1991) observou que espécies de *Mysidopsis* parecem preferir presas que se movimentam, como nauplii de *Artemia* e o mesmo parece ter acontecido com a espécie deste estudo. Dietas que utilizam fitoplâncton ou compostos artificiais apresentam uma produção e taxa de sobrevivência significativamente mais baixas (DOMINGUES *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a manutenção da qualidade da água parece ter sido o factor que mais afectou a sobrevivência dos organismos, mais do que a densidade ou o canibalismo. Daí que se tenha estabelecido uma mudança de água diária e em considerável quantidade (50%). Por outro lado, a deterioração da qualidade da água parece ser causada por concentrações elevadas de presas (nauplii de *Artemia*), acima do necessário, tal como observado por DOMINGUES *et al.* (1999).

A escolha de água do mar artificial foi feita na tentativa de eliminar possíveis fontes contaminantes. REITSEMA & NEFF (1980) concluíram que, quando se utiliza água do mar artificial é muito importante que esta seja preparada com água destilada, uma vez que soluções preparadas com água da torneira provocam baixa sobrevivência e uma notória diminuição da fecundidade.

Em conclusão, pode afirmar-se que é possível aclimatar *M. slabberi* durante um período considerável de tempo e com baixa mortalidade. Para tal, o protocolo proposto deve ser seguido de forma a assegurar o sucesso da aclimação. A utilização de água do mar artificial preparada a partir de água destilada e renovada frequentemente, o controlo do número de organismos por litro, assim como a escolha e verificação da quantidade de alimento disponível constituem as condições chave para uma aclimação com êxito.

Estes resultados são promissores mas o grande avanço para o desenvolvimento de um robusto e fidedigno método de teste irá requer o desenvolvimento de um sistema de cultura capaz de produzir juvenis de *M. slabberi*.

AGRADECIMENTOS

É de agradecer o valor técnico da ajuda dada pelo Sr. Aldiro, conduzindo o barco e ajudando durante os arrastos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTM 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E-790-80. ASTM. Philadelphia.
- AZEITEIRO, U. M. M., JESUS, L., MARQUES, J. C. 1999. Distribution, population dynamics and production of the suprabenthic mysid *Mesopodopsis slabberi* in the Mondego estuary, Portugal. *J. Crustac. Biol.* 19: 498-509.
- AZEITEIRO, U. M., FONSECA, J., MARQUES, J. C. S. 2001. Biometry, estimates of production and seasonal variation in the biochemical composition of *Mesopodopsis slabberi* (Van Beneden, 1861 (Crustacea: Mysidacea). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 17: 15-25.
- BRANDT, O. M., FUJIMURA, R. W., FINLAYSON, B. J. 1993. Use of *Neomysis mercedis* (Crustacea: Mysidacea) for estuarine toxicity tests. *Trans. Am. Fish. Soc.* 122: 279-288.
- CUNHA, M. R., SORBE, J. C. & MOREIRA, M. H. 1999. Spatial and seasonal changes of brackish peracaridean assemblages and their relation to some environmental variables in two tidal channels of Ria de Aveiro (NW Portugal). *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 190: 69-87.
- DAUBY, P. A. 1995. A $\delta^{13}C$ study of the feeding habits in four Mediterranean *Leptomysis* species (Crustacea: Mysidacea). *Mar. Ecol.* 16: 93-102.
- DOMINGUES, P., TURK, P. E., ANDRADE, J. P. & LEE, P. G. 1998. Pilot-scale production of mysid shrimp in a static water system. *Aquat. Int.* 6: 387-402.
- DOMINGUES, P. M., TURK, P. E., ANDRADE, J. P. & LEE, P. G. 1999. Cultures of the mysid *Mysidopsis almyra* (Bowman), (Crustacea: Mysidacea) in a static water system: effects of density and temperature on production, survival and growth. *Aquacult. Res.* 30: 135-143.
- DOMINGUES, P., FORES, R., TURK, P. E., LEE, P. G. & ANDRADE, J. P. 2000. Mysid culture: lowering costs with alternative diets. *Aquaculture Research* 31: 719-728.

- DOMINGUES, P. M., TURK, P. E., ANDRADE, J. P. & LEE, P. G. 2002. Effects of different food items on the culture of the mysid shrimp *Mysidopsis almyra* (Crustacea: Peracaridea) in a static water system. *Aquat. Int.* 00: 1-8.
- DRAKE, P., ARIAS, A. M. & CONRADI, M. 1997. Aportación al conocimiento de la macrofauna supra y epibentónica de los caños mareales de la bahía de Cádiz (España). *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.* 23: 133-141.
- GOMOIU, M. T. 1978. Quantitative data concerning the distribution and ecology of *Mesopodopsis slabberi* (van Beneden) at the Danube River mouths area. *Cercet. Mar.* 11: 103-112.
- GREENWOOD, J. G., JONES, M. B. & GREENWOOD J. 1989. Salinity effects on brood maturation on the mysid crustacean *Mesopodopsis slabberi*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 69: 683-694.
- HOSTENS, K. & MEES, J. 1999. The mysid-feeding guild of demersal fishes in the brackish zone of the Westerschelde estuary. *J. Fish Biol.* 55: 704-719.
- MACQUART-MOULIN, C. L. 1965. Les mysidacés benthoplanctoniques du Golfe de Marseille. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume*, Faculté des Sciences de Marseille 54: 211-221.
- MAUCLINE, J. 1980. The biology of mysids and euphausiids. Part 1. The biology of mysids. In: J. H. S. Blaxter, F. S. Russel & C. M. Yonge (ed.). *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London 18: 1-369 pp.
- MEES, J., CATTRIJSSE, A. & HAMERLYNCK, O. 1993. Distribution and abundance of shallow-water hyperbenthic mysids (Crustacea, Mysidacea) and euphausiids (Crustacea, Euphausiacea) in the Voordelta and the Westerschelde, southwest Netherlands. *Cah. Biol. Mar.* 34: 165-186.
- MEES, J., FOCKEDEY, N. & HAMERLYNCK, O. 1995. Comparative study of the hyperbenthos of three European estuaries. *Hydrobiologia* 311: 153-174.
- LUIS, A. S. 1998. *Influência de fatores humanos e naturais nas limícolas (aves, Charadrii) invernantes na Ria de Aveiro, com especial referência ao Pilrito-comum (Calidris alpina L.)*. Tese de doutoramento. Universidade de Aveiro, Portugal, 222 p.
- OHTSUKA, S., INAGAKI, H., ONBE, T., GUSHIMA, K. & YOON, Y. H. 1995. Direct observations of groups of mysids in shallow coastal waters of western Japan and southern Korea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 123: 33-44.
- PASTORINHO, M. R., ANTUNES, C. P., MARQUES, J. C., PEREIRA, M. L., AZEITEIRO, U. M. M., MORGADO, F. M., 2003. Histochemistry and histology in planktonic ecophysiological processes determination in a temperate estuary (Mondego River estuary, Portugal). *Acta Oecol.* 24: S235-S243.
- REITSEMA, L. & NEFF, J. M. 1980. A recirculating artificial seawater system for the laboratory culture of *Mysidopsis almyra* (Crustacea: Pericaridea). *Estuaries* 3: 321-323.
- WARD, S. 1991. Techniques to enhance laboratory culture of *Mysidopsis bahia*. *Am. Fish. Soc. Symp.* 9: 182-191.
- WEBB, P. & WOOLDRIDGE, T. H. 1987. Feeding of *Mesopodopsis slabberi* (Crustacea, Mysidacea) on naturally occurring phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 38: 115-123.
- WEBB, P. & WOOLDRIDGE, T. H. 1990. Diel horizontal migration of *Mesopodopsis slabberi* (Crustacea: Mysidacea) in Algoa Bay, Southern Africa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62: 73-77.
- WITTMANN, K. J. 1992. Morphogeographic variations in the genus *Mesopodopsis* Czerniavsky with descriptions of the three new species (Crustacea, Mysidacea). *Hydrobiologia* 241: 71-89.

FISHES, CUTTLEFISHES AND THE ENVIRONMENTAL STATUS OF THE RIA DE AVEIRO ESTUARINE LAGOON (PORTUGAL)

Lúcia Pombo, Cláudia Dias, Carla Lopes & José Eduardo Rebelo
University of Aveiro, Department of Biology, 3810-193 Aveiro - Portugal

Pombo, L., Dias, C., Lopes, C. & Rebelo, J. E. 2003. Fishes, cuttlefishes and the environmental status of the Ria de Aveiro estuarine lagoon (Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 103-118.

Commercial fish assemblage and cuttlefish population were examined for patterns in spatial structure within an estuarine coastal lagoon, Ria de Aveiro. Three years of abiotic conditions variation were recorded to identify factors responsible for maintaining structure of fish assemblages and cuttlefish population. Nine sites were monthly sampled with a traditional beach-seine net "chinha", between November 1998 and October 2000 for fish, and a trawl net "zorro", between June 2001 and May 2002 for cuttlefish. Most fish and cuttlefish abundance changed significantly between sites. Salinity, pH, turbidity and depth changed significantly between sites. Depth significantly decreased and pH significantly increased from the first to the second year of fish sampling. Correlations between fish assemblage structure and abiotic factors were identified. Temperature and salinity are key factors above abundance of migrant species, and, dissolved oxygen and depth are important to explain fish migrations within the lagoon. Trophic analysis indicates that dietary groups do not affect the general positioning of fish within the area. Thus, the environmental-biological interactions appear to have a greater effect on fish distribution than do biological interactions.

Key words: fish fauna, cuttlefish, diversity, environmental factors, Ria de Aveiro.

Pombo, L., Dias, C., Lopes, C. & Rebelo, J. E. 2003. Peixes, chocos e o estado ambiental da laguna estuarina Ria de Aveiro (Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 21: 103-118.

A comunidade de peixes comerciais e a população de chocos foram estudadas em padrões de estrutura espacial ao longo da

laguna costeira estuarina, Ria de Aveiro. Durante três anos foram registadas as condições abióticas do ecossistema para identificar os factores responsáveis pela manutenção da estrutura da comunidade de peixes e da população de chocos. Os peixes foram capturados com a "chinha", uma rede de cerco tradicional da região e o choco foi capturado com uma rede de arrasto também tradicional, o "zorro". Foram efectuadas amostragens mensais, em nove locais de amostragem, entre Novembro de 1998 e Outubro de 2000, para o caso dos peixes, e entre Junho de 2001 e Maio de 2002 para o caso do choco. A abundância da maioria das espécies de peixes e chocos variou significativamente entre as estações. A salinidade, o pH, a turbidez e a profundidade variaram significativamente entre as estações. A profundidade diminuiu e o pH aumentou significativamente do primeiro para o segundo ano de amostragem de peixes. Foram estabelecidas correlações entre a estrutura das comunidades de peixes e os factores abióticos. A temperatura e a salinidade são os factores chave na abundância das espécies migradoras, e o oxigénio dissolvido e a profundidade são importantes para explicar as migrações dos peixes dentro da laguna. A análise trófica indica que os grupos alimentares não afectam o posicionamento geral dos peixes na laguna, por isso, as interacções abióticas-biológicas aparentam ter maior efeito na distribuição dos peixes do que as interacções biológicas.

Palavras-chave: peixe, choco, diversidade, factores ambientais, Ria de Aveiro.

INTRODUCTION

Assemblages of estuarine organisms vary in time and space, largely because estuaries have widely varying environmental characteristics and they serve as nurseries for many productive and dependent marine species (ROGERS *et al.*, 1984; ELLIOTT & HEMINGWAY, 2002). The habitats, and consequently the fish assemblages, are also potentially affected by several anthropogenic influences which may have a direct influence on the food resources, distribution, abundance, growth, survival and behaviour of the fauna present (WHITFIELD, 1996).

The main estuarine water quality parameters, salinity, temperature, turbidity, pH and dissolved oxygen are known to affect fish distribution (BLABER & BLABER, 1980). Sediment characteristics, substratum heterogeneity and vegetation also affect fish distribution through their influence on prey availability (MARCHAND, 1993) and protection from predators (BLABER & BLABER, 1980). The studies on fish assemblage structure have a high value in estuarine quality assessment (ELLIOTT *et al.*, 1988; POMFRET *et al.*, 1991)

although causal links have to be determined between environmental parameters and fish assemblage structure and functioning.

The Ria de Aveiro (Figure 1), on the west coast of Portugal is an estuarine coastal lagoon with a maximum length of 45 km and maximum width of 11 km delimit a total area between 42 km² (low tide) and 47 km² (high tide) (BARROSA, 1980). The water volume is 70 million m³, with an oceanic tidal contribution of between 25 million m³ (neap-tides) to 90 million m³ (higher spring tides). Four rivers (Vouga, Antuã, Caster and Boco) and uncounted streams flow between 3 m³.s⁻¹ and 60 m³.s⁻¹ due to the influence of seasonal precipitation and run-off patterns. The depth varies between 0.6 m and 10.0 m. The nature of the sediments, the grain size in particular, is extremely variable. Its composition varies between 20 to 90% sand, 10 to 80% of silt and 0 to 30% of clay. In the north the sediments are finer but become coarser with progression to the south (BORREGO *et al.*, 1994).

The lagoon receives considerable raw and treated wastewater effluent and three main pollution types are apparent: organic and chemical pollution from paper-pulp factories (in the rivers of Vouga and Antuã); chemical pollution, particularly mercury, from the industrial area of Estarreja (in Laranjo area); and microbial contaminants from the urban sewage effluent and cattle raising areas (Ílhavo channel, Vouga river and Ovar channel) (HALL, 1980; LIMA, 1986; LUCAS *et al.*, 1986; BORREGO *et al.*, 1994).

The particular abiotic attributes of the Ria de Aveiro lagoon – shallowness, high turbidity, nature of the substrate, temperature, salinity and oxygen – associated with its high biotic productivity, offer excellent conditions for

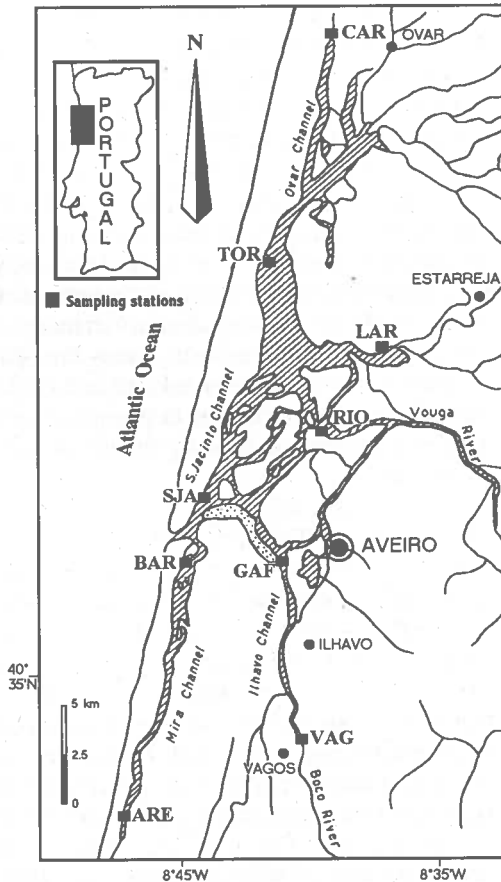


Figure 1 - Map of the Ria de Aveiro lagoon showing sampling sites.

colonization by many species, especially teleosts (POTTER *et al.*, 1990; REBELO, 1992; POMBO & REBELO, 2002). The biology and ecology of fish species in the Ria de Aveiro have been recently characterized in various studies (REBELO, 1992; POMBO & REBELO, 2000; REBELO & POMBO, 2001; POMBO & REBELO, 2002). The importance of cuttlefish, *Sepia officinalis*, has been increasing in the recent years, both in terms of landings and relative importance among other marine resources. The absence on data about cuttlefish and its high economical importance in the Ria de Aveiro was determinant to include this species in this study. The novelty of this paper is the study of two subsequent years of fish and environmental factors, which improve the analysis of any tendency of fish or abiotic variance.

The present study aims to assess the spatial characteristics and community structure of some commercial fish and cuttlefish populations within the estuary and to determine variations in population with respect to environmental factors. The interactions of feeding habits of various fish species have also been examined.

MATERIAL AND METHODS

Fish were monthly sampled, between November 1998 and October 2000, with "chinchá", a traditional beach-seine net and cuttlefish were monthly sampled between June 2001 and May 2002 with a traditional trawl net "zorro". Samples were taken in triplicate, at low tide during the adjacent five days of spring tides (new moon) at nine sampling sites (Figure 1): near the mouth of the lagoon (Barra, Gafanha and São Jacinto); at the edges of the main channels (Areão, Carregal and Vagos); in the main freshwater area, highly organically enriched (Rio Novo de Príncipe); in the area showing the highest levels of industrial pollution (Laranjo), and approximately in the middle of the longest channel (Torreira).

Fish and cuttlefish were preserved by freezing and were identified using taxonomic keys of WHITEHEAD *et al.* (1986), BAUCHOT & PRAS (1987) and CAMBELL, 1988. The food items were identified using HAYWARD & RYLAND (1998). Species composition and the abundance of each species were recorded.

Ten fish species were selected for this study comprising the two most dominant species of each ecological guild according to the classification in ELLIOTT and DEWAILLY (1995). These categories are: (1) ER, estuarine residents; (2) MJ, marine juveniles; (3) MS, marine seasonal; (4) MA, marine adventitious; CA, diadromous migrant; and (6) FW, freshwater adventitious. Only the latter category was not considered because it was only found three specimens of only two species, *Carassius carassius* and *Gambusia affinis*.

Measurements of temperature (± 0.1 °C) and dissolved oxygen (± 0.01 mg.l-1) were taken with an oxygen meter (Consort Z621), salinity (± 0.1) with a refractometer (Atago), and pH (± 0.01) with a pH meter (WTW 330/set - 2). These parameters were only recorded at the water surface since preliminary

fieldwork had shown water column differences were not significant (REBELO, 1992). Turbidity (± 0.1 m) and depth (± 0.1 m) were measured with a Secchi disc after the triplicate fish and cuttlefish samplings at low tide of spring tides.

The distribution of species throughout the lagoon was established producing a percentage diagram of each single species per site, which indicates the tendency of a species to have a preferential area in each year separately.

Two-way ANOVA without replication (ZAR, 1984; SOKAL & ROHLF, 1995) was carried out in each species to test significant differences among the abundance of species between sites in each year. The same statistical test was assessed to test significant differences among the abiotic parameters between sites. Homogeneity of variances was tested using the Fmax test (ZAR, 1984; SOKAL and ROHLF, 1995). The abiotic analysis was completed using a t-test for a single parameter to determine if whether each year was different to the subsequent year only in the case of fish samplings (1998-99 and 1999-00) (ZAR, 1984; SOKAL & ROHLF, 1995). The package Sigma-stat for windows version 2.03 was used for these analyses.

Analysis of the assemblage was established on the abundance data using the statistical computer programme MVSP (KOVAC, 1998), a multivariate ordination technique, canonical analysis, which enabled the assemblage data to be assessed with respect to the environmental parameters. It gave an assessment of the relative importance of the parameters to the distribution of each species, as well as the factors of most importance to the community structure. The relative position of each species on the graph and its relationship to the environmental factors are given. The importance of the environmental factors is indicated by the relative length of vectors, the longer the vector the greater the influence on species distribution. In addition, the closer any two species are on the graph, the more similar their distribution; a similar relationship exists to the environmental parameters (MARSHALL & ELLIOTT, 1998).

The non-parametric Spearman Rank correlation analysis was used to determine the statistical significance of any relationship between the distinct species assemblages and abiotic factors and identify factors responsible for maintaining structure of the fish assemblages in each year separately.

Stomachs contents were analysed to the lowest possible taxonomic level, according to CAMBELL, (1988) and HAYWARD & RYLAND, (1998), with a stereo microscope (*Olympus SZ60-PT*) (630x) and an optic microscope (*Olympus CH 30*) (1000x). For diet quantitative analysis, frequency of occurrence described by HYSLOP (1980) and abundance were used. The weight of the prey items was not considered, since samples came from hauls conducted during different hours of the day and hence the digestion degree of the organisms ingested was different. Fish size will affect the prey taken (WOOTTON, 1990), thus the size of each fish was noted.

The diet of each species were subsequently analysed for the abundance of prey species and a Bray-Curtis similarity coefficient was performed followed by

production of a dendrogram to indicate the degree of feeding similarities and therefore the interspecific dietary interactions within the estuary. The package MVSP (KOVAC, 1998) was used for these analyses.

RESULTS

The presence of each species at each site was expressed as the percentage occurrence during two subsequent years for fishes and a different year for cuttlefishes showed in Figure 2. The spatial distributions considering the data monthly sampled of most species were significantly different. Only thinlip mullet, in the first year, and sardine, striped red mullet and flounder, in the second year, did not show a significant difference distribution within the lagoon. The distribution of sea bass was not statistically significant in both years, although the biological significance of any result based on a small sample size is questionable, especially in the first year (37 specimens) (Table 1). Cuttlefish showed a significantly difference distribution within the lagoon.

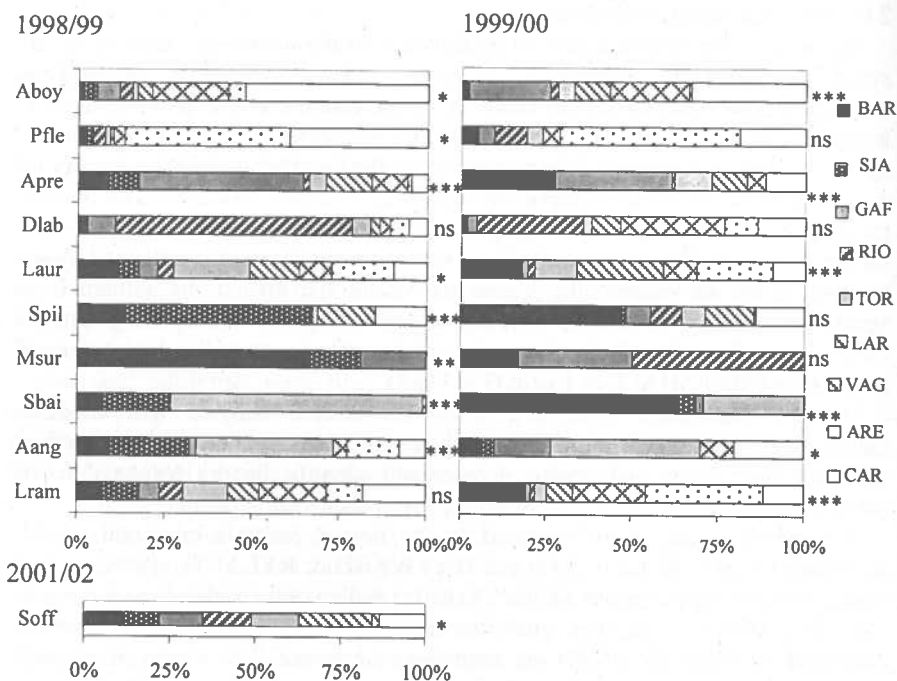


Figure 2 – Distribution of species at each site, as a percentage occurrence over the study period, each graph corresponds to a determined sampling year. Species abbreviations are explained in Table 1 and site abbreviations are explained in the text and shown in Figure 1. Significantly differences of species abundance within sites are shown (*): $p \leq 0.05$, (**): $0.05 \leq p \leq 0.01$; (***): $p \leq 0.001$; n.s.: $p \geq 0.05$.

Table 1 – Total abundance of species in each year of sampling, common names of the two more dominant species of each ecological guild, fish abbreviations and ecological guilds proposed by Elliott & Dewailly, 1995.

Species	Common name	Abbrev.	Ecological guild	Abundance (No.)		Biomass (kg)	
				1998/99	1999/00	1998/99	1999/00
<i>Atherina boyeri</i> Risso, 1810	Big-scale sand smelt	Aboy	Estuarine Resident	2082	2911	5,6	3,1
<i>Platichthys flesus</i> (Linnaeus, 1875)	Flounder	Pfle	Estuarine Resident	121	21	1,0	0,3
<i>Atherina presbyter</i> Cuvier, 1829	Sand smelt	Apré	Marine Juvenile	1011	1225	1,1	6,9
<i>Dicentrarchus labrax</i> (L., 1758)	European seabass	Dlab	Marine Juvenile	37	757	1,5	8,0
<i>Liza aurata</i> (Risso, 1810)	Golden grey mullet	Laur	Marine Seasonal	4273	5092	45,6	50,2
<i>Sardina pilchardus</i> (Waulbaum, 1792)	European pilchard	Spil	Marine Seasonal	8739	29478	13,7	13,7
<i>Mullus surmuletus</i> L., 1758	Striped red mullet	Msur	Marine Adventitious	21	12	0,9	0,6
<i>Symphodus bailloni</i> (Valenciennes, 1839)	Baillon's wrasse	Sbai	Marine Adventitious	93	159	1,4	1,4
<i>Anguilla anguilla</i> (L., 1758)	Eel	Aang	Catadromous	53	46	2,7	2,0
<i>Liza ramada</i> (Risso, 1826)	Thinlip mullet	Lram	Catadromous	627	1227	10,6	11,4

The environmental data (minimum, mean, and maximum) of each site and year is evident in Figure 3. Sampling sites are presented on the graphs from the minor distance to the lagoon entrance.

Salinity, pH, turbidity and depth showed extensive spatial statistically significant variations (Figure 3). Salinity varied from typically freshwater (ARE and RIO), brackish water (VAG, LAR and CAR), and marine water (BAR, SJA, GAF and TOR) close to the mouth of the lagoon (Figure 1) and decreased from the first to the second year but that difference was not significant ($p=0.429$). pH changed between acid (6.81) in the regions with higher chemical pollution problems, especially Hg concentrations, from the industrial complex of Estarreja (LAR) (Figure 1) (POMBO *et al.*, 2000) and alkaline (9.62) in the regions with urban effluents and farming activities (Ílhavo channel, Vouga River and Ovar channel) (VAG, RIO and CAR) (Figure 1). There was a statistically difference ($p<0.001$) of pH values in all the sites, from the first to the second year, becoming more alkaline, in spite of not having apparent natural or human reason for that change. Thus, it is questionable the significance of pH as it constantly varied during measurements. Turbidity varied between 20 cm at the edges of lagoon and 2 m, near the mouth of lagoon, where currents are stronger. There was not a statistical variation between the first and the second year ($p=0.088$) at all sites. Depth varied from the edges of channels (0.5 m) (ARE at south and TOR at north) to the inner regions of the lagoon (6 m) (RIO, VAG and LAR).

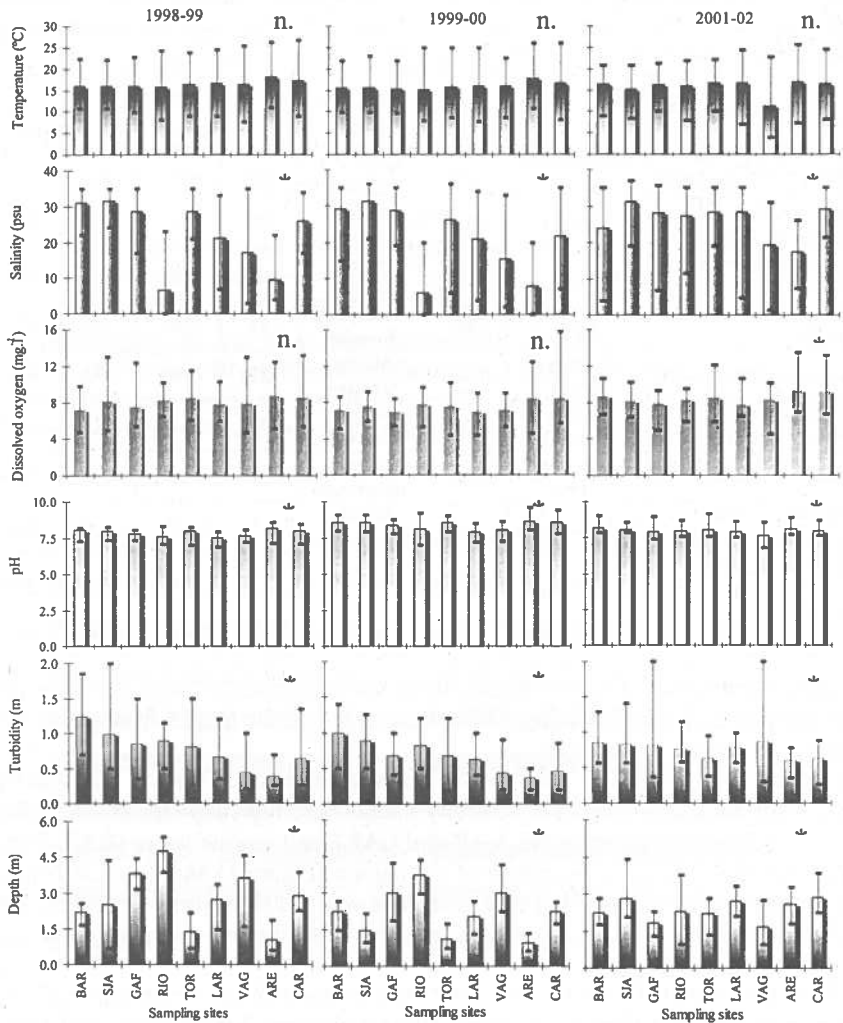


Figure 3 - Minimum, average and maximum values of abiotic parameters by sampling sites, each column of graphs corresponds to a determined sampling year. Site abbreviations are explained in the text and shown in Figure 1. Significantly differences of abiotic parameters between sites along months are shown (*): $p < 0.05$, (**): $0.05 \leq p < 0.01$; (***): $p < 0.001$; n.s.: $p \geq 0.05$.

There was a significant difference between the two years of fish samplings ($p < 0.001$) (Figure 2), being noticed a significant decreasing. The depth measure can be questionable, however it is possible to point out that there was a tendency

of depth decreasing, which was clearly noted along the years at all the sites, especially at the deepest regions. The distribution of sediment environments in the Ria de Aveiro is determined mainly by the morphology of the channels, the hydrodynamic regime and sediment sources (CUNHA, 1999). Sediment loading into the Ria system is particularly associated with the winter and spring flows of the River Vouga. Fine particles deposit in low-flow areas, mainly in the central and northern regions of the Ria, where the sediment is predominantly organic rich mud and muddy sand (CUNHA, 1999). The dominance of sandy sediments with very low organic content at the lower edges is closely related to the dynamic circulation regimen in these areas. Sandy sediments are also dominant all over the southern channel (Mira channel) due to the low input of solids from freshwater and terrestrial sources.

Temperature and dissolved oxygen were not spatially statistically significant in the three years. Temperature changed between 4 and 27 °C (Figure 3). The differences were significant among months (POMBO & REBELO, 2002) but not among sites; between the two subsequent years there was not a statistically difference ($p=0.440$). Dissolved oxygen varied from levels near the anoxia (4 mg.l^{-1}) and oversaturated values (13 mg.l^{-1}) but those values were not significant between sites. There was not a statistically significant difference, at the whole lagoon, between the two years.

The relative importance of the measured environmental factors to the dominant fish species is shown in Figure 4, as determined by canonical analysis. Axes 1 and 2 represented a total of 82 % and 80 %, respectively in each year, of the environmental influence on the species within the lagoon.

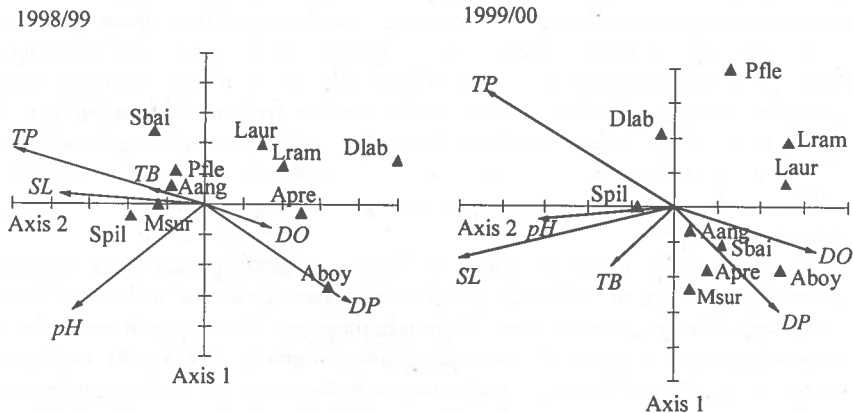


Figure 4. CCA ordination diagram of Ria de Aveiro dominant fish abundance with environmental factors represented by arrows: temperature (TP); salinity (SL); dissolved oxygen (DO); pH (pH); turbidity (TB) and depth (DP). Species abbreviations are explained in Table 1.

Ordinal values were calculated for each species and plotted on the graph allowing their positions relative to each other and to the environmental gradients to be assessed. The closer the species to the vector, the stronger the relationship, while the relative position along the vector will give the type of effect, i.e. increasing abundance with high or low values for the environmental variable (MARSHALL & ELLIOTT, 1998). Species located around the origin either did not show a strong relationship to any of the variables measured or are found at average values of each environmental variable measured. In addition, the opposition between temperature and salinity, and dissolved oxygen and depth are key factors to explain the fish distribution within the lagoon.

Temperature was the most important abiotic factor in the abundance distribution of species (Figure 4), reflecting the seasonally varying nature of the assemblage and proving to be the best predictor of total abundance. This seasonality is related more with the movements of fish from the sea to the lagoon (and vice-versa) than with migration within the lagoon. The majority of species had a higher abundance above average temperature and occur at the areas near the mouth of the lagoon, where the salinity and depth are higher (Figure 3). The temperature was particularly important in both years, in the distribution of seasonal migrant species that only colonises the lagoon in spring and summer, when the temperature is high. Salinity was important in both years above the abundance of sardine, sand smelt (APRE), and baillon's wrasse (SBAI).

Dissolved oxygen and depth highly influenced the abundance of fish, which occurs at deep regions (Figure 4), as big-scale sand smelt, which uses those sites as a refuge against eventual predators, also with high abundance on vegetation, and consequently high productivity.

The dominant 10 species showed some statistically significant correlations with environmental factors further demonstrated by the values of the Spearman correlation coefficients (Table 2). Turbidity influenced the abundance distribution of sand smelt and the catadromous species, thinlip mullet (LRAM) in both years. Depth influenced the distribution of golden grey mullet (LAUR) and baillon's wrasse (SBAI) in both years. The influence of pH was statistically significant in distribution of flounder (PFLE), baillon's wrasse (SBAI) and eel (AANG), but when pH increases, in the second year, that influence was not significant (Table 2).

The abundance of prey is ranked in Table 3 indicating that several feeding groups are present in fish species. The main food items of most species are copepods, detritus and bivalves, although they can feed opportunistically on other organisms (Table 3). The Bray-Curtis similarity (Figure 5) coefficient shows the degree of feeding similarities and therefore the dietary interactions within the estuary. Four groups can be established at 36 % of similarity (Figure 5). The two *Atherina* species are classed together at 68% of similarity. These species diet is based on bivalves, gastropods, annelids, insects and crustaceous. Sardine and the two species of mullets constitute the second group (Figure 5),

which diet is based essentially on copepods, detritus and algae. Flounder, seabass, eel, and striped red mullet also show similarities in diet, although smaller than the other groups (36 % of similarity), preferring small benthic and pelagic crustaceans, especially mysids, amphipods and *Sphaeroma* sp. Baillon's wrasse feed on almost strictly amphipods, forming a different group.

Table 2. The degree of correlation between the abundance of dominant species and environmental factors. Species abbreviations are explained in Table 1. TP- temperature (°C); SL- salinity (psu); OD- dissolved oxygen (mg.l-1); pH- pH; TB- turbidity (m); DP- depth (m). Significantly correlations between species abundance and abiotic parameters are shown (*): $p \leq 0.05$, (**): $0.05 \leq p \leq 0.01$; (***) : $p \leq 0.001$; n.s.: $p \geq 0.05$.

1998/99	TP	SL	DO	pH	TB	DP	1999/00	TP	SL	DO	pH	TB	DP
Aboy	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	Aboy	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**
Pfle	***	n.s.	n.s.	*	***	n.s.	Pfle	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Apri	n.s.	***	n.s.	n.s.	*	n.s.	Apri	n.s.	***	n.s.	n.s.	*	n.s.
Dlab	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	Dlab	***	*	***	n.s.	n.s.	n.s.
Laur	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	Laur	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***
Spil	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	Spil	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.
Msur	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	Msur	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sbai	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	***	Sbai	n.s.	***	n.s.	n.s.	***	**
Aang	**	n.s.	n.s.	**	n.s.	***	Aang	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lram	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	Lram	*	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.

DISCUSSION

Fish studies have importance in estuarine water quality evaluation and assessments of human impacts (ELLIOTT *et al.*, 1988; ELLIOTT & HEMINGWAY, 2002). Both fish abundance and species diversity can provide managers with a good indication of the health of a particular system (WHITFIELD, 1996). The Ria de Aveiro, a coastal estuarine lagoon, as others ecosystems in general (LEEUEWEN *et al.*, 1994), is a system highly influenced by the environmental abiotic changes, which affect the recruitment, distribution and the survival of fish species.

Environmental factors strongly influence fish assemblages but could not fully explain differences between assemblages. Salinity, pH, turbidity and depth changed significantly between sites. Temperature was found to be the most important abiotic factor affecting the abundance distribution of fish assemblage. Most species had a higher abundance above average temperature and occur at the areas near the mouth of the lagoon, where the salinity and depth are higher, especially the adventitious and seasonal migrant species.

Several natural and anthropogenic factors may have a direct influence on the environmental and consequently on food resources, distribution, abundance, growth, survival and behaviour of the fish present (WHITFIELD, 1996). It is important to point out that dredging in the Ria de Aveiro occurred in the

previous previous years, between October 1997 and May 1998, extracting a total of 1 510 000 m³ of sediment from the main channels (Ovar, Murtoosa, and Mira) (JAPA, 1993). This enlarged the tidal-range and the water removal, allowing a large variety of marine adventitious species, as baillon's wrasse, to enter the lagoon. After dredging, channels with high depth and consequently high potential of fish mobility in the water column, induces the entrance of typically marine species from the adjacent ocean. In spite of dredging, depth significantly decreased from the first to the second year of fish sampling. The strong precipitation in the second year of sampling, and consequently the raised flows

Table 3 – Food items abundance of dominant species during 1998/99, size range, total number of fish, and total number of analysed stomachs. Species abbreviations are explained in Table 1.

Food items	Estuarine Resident		Marine Juvenile		Marine Seasonal		Marine adventitious		Catadromous	
	Aboy	Pfle	Dlab	Apré	Laur	Spil	Sbai	Msur	Lram	Aang
Algae	21	0	1	26	90	2	0	0	57	10
<i>Ampelisca sp.</i>	0	0	0	0	0	0	6	0	0	12
Amphipoda	15	4	23	94	1	11	215	65	0	6
<i>Ampithoe sp.</i>	0	0	0	1	0	0	10	0	0	15
Annelida	127	9	14	462	4	1	1	0	14	2
Bivalvia	329	5	3	583	55	19	5	13	16	0
Branchiopoda	0	0	0	0	150	0	0	0	0	0
<i>Carcinus sp.</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5
Chironomidae	0	29	0	0	1	0	0	0	1	2
Copepoda	350	0	4	226	223	670	20	0	160	3
<i>Corophium sp.</i>	0	0	0	1	0	0	2	6	0	0
<i>Crangon sp.</i>	7	9	8	6	0	0	0	2	1	4
Crustacea	74	1	19	92	11	8	22	1	7	2
Crustacea larva	0	0	0	1	17	27	26	0	0	4
Cumacea	6	0	0	3	0	4	0	0	0	0
Decapoda	0	0	3	6	0	1	1	0	0	3
Detritus	15	12	0	26	839	83	4	0	156	2
Eggs	42	0	0	130	2	0	0	0	0	1
Fish	0	3	1	0	0	2	4	1	0	13
Formicidae	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0
<i>Gammarus sp.</i>	0	1	7	6	1	0	2	24	0	13
<i>Gastrosaccus sp.</i>	0	0	2	6	1	0	0	1	0	14
Gastropoda	90	0	0	138	36	156	0	0	43	0
<i>Gnathia sp.</i>	0	0	0	8	0	0	0	0	0	1
<i>Idotea sp.</i>	7	10	0	6	0	1	77	3	0	1
Insecta	52	51	0	174	107	11	2	0	24	6
Insecta larva	35	0	1	55	77	1	4	0	17	3
Isopoda	1	0	0	6	6	3	3	1	1	0
Mysidacea	25	38	21	47	6	35	7	32	0	23
<i>Neomysis sp.</i>	0	3	0	1	7	0	0	0	0	0
<i>Paramysis sp.</i>	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Ostracoda	10	0	0	18	6	0	0	0	0	0
Digested food	213	30	16	226	216	52	28	4	69	17
Polychaeta	21	8	8	57	51	4	2	0	0	18
<i>Praunus sp.</i>	5	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Sphaeroma sp.</i>	417	21	190	459	11	6	11	24	1	45
<i>Turbularia sp.</i>	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Size length (cm)	4-12	2-28	3-20	5-15	2-126	4-16	4-16	6-19	2-31	6-63
Total number indiv.	2503	121	37	1169	4273	8739	93	21	627	53
Analysed stomachs	346	78	34	493	1026	146	50	13	323	49

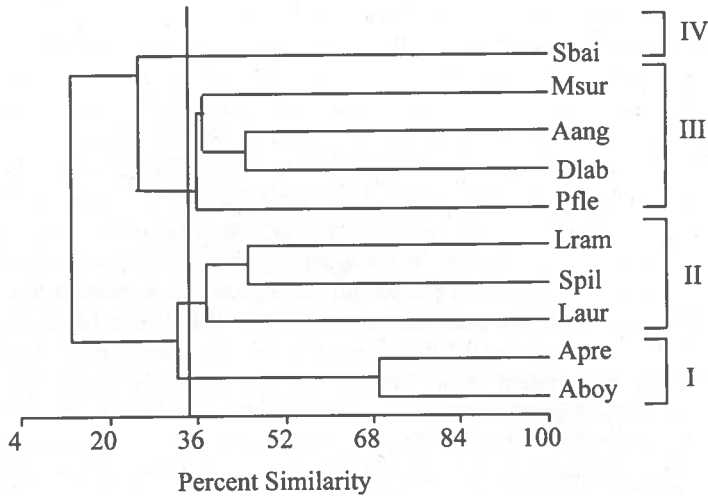


Figure 5. Bray-Curtis similarity analysis of stomach content data of dominant fish species during 1998/99. The vertical line defines 4 groups (I, II, III and IV) with similar diet composition.

of water leads to a bedstead deepen, transporting sediments from one region to another, changing substantially the substratum of the lagoon. These changes consequently modify the distribution of fishfauna, especially the benthonic fish, which migrate to deeper regions, as a strategy of protection against predators and minimization of food competition with others fish species (HARLEY *et al.*, 2001). In addition, pH significantly increased from the first to the second year of fish sampling. This may be a cause of salinity decreasing with a consequently different productivity patterns in the system. In spite of the significance of pH may be questionable, because of its high variance during the day, it is clear the tendency of increasing along the three years here analysed, which reflects somehow global changes in the environment of the lagoon.

Correlations between environmental factors and fish assemblage structure were identified. The opposition between temperature and salinity is important above marine seasonal migrant species, which only migrate to the lagoon when it finds favourable conditions. In addition, dissolved oxygen and depth are key factors to explain fish migrations within the lagoon. Those parameters influence most species in the second year, when both factors decreased. Thus, in the second year, big-scale sand smelt is not so abundant at the northern edges and occurs mainly at the south deep regions, where dissolved oxygen is high. In the first year, sea bass highly occurs at Rio Novo de Príncipe, and in the second year this species occurs mainly at the edges of the lagoon, the Ovar channel, in the north, and Ílhavo channel, in the south, where dissolved oxygen is low. It is relevant that the abundance of sea bass increased more than 20 times from one

year to another, and temperature, salinity and dissolved oxygen together appears to be important abiotic factors for that occurrence. The influence of pH is strong in the abundance of flounder, baillon's wrasse and eel, but when pH increases, in the second year that influence is not significant. This species occurred mainly at the north edge, with basic pH, in the first year. In the second year, when the pH values increases in the lagoon, the species moves to Barra, near the sea, with more alkaline values. Baillon's wrasse prefers alkalinity in water, its abundance in the second year almost duplicated in relation to the first year.

The relationships between environmental and biological variables are important, however the information on biological inter-relationships is also required to determine the patterns in distribution (MARSHALL & ELLIOTT, 1996). The most important of those patterns are the competition for food and space and the recruitment to the lagoon. The dietary analysis enables a further assessment of biological interactions of fish within the lagoon. Four groups of fish with similarities on food preference can be established. Apparently, it is not verified the overlapping spatial distributions with the alimentary groups, however, more information is required on the availability of prey organisms, especially on size or age classes of fish and spatial and temporal feeding habits to be sure of their effectiveness influence on the distribution of fishes within the lagoon.

This study constitutes a base on future studies that will include not only the abundance but also the biomass of fish, which gives a production perspective of the lagoon. Temporal variation on fish distribution and environmental factors will also be included in these studies, besides the spatial variation. It is important to point out that it is difficult to separate and analyse separately each environmental factor from the others, and it's known that they interact with each other. Besides that, many other factors were not considered in this study but have a great importance on fish distribution, namely the influence of tides, velocity and streams and also the human impacts. In what concerns cuttlefish this study only constitutes a preliminary analysis on distribution although further studies are predicted on aspects such as reproduction, spatial usage and trophic interactions with fish.

It can be concluded that Ria de Aveiro shows a dynamic and a variable environment, characterised to fluctuations on tide and significant variations in the abiotic and climatic parameters. These environmental variations regulate the distribution and the diversity of fishfauna, but do not fully explain all the differences between assemblages. In a food-rich lagoon, as Ria de Aveiro, the environmental-biological interactions appear to have a greater effect on fish distribution than do biological interactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the University of Aveiro and the Foundation of Science and Technology for their financial support for this study.

REFERENCES

- BARROSA, J. O. 1980. A Ria de Aveiro e a sua influência na economia da região. *Recursos hídricos* 1 (3): 83-96.
- BAUCHOT, M. L. & PRAS, A. 1987. *Guía de los peces de mar de España y de Europa*. Ediciones Omega, Barcelona.
- BLABER, S. J. M. & BLABER, T. G. 1980. Factors affecting the distribution of juvenile estuarine and inshore fish. *Journal of Fish Biology* 17: 143-162.
- BORREGO, C., CRUZ, M. M., GONÇALVES, P. 1994. *Estudo de avaliação da vulnerabilidade da capacidade de recepção das águas costeiras em Portugal*. Relatório R 3. 2. Meios receptores e suas características: (Be 1). Ria de Aveiro, Pateira de Fermentelos e Barrinha de Mira. IDAD - Projecto nº 13/94, 69 p.
- CAMBELL, A. C. 1988. *The seashore and shallow Seas of Britain and Europe*. Country Life Books, Hong Kong.
- CUNHA, M. M. P. R. 1999. *Peracaridan crustacea in Ria de Aveiro (NW Portugal): taxonomic composition and spatio-temporal structure of the assemblages; life history and secondary production of Corophium multisetosum Stock, 1952 (Amphipoda, Corophiidae)*. Ph. D. thesis, Univ. Aveiro, Portugal.
- ELLIOTT, M & HEMINGWAY, K. L. 2002. *Fishes in Estuaries*. Blackwell Science, Oxford, 636 p.
- ELLIOTT, M. & DEWAILLY, F. 1995. The structure and components of European estuarine fish assemblages. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 29 (3-4): 397-417.
- ELLIOTT, M., GRIFFITHS, A. H. & TAYLOR, C. J. L. 1988. The role of fish studies in estuarine pollution assessment. *Journal of Fish Biology* 33 (Supplement A): 51-61.
- HALL, A. 1980. Water quality problems in Ria de Aveiro. A preliminary assessment. In: *Seminar on actual problems of Oceanography in Portugal*, Lisboa, 20-21 de Novembro, 159-169.
- HARLEY X., KOUUBI, P. & GRIOCHE, A. 2001. Ecology of plaice (*Pleuronectes platessa*) in fish assemblages of beaches of the Opale coast (North of France) during spring 1977. *Cybiurn*, 25 (1): 67-80.
- HAYWARD, P. J. & RYLAND, J. S. 1998. *Handbook of the Marine Fauna of north west*. Oxford University press, United States.
- HYSLOP, E. J. 1980. Stomach contents analyses – a review of the methods and their application. *J. Fish Biol*, 17: 411-429.
- JAPA 1993. *Estudo de impacto ambiental – desassoreamento da Ria de Aveiro, 1ª fase*. Junta Autónoma do Porto de Aveiro. Edição do Porto de Aveiro. Aveiro. 1800 p.
- KOVACK 1998. *MVSP version 3. 01*. Copyright Kovack Computing Services. U. K.
- LEEUWEN, P. I. VAN; RIJNSDORP, A. D. & VINGERHOED, B. 1994. Variations in abundance and distribution of demersal fish species in the coastal zone of the Southeastern North Sea between 1980 and 1993. *Demersal Fish Committee* 10: 1-19.
- LIMA, C. 1986. *Impacto da poluição por mercúrio nos organismos aquáticos da Ria de Aveiro*. Relatórios do Instituto Nacional de Investigação das Pescas 66, 28 p.
- LUCAS, M. F., CALDEIRA, M. T., HALL, A., DUARTE, A. C., LIMA, C. 1986. Distribution of mercury in the sediments and fishes of the lagoon of Aveiro, Portugal. *Water Science and Technology*. 18: 141-148.
- MARCHAND, J. 1993. The influence of seasonal salinity and turbidity maximum variations on the nursery function of the Loire estuary (France). *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 27: 427-436.

- MARSHALL, S., ELLIOTT, M. 1996. The structure of the fish assemblage in the Humber Estuary, U. K. *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.* 21: 231-242.
- MARSHALL, S., ELLIOTT, M. 1998. Environmental influences on the fish assemblage of the Humber Estuary, U. K. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46: 175-184.
- POMBO, L. & REBELO, J. E. 2000. Ria de Aveiro ictiofauna: diversity in space and time. *Revista Biol. (Lisboa)*. 18: 69-81.
- POMBO, L. & REBELO, J. E. 2002. Spatial and temporal organisation of a coastal lagoon fish community – Ria de Aveiro, Portugal. *Cybium* 26 (3): 185-196.
- POMBO, L., BORGES, R., REBELO, J. E., DUARTE, A. C & BÓIA, C. 2000. Níveis de mercúrio no músculo de peixes (especialmente robalo, *Dicentrarchus labrax*, LINNAEUS, 1758) capturados no meio natural e em pisciculturas da Ria de Aveiro. Estudos de Biogeoquímica na Zona Costeira Ibérica. *IX Seminário Ibérico de Química Marinha*, Aveiro. 251-259 pp.
- POMFRET, J. R., ELLIOTT, M., O'REILLY, M. G. & PHILIPS, S. 1991. Spatial and temporal patterns in the fish communities in the U. K. North Sea estuaries. In: Elliott, M. & Ducrottoy, J.-P. (eds). *Estuaries and Coasts: Spatial and Temporal Intercomparisons* Olsen & Olsen. Fredensborg, Denmark. 277-284 pp.
- POTTER, I. C., BECKLEY, L. E., WHITFIELD, A. K. & LENANTON, R. C. J. 1990. Comparisons between the roles played by estuaries in the life cycles of fishes in temperate Western Australia and Southern Africa. *Environmental Biology of Fishes* 28: 143-178.
- REBELO, J. E. & POMBO, L. 2001. *Os peixes da Ria de Aveiro – diversidade, ecologia e distribuição*. Câmara Municipal de Aveiro, Aveiro. 111 p.
- REBELO, J. E. 1992. The ichthyofauna and abiotic hydrological environment of the Ria de Aveiro, Portugal. *Estuaries* 15 (3): 403-415.
- ROGERS, S. G., TARGETT, T. E. & VAN SANT, S. B. 1984. Fish nursery use in Georgia salt-marsh estuaries: the influence of springtime freshwater conditions. *Transactions of the American Fisheries Society*. 113: 595-606.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and company, 3rd ed. New York. 887 p.
- WHITEHEAD, P. J. P., BAUCHOT, M. L., HUREAU, J. C., NIELSEN, J. & TORTONESE, E. 1986. *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris.
- WHITFIELD, A. K. 1996. Fishes and the environmental status of South African estuaries. *Fisheries Management and Ecology*. 3: 45-57.
- WOOTTON, R. J. 1990. *Ecology of teleosts fishes*. Chapman & Hall. London. 41-56 pp.
- ZAR, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., 2nd ed. New Jersey. 718 pp.

ÍNDICE POR AUTORES

Almeida, R., Gonçalves, S., Romano, A. - Micropropagação de adelfeira. Contributos para a conservação e reprodução de uma espécie endémica da serra de Monchique.	29
Carvalho, S., Marques, J. C., Banha, M. M. & Fonseca, L. C. - Macrobenthic crustacea of the Bay of S. Torpes (Portugal).	57
Chá-Chá, R., Fernandes, F. & Romano, A. - Conservação de <i>Polystichum drepanum</i> (Sw.) C. Presl, pteridófito endémico da ilha da Madeira.	7
Clavijo, A., Díaz Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Alvarez Cansino, L., Correia, O. & García Novo, F. - A conservação de <i>Corema album</i> no litoral atlântico da Península ibérica; a influência de dispersores animais na regeneração natural.	43
Costa, A. M., Cristo, M. & Cancela da Fonseca, L. - Annual cycle of the benthic community of a coastal lagoon: Lagoa de Melides (Grândola, SW Portugal).	71
Gonçalves, S., Jesus, J. & Romano, A. - Produção <i>in vitro</i> de plantas de <i>Drosophyllum lusitanicum</i> com vista à sua conservação.	17
Pombo, L., Dias, C., Lopes, C. & Rebelo, J. E. - Fishes, cuttlefishes and the environmental status of the Ria de Aveiro estuarine lagoon (Portugal).	103
Sardo, A. M., Azeiteiro, U. & Morgado, F. - Condições de aclimação de <i>Mesopodopsis slabberi</i> (van Beneden) (Crustacea: Mysidacea) num sistema semi-estático.	91

BACKFILE ISSUES
of this journal are available on
35 MM MICROFILM
University Microfilms

A Xerox Company Ann Arbor, Michigan 48106
Write for catalog and complete information.