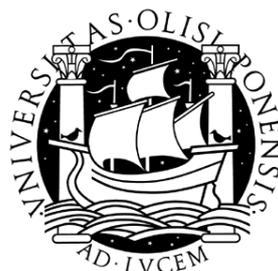


Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Desenvolvimento Larvar da Savelha (*Alosa fallax*)
- Descrição Morfológica e Influência da Temperatura
e da Salinidade no Crescimento

Tiago Navarro Marques

Mestrado em Pescas e Aquacultura

2011

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Desenvolvimento Larvar da Savelha (*Alosa fallax*)
- Descrição Morfológica e Influência da Temperatura
e da Salinidade no Crescimento**

Tiago Navarro Marques

**Dissertação co-orientada por
Prof. Doutora Maria João Collares-Pereira**

Doutor Filipe Ribeiro

Mestrado em Pescas e Aquacultura

2011

AGRADECIMENTOS

Venho aqui formalizar o reconhecimento da importância da intervenção de entidades singulares ou conjuntas, que não eu ou os eu's passados, na concretização deste documento. Ao interessado em informação objectiva na temática da dissertação sugiro ignorar esta secção na íntegra, ou que me ignore e a continue a ler se por esta palavra estiver a fruir da piada. Fica o aviso à estilística incoerente e deselegante que se segue.

Ao Carlos Carrapato e ao Filipe Ribeiro, um especial obrigado. Tanto é meu quanto é vosso.

Tenho a agradecer à Professora Maria João Collares-Pereira ter permanecido como elo de conexão à instituição formadora após várias iterações teóricas respeitantes à escolha do objecto de estudo.

Estou grato à Professora Filomena Magalhães por todo apoio na realização da componente estatística do trabalho e o positivismo crítico que sempre transmitiu.

Ao Professor Gabriel Martins quero agradecer a ajuda que me prestou com as fotografias ilustrativas dos estádios larvares.

A todos os Professores que fizeram por transmitir o seu conhecimento e aos colegas com que convivi, obrigado.

Pela permissão de realizar este trabalho nas instalações da sede do Parque Natural do Vale do Guadiana é devido um agradecimento cordial ao Dr. João Alves e ao Dr. Pedro Rocha, Director e Director-adjunto das áreas classificadas do Sul, como representantes administrativos do ICNB.

À restante equipa sedeadada nesta área protegida, nomeadamente à Célia, às Cristinas, Cardoso e Silva, à Eunice, ao Fernando, à Joana, à Nita, à Teresa e, por extensão, à Raquel, agradeço por acolherem calorosamente a minha intromissão desinibida no vosso local de trabalho.

Ao Tio João e ao Zé dos Canais agradeço por me terem levado à pesca e fornecido o material biológico livre de encargos.

Ao Carlos Viegas agradeço por me ter aberto as portas de casa e do Clube Náutico de Mértola.

Aos atletas do Clube Náutico de Mértola agradeço o companheirismo e a competitividade.

À Câmara Municipal de Mértola agradeço a miríade de eventos e actividades recreativas.

À Sara agradeço por me levar à praia e às actividades recreativas, sociais e afins.

À equipa do Aquário Vasco da Gama, instituição onde desde a infância sempre fui bem recebido, agradeço-o.

Ao Doutor Pedro Pousão e à Doutora Sara Castanho agradeço por me terem recebido na Unidade de Investigação de Aquacultura do IPIMAR.

Às Doutoras Ana Amorim e Vera Veloso do IO da FCUL agradeço as culturas de microalgas.

À Doutora Elsa Cabrita agradeço pela informação relativa à criopreservação de esperma.

Ao Doutor Eduardo Esteves agradeço por partilhar informação relativa aos trabalhos que realizou com *Alosa* spp.

To Doctor Andreas Scharbert I thank for the literature provided on *Alosa* spp.

À Doutora Cláudia Mieiro agradeço o envio de documentação via CTT.

À Doutora Ana Veríssimo agradeço a análise genética para confirmação da espécie.

À Doutora Carla Sousa-Santos agradeço o incentivo na escolha de um modelo biológico.

A quem ainda estiver a ler, agradeço a paciência e agradeço a quem ignorar que os agradecimentos integram este documento, ou existem de todo.

Agradeceria não ter de agradecer, mas como tenho, agradeço a mim por ter concluído o mestrado e a tempo, criando um paradoxo porque agradeço poder ser aleatório.

Y+gtyfifrbjk960y6ruc<gboçpklm8v87426sgrjgjm8kjyjt~lçdsdxvcbvbjnki...

Agradeço poder finalmente dormir, embora ainda não hoje.

Agradeço ter pernas para correr, comida para comer, casa para morar e todas aquelas coisas que tomo por garantidas.

Agradeço ao Manuel por me ter adoptado.

Agradeço ao Francisco por me inebriar.

Agradeço à irmã porque era fatela deixá-la de fora.

Agradeço ao avô por me ver completar este percurso académico.

Agradeço ao resto da família porque não tenho motivos para não agradecer.

Agradeço aos que são, aos que já não são e aos que hão de ser.

Agradeço a todos aqueles que me aturaram agonias.

Agradeço a todos aqueles que me estimularam.

Agradeço a todos aqueles e aqueles que mereciam menção mas não a tiveram, peço desculpa pelo esquecimento e, caso sirva de consolo, deixo um agradecimento ao Universo.

Hoje, agradeço.

Porque tenho e porque posso.

Mãe há só uma.

Pai já não há.

ABSTRACT

The twait shad, *Alosa fallax* (Lacepède, 1803), is an anadromous clupeid threatened by anthropogenic pressures from changes in the hydrological dynamics of river flow to limited connectivity of inland waters due to damming, among others. Population recovery is intrinsically dependent on the implementation of conservation measures for the rehabilitation of riverine ecosystems. The timely application of direct approaches aimed at strengthening population size may also be beneficial to its recovery. Therefore, the optimization of hatchery efforts is crucial to enable restocking programs. In this study we tested growth and mortality of *A. fallax* larvae from the Guadiana population reared at different temperature, salinity and feeding conditions. Results indicated that the temperature for optimal growth is somewhere between 24°C and 28°C, and that the optimal salinity for minimizing mortality in aquaculture systems in which the larvae are fed with *Artemia* spp. *nauplii* is close to 2,5 g/L. Moreover, the larval development of individuals from the same population reared under controlled conditions was described, from the moment of hatching to the completion of metamorphosis, using morphometric and meristic characters to define a series of larval stages easily identifiable. This study allowed obtaining important insights for the optimization of larval culture of *A. fallax*, as well as a relevant basis for the identification of larvae captured for recruitment assessments.

KEY-WORDS: *Ex situ* conservation, Fish stocking, Saltatory ontogenetic development, Larval stages, Guadiana.

RESUMO

A savelha, *Alosa fallax* (Lacepède, 1803), é um clupeídeo anádromo que se encontra ameaçado devido a várias pressões antropogénicas resultantes, essencialmente, da alteração da dinâmica hidrológica fluvial e da conectividade dos cursos de água interiores. A recuperação populacional desta espécie está intrinsecamente dependente da implementação de medidas de conservação visando, em particular, a reabilitação dos ecossistemas ribeirinhos. A aplicação pontual de abordagens dirigidas ao reforço directo dos efectivos populacionais poderá também ser benéfica à recuperação das populações actuais. Nesta perspectiva, a optimização dos esforços de produção larvar é crucial para a viabilização de programas de repovoamento, sendo imprescindível avaliar as condições ideais de cultivo da espécie. Na presente dissertação foi testada a resposta em termos de crescimento e de mortalidade, de larvas da população de *A. fallax* do Rio Guadiana criadas a diferentes condições de temperatura, salinidade e frequência de alimentação. Os resultados indicam que a temperatura ideal para optimização do crescimento se situa entre 24°C e 28°C, e que a salinidade óptima para minimização da mortalidade em sistemas de aquacultura em que as larvas são alimentadas com *nauplii* de *Artemia* spp., ronda os 2,5 g/L. Tendo por base indivíduos da mesma população criados em laboratório sob condições controladas foi ainda descrito o desenvolvimento larvar de *A. fallax* desde o momento de eclosão até ao final da metamorfose, recorrendo a caracteres morfométricos e merísticos para definição de uma série de estádios larvares facilmente identificáveis. Deste modo, o estudo desenvolvido permitiu obter dados importantes quer para a optimização da larvicultura da savelha quer para a identificação de larvas, aspecto essencial para uma correcta monitorização dos processos de recrutamento.

PALAVRAS-CHAVE: Conservação *ex situ*, Recrutamento artificial, Desenvolvimento ontogenético saltatório, Estádios larvares, Guadiana.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I - ENQUADRAMENTO | 1 |
| INTRODUÇÃO | 3 |
| OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE..... | 5 |
| REFERÊNCIAS..... | 6 |
| CAPÍTULO II - DESCRIÇÃO LARVAR..... | 11 |
| INTRODUÇÃO | 13 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 14 |
| RESULTADOS..... | 16 |
| DISCUSSÃO..... | 21 |
| REFERÊNCIAS..... | 25 |
| CAPÍTULO III - CULTIVO LARVAR..... | 29 |
| INTRODUÇÃO | 31 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| RESULTADOS..... | 35 |
| DISCUSSÃO..... | 38 |
| REFERÊNCIAS..... | 42 |
| CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 47 |
| REFERÊNCIAS..... | 52 |

CAPÍTULO I

ENQUADRAMENTO

INTRODUÇÃO

O estado de conservação dos peixes diádromos revela-se particularmente preocupante a nível nacional, estando a totalidade das espécies que ocorrem em águas portuguesas avaliada com alguma categoria de ameaça (VU, EN, CR) (1). A situação de conservação deste grupo é similar no restante Atlântico-Norte (2) e advém da sua vulnerabilidade acrescida a pressões antropogénicas, às quais estão sujeitas durante os períodos de reprodução e recrutamento (3-5). As medidas de conservação propostas para a recuperação das espécies diádromas, regra geral, têm falhado devido a uma aplicação deficiente, sem registo de resultados tangíveis (6). Acções de repovoamento têm sido tomadas como medidas de último recurso quando os efectivos populacionais são insuficientes para impedir o declínio populacional (7). Estas medidas têm sido aplicadas para a recuperação de diversas espécies diádromas e dulciaquícolas, europeias e norte-americanas, de entre as quais *Alosa* spp. (8). Porém, para o sucesso das medidas de repovoamento é fundamental entender as necessidades ecológicas das espécies-alvo, de modo a potenciar o restabelecimento da sustentabilidade populacional (3, 4). Também para a rentabilização de recursos em aquacultura é necessário compreender detalhadamente os factores mediadores do desenvolvimento larvar (9, 10).

A savelha, *Alosa fallax* (Lacepède, 1803), é uma das duas espécies anádromas representantes da família Clupeidae em águas interiores portuguesas, a par do sável, *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758), com o qual hibrida (11, 12). Os reprodutores afluem aos estuários durante o Inverno, em resposta ao elevado débito fluvial (13). A entrada em ambiente dulciaquícola tem início em resposta a estímulos térmicos (14, 15) no final do Inverno (Fevereiro a Março) devido ao aumento progressivo da temperatura associado à diminuição sazonal do caudal fluvial (16, 17). A desova realiza-se de modo fraccionado (18) principalmente durante a Primavera (Março a Junho) (19, 20), ocorrendo durante o período nocturno em cardumes que irrompem em curtos e abundantes eventos junto à superfície de água (14, 21), fenómeno popularmente denominado por “encharrique” na bacia hidrográfica do Guadiana. Os locais de desova encontram-se poucos quilómetros a montante da cunha salina, em zonas sob influência ou no limite de influência da maré (22). Estes locais situam-se geralmente em troços de rio pouco profundos, onde o fluxo de água é estrangulado, resultando em correntes fortes e deposição de substrato de granulometria grosseira (23-25). Os ovos são demersais e não adesivos, assentando sobre o leito do rio, de onde podem ser arrastados para jusante (26). As larvas desenvolvem-se em meio dulciaquícola, tendo uma dieta planctónica eurifágica oportunística (17, 27, 28), dependente da disponibilidade de presas (29, 30). O desenvolvimento larvar ocorre ao

longo da deriva para jusante (31), sendo a migração mediada pelo ciclo de maré (32). Porém não existe informação extensiva sobre a morfologia dos estádios larvas que permita a distinção entre *A. fallax*, *A. alosa* e os seus híbridos (22). O recrutamento está directamente correlacionado com a temperatura da água e inversamente correlacionado com o caudal fluvial (33). Os juvenis chegam ao estuário inferior entre o final do Verão e o início do Outono (26, 34), onde permanecem durante o primeiro ano de vida. Os peixes distribuem-se ao largo da costa (17, 28) até atingirem a maturidade sexual, entre o terceiro e o sexto ano de vida (24). A espécie é iterópara (35), efectuando múltiplas incursões ao ambiente dulciaquícola para reprodução, podendo viver mais de 10 anos (13).

Em Portugal e Espanha, *A. fallax* está classificada como “vulnerável” (1, 36), detendo um estatuto idêntico na restante área de distribuição no continente europeu (37). No entanto, a nível global, a sua situação de conservação é considerada como “pouco preocupante” (38). A espécie encontra-se também listada nos anexos II e V da Directivas Habitats e no apêndice II da Convenção de Berna (1). As populações de *Alosa* spp. foram outrora recursos haliêuticos abundantes (39, 40), porém actualmente encontram-se em declínio (37). Na ausência da implementação de medidas de conservação efectivas, prevê-se que a actual tendência populacional destas espécies se mantenha (6). A regressão populacional que se observa ao nível deste género resulta do efeito cumulativo das diversas pressões antropogénicas a que ambas as espécies estão sujeitas durante os períodos migratórios do seu ciclo de vida, as quais exercem um impacto negativo sobre o recrutamento (4, 39, 41). Em particular, destacam-se a modificação da dinâmica hidrológica e as limitações impostas à conectividade dos cursos de água (11), a poluição dos ambientes dulciaquícola e estuarino (42), assim como a falta de gestão do esforço de pesca (43, 44) e a fraca monitorização de *stocks*. A recuperação populacional destas espécies está, portanto, intrinsecamente dependente da mitigação destes distúrbios ambientais e da implementação de medidas de conservação visando a reabilitação dos seus habitats preferenciais (6, 41, 45).

A aplicação pontual de abordagens dirigidas ao reforço directo dos efectivos populacionais de espécies em estado crítico pode ser fundamental à sua recuperação (46), nunca descurando a importância fulcral da recuperação do ecossistema. O recrutamento artificial com indivíduos transpostos ou produzidos *ex situ* tem demonstrado potencial na conservação de ictiofauna ameaçada (7). Acções desta natureza são há muito implementadas na recuperação ou reintrodução de populações de *Alosa* spp. em vários cursos de água da costa atlântica do continente norte-americano, onde a situação de

conservação do género *Alosa* é análoga à europeia (47-49). No continente europeu, esta abordagem foi recentemente aplicada com sucesso para a reintrodução de *A. alosa* na bacia hidrográfica do Reno, através da libertação de juvenis produzidos *ex situ* (8). Em Portugal, a implementação de programas tendo por objectivo a conservação de *Alosa* spp. através do reforço das populações naturais por via da produção artificial de recrutas foi já sugerida (24). Porém, faltam estudos prévios sobre o correcto maneiio destas espécies a nível nacional. Nesta perspectiva, a optimização dos esforços de produção larvar é crucial para a viabilização de programas de repovoamento (50). As técnicas e metodologias empregues para a produção larvar de espécies congéneres são importantes indicadores, todavia é imprescindível avaliar as condições ideais de cultivo de *A. fallax*, procedendo aos ajustes necessários antes de dar início a uma produção de larga escala (10). Adicionalmente, é indispensável identificar características do desenvolvimento larvar da espécie que possam ser empregues como instrumento de monitorização e gestão dos stocks (51).

OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE

O trabalho de tese teve por objectivo colmatar lacunas de conhecimento referentes ao período de desenvolvimento larvar de *Alosa fallax*. A abordagem adoptada teve duas temáticas centrais:

- A descrição do desenvolvimento larvar com detalhe superior ao existente;
- A avaliação da influência da temperatura, da salinidade e da alimentação no crescimento larvar, visando a optimização da produção *ex situ*.

Com os resultados obtidos tem-se por propósito contribuir com ferramentas práticas para a conservação da espécie. Especificamente, pretendeu-se demonstrar a viabilidade metodológica do cultivo de *A. fallax*, promovendo o desenvolvimento de programas de produção *ex situ* para acções de repovoamento. Pretendeu-se, igualmente, aumentar o conhecimento do desenvolvimento larvar da espécie, dado que as descrições existentes são muito pouco detalhadas (20, 52). Os resultados poderão ser extrapoláveis para interpretação da situação ecológica da espécie e utilizáveis como ferramenta de monitorização do recrutamento.

A estrutura da presente tese é o reflexo dos objectivos propostos. Assim sendo, esta dissertação inclui quatro capítulos, dois dos quais abordando cada um dos principais objectivos, em adição ao presente capítulo introdutório e a um capítulo final discutindo e resumizando as implicações dos resultados e sugerindo futuras linhas de investigação.

REFERÊNCIAS

- (1) Rogado L. (coord.), Alexandrino P., Almeida P.R., Alves J., Bochechas J., Cortes R., Domingos I., Filipe F., Madeira J., Magalhães F. (2005) *Alosa fallax* Savelha In: Cabral M.J., Almeida J., Almeida P.R., Dellinger T., Ferrand de Almeida N., Oliveira M.E., Palmeirim J.M. Queiroz A.I., Rogado L., Santos-Reis M. (eds.) *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa.
- (2) Limburg K.E., Waldman J.R. (2009) Dramatic Declines in North Atlantic Diadromous Fishes. *BioScience*, 59, 955-965.
- (3) McDowall R.M. (1992) Particular problems for the conservation of diadromous fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2, 351-355.
- (4) McDowall R.M. (1999) Different kinds of diadromy: Different kinds of conservation Problems. *Journal of Marine Science*, 56, 410-413.
- (5) Jonsson B., Waples R.S., Friedland K.D. (1999) Extinction considerations for diadromous fishes. *Journal of Marine Science*, 56, 405-409.
- (6) Costa M.J., Almeida P.R., Domingos I.M., Costa J.L., Correia M.J., Chaves M.L., Teixeira C.M. (2001) Present status of the main shads' populations in Portugal. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 362/363, 1109-1116.
- (7) Philippart J.C. (1995) Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biological conservation*, 72, 281-295.
- (8) Scharbert A., Beeck P., Rochard E., St. Pierre R., Jatteau P. (2011) Management Plan to the LIFE project "The re-introduction of the Allis shad (*Alosa alosa*) to the Rhine system" (LIFE06 NAT/D/000005), 36 pp.
- (9) Lavens, P., Sorgeloos, P. (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 361, 295 pp.
- (10) Divanach P., Kentouri M. (2000) Hatchery techniques for specific diversification in Mediterranean finfish larviculture. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*, 47, 75-89.
- (11) Alexandrino P.J. (1996) Estudo de Populações de sável (*Alosa alosa* L.) e savelha (*Alosa fallax* Lacépède). Análise de diferenciação interespecífica, subestruturação e hibridação. Tese de Doutoramento, Universidade do Porto, 185 pp.
- (12) Alexandrino P., Faria R., Linhares D., Castro F., Le Corre M., Sabatié R., Baglinière J.L., Weiss S. (2006) Interspecific differentiation and intraspecific substructure in two

closely related clupeids with extensive hybridization, *Alosa alosa* and *Alosa fallax*. *Journal of Fish Biology*, 69(B), 242-259.

(13) Rameye L., Keener A., Spillman C.P., Biousse J. (1976) Aspects de la biologie de l'Alose du Rhône. Pêche et difficultés croissantes de ses migrations. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 263, 50-76.

(14) Ferreira M.T., Oliveira J.M. (1996) Gestão de espécies diádromas no rio Tejo entre Santarém e Belver. Instituto Florestal e Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 105 pp.

(15) Baglinière J.L., Elie P. (2000) Les aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax* spp.). Écobiologie et variabilité des populations. Hydrobiologie et aquaculture. CEMAGREF/INRA, Paris, 275 pp.

(16) Claridge P.N., Gardner D.C. (1978) Growth and movements of the twaite shad *Alosa fallax* (Lacépède) in the Severn Estuary. *Journal of Fish Biology*, 12, 203-211.

(17) Sabatié M.R. (1993) Recherches sur l'écologie et la biologie des aloses au Maroc (*Alosa alosa* Linné, 1758 et *Alosa fallax* Lacépède, 1803). Thèse Doctorat, Université Bretagne Occidentale, Brest, 326 pp.

(18) Pina T., Esteves E., Andrade J.P. (2003) Gross and histological observations of ovarian development in twaite shad, *Alosa fallax fallax*, from the Rivers Mira and Guadiana (Portugal). *Scientia Marina*, 67, 313-322.

(19) Pina T. (2000) Aspectos da reprodução de savelha, *Alosa fallax fallax* (Lacépède, 1803), nos rios Mira e Guadiana. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.

(20) Sousa L., Matos J., Matono P., Bernardo J.M. (2003) Monitorização de peixes migradores no rio Guadiana. Programa de Minimização para o Património Natural da Área de Regolfo de Alqueva/Pedrogão. Universidade de Évora.

(21) De Groot S.J. (1990) The former allis and twaite shad fisheries of the lower Rhine, the Netherlands. *Journal of Applied Ichthyology*, 6, 252-256.

(22) Quignard J.P., Douchement C. (1991) *Alosa fallax fallax* (Lacépède, 1803) In: Hoestlandt H. (ed.) *The Freshwater Fishes of Europe. Clupeidae, Anguillidae*. Vol. 2, 225-256. Aula-Verlag Wiesbaden.

(23) Boisneau P., Mennesson-Boisneau C., Baglinière J. L. (1990) Description d'une frayère et comportement de reproduction de la grande alose (*Alosa alosa* L.) dans le cours supérieur de la Loire. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 316, 15-23.

- (24) Bernardo J.M., Sousa L., Matos J., Matono P., Maximino P., Costa A.M. (2001) *Biologia e Ecologia dos Peixes Migradores no rio Guadiana - Relatório Final. Estudos de Biologia e Ecologia de Animais - Peixes Migradores. Universidade de Évora, Departamento de Ecologia, 178 pp.*
- (25) Caswell P., Aprahamian M.W. (2001) Use of river habitat survey to determine the spawning habitat characteristics of twaite shad (*Alosa fallax fallax*). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 362/363, 919-929.
- (26) Mennesson-Boisneau C., Boisneau Ph., Baglinière J.L. (1993) Migration de reproduction des aloses dans le bassin de la Loire. Incidence des obstacles. *Bulletin Scientifique et Technique-INRA, Département d'Hydrobiologie, Rennes, France, 23 pp.*
- (27) Taverny C. (1991) - Contribution à la connaissance de la dynamique des populations d'aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax fallax*) dans le système fluvioestuarien de la Gironde - Pêche, biologie, écologie. Étude particulière de la dévalaison et de l'impact des activités humaines. Thèse Docteur, Université de Bordeaux, 451 pp.
- (28) Taverny C., Cassou-leins J.J., Cassou-leins F., Elie P. (2000) De l'œuf à l'adulte en mer. In: Baglinière J.L., Elie P. (Eds.): "Les aloses *Alosa alosa* et *Alosa fallax* spp. Ecobiologie et variabilité des populations". INRA-CEMAGREF, Paris, pp. 93-124.
- (29) Nunn A.D., Noble R.A.A., Harvey J.P., Cowx I.G. (2008) The diets and parasites of larval and 0+ juvenile twaite shad in the lower reaches and estuaries of the rivers Wye, Usk and Towy, UK. *Hydrobiologia*, 614, 209-218.
- (30) Esteves E., Pina T., Andrade J.P. (2009) Diel and seasonal changes in nutritional condition of the anadromous twaite shad *Alosa fallax fallax* (Lacépède, 1803) larvae. *Ecology of Freshwater Fish*, 18, 132-144.
- (31) Gerkens M., Thiel R. (2001) Habitat use of age - 0 twaite shad (*Alosa fallax* Lacépède, 1803) in the tidal freshwater region of the Elbe river, Germany. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 362/363, 773-784.
- (32) Esteves E.B.O. (2006) Ecology of the life-history stages of shad *Alosa fallax fallax* Lacépède, 1803) in the River Mira, with a note on *Alosa* sp larvae in the River Guadiana. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente, Universidade do Algarve, Faro.
- (33) Aprahamian M.W., Aprahamian C.D. (2001) The influence of water temperature and flow on year class strength of twaite shad (*Alosa fallax fallax*) from the river Severn, England. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 362/363, 953-972.

- (34) Thiel R., Sepúlvera A., Oesmann S. (1996) Occurrence and distribution of twait shad (*Alosa fallax* Lacépède) in the lower Elbe river, Germany. In: Kirchoffer A., Hefti D (eds.) *Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe*. Switzerland, Birkhauser Verlag basel, 157-170.
- (35) Baglinière J.L., Sabatié M.R., Aprahamian M.W., Alexandrino P., Aprahamian C.D., Assis C.A., Cassou-Leins J.J., le Corre M., Mennesson-Boisneau C., Martin-Vandembulcke D., Rochard E., Teixeira C. (2001) Guide pour l'interprétation des écailles et l'estimation de l'âge chez les aloses (*Alosa* spp.) De la façade atlantique-est et de la méditerranée-ouest. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 357/360, 485-527.
- (36) Doadrio I. (ed.) (2001) *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- (37) Aprahamian M.W., Baglinière J.L., Sabatié M.R., Alexandrino P., Thiel R., Aprahamian C.D. (2003) Biology, status, and conservation of the anadromous Atlantic twait shad *Alosa fallax fallax*. *American Fisheries Society Symposium*, 35, 103-124.
- (38) Freyhof J., Kottelat M. (2008) *Alosa fallax*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1.
- (39) de Groot S.J. (2002) A review of the past and present status of anadromous fish species in the Netherlands: is restocking the Rhine feasible? *Hydrobiologia*, 478, 205-218.
- (40) Thiel R., Riel P., Neumann R., Winkler H.M. (2004) Status of the anadromous twait shad *Alosa fallax* (Lacépède, 1803) in German and adjacent waters of the Baltic Sea. *ICES Annual Science Conference*, CM2004/S:8, Use of Estuarine and Freshwaters Habitats and the way that Freshwater and Diadromous Fish use Them.
- (41) Assis C.A., (1990) Threats to the survival of anadromous fishes in the River Tagus, Portugal. *Journal of Fish Biology*, 37 (Supplement A), 225-226.
- (42) Maes J., Stevens M., Breine J. (2008) Poor water quality constrains the distribution and movements of twait shad *Alosa fallax fallax* (Lacepede, 1803) in the watershed of River Scheldt. *Hydrobiologia*, 602, 129-143.
- (43) Assis C., Costa J.L., Costa M.J., Moreira F., Almeida P., Gonçalves J. (1992) Ameaças à sobrevivência dos peixes migradores do Tejo. Sugestões para a sua conservação. Actas do Colóquio "Conservação dos Recursos Vivos Marinhos", *Publicações Avulsas do INIP*, 17, 428-441.

- (44) Collares-Pereira M.J., Cowx I.G., Ribeiro F., Rodrigues J.A., Rogado L. (2000) Threats imposed by water development schemes on the conservation of endangered fish species in the Guadiana river, Portugal. *Fisheries Management and Ecology*, 6, 167-178.
- (45) Sarrazin F., Barbault R. (1996) Reintroduction: challenges and lessons for basic ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 474-478.
- (46) Andrews C., Kaufman L., (1994) Captive breeding programmes and their role in fish conservation. In: Olney, P.J.S., Mace G.M., Feistner A.T.C. (eds.) *Creative Conservation: Interactive Management of Wild and Captive Animals*. Chapman & Hall, London, pp.338-351.
- (47) McBride, R.S. (2000) Florida's shad and river herrings (*Alosa* species): a review of population and fishery characteristics. *Florida Marine Research Institute Technical Report* 5, 18 pp.
- (48) Musick J.A., Harbin M.M., Berkeley S.A., Burgess G.H., Eklund A.M., Findley L., Gilmore R.G., Golden J.T., Ha D.S., Huntsman G.R., McGovern J.C., Parker S.J., Poss S.G., Sala E., Schmidt T.W., Sedberry G.R., Weeks H., Wright S.G. (2000) Marine, estuarine and diadromous fish stocks at risk of extinction in North America (Exclusive of Pacific Salmonids). *Fisheries*, 25, 11, 6-30.
- (49) Limburg K.E., Waldman J.R. (2003) Biodiversity, status, and conservation of the world's shads. *American Fisheries Society*, 35, Bethesda, Maryland.
- (50) Brown C., Day R.L. (2002) The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries*, 3, 79-94.
- (51) Pinder A.C., Gozlan R.E. (2004) Early ontogeny of sunbleak. *Journal of Fish Biology*, 64, 762-775.
- (52) Munk P., Nielsen J.G. (eds.) (2005) *Eggs and larvae of North Sea fishes*. Biofilia, Frederiksberg, Denmark, 26-27.

CAPÍTULO II

DESCRIÇÃO LARVAR

INTRODUÇÃO

Na sua generalidade, os teleósteos têm um desenvolvimento indirecto (1), sofrendo diversas alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre a eclosão e momento em que é atingido o fenótipo adulto (1-3). A identificação durante este período faz-se, portanto, recorrendo à definição de vários estádios larvares, tomando por referência o desenvolvimento sequencial de diferentes estruturas morfológicas e merísticas. Contudo, não é incomum que a correspondência entre sistemas de classificação de estádios larvares não seja directa devido à variabilidade taxonómica dos processos da metamorfose e à natureza arbitrária da definição dos estádios (4), especialmente quando o grau de detalhe das análises realizadas difere. Assim, a disponibilidade de descrições dos estádios larvares detalhadas, com referência especial às estruturas diagnosticantes, é um pré-requisito para a correcta identificação das espécies (5). O estudo da ontogenia larvar é também um instrumento de conservação de espécies piscícolas ameaçadas que permite a interpretação da evolução fisiológica e etológica das larvas e suas implicações a nível ecológico, possibilitando a elaboração de modelos de recrutamento, programas de monitorização e de estratégias de intervenção (6, 7).

Vários estudos têm sido dedicados à investigação de diferentes aspectos da biologia de *Alosa fallax* (Lacépède, 1803) a nível nacional (8-11) e europeu (12), em parte devido ao seu estado de conservação. Todavia, a informação disponível sobre o desenvolvimento larvar da espécie e sua descrição morfológica é ainda escassa (13, 14). A interpretação dos resultados de estudos ecológicos direccionados às suas fases larvares está limitada pela ocorrência em simpatria e hibridação frequente com *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758) em grande parte da sua área de distribuição (15, 16). Apenas quando completo o processo de metamorfose é possível distinguir ambas as espécies e os seus híbridos através do número e morfologia das branquiespinhas, dada a descrição igualmente escassa do desenvolvimento larvar de *A. alosa* (12). Neste contexto, é importante estudar o desenvolvimento ontogenético de *A. fallax*, procurando identificar caracteres úteis à elaboração futura de uma chave dicotómica de estádios larvares (*e.g.* 17). O estudo da ontogenia desta espécie tem ainda especial interesse do ponto de vista filogenético, devido à sistemática incerta da família Clupeidae (13).

A teoria do desenvolvimento ontogenético saltatório reconhece que a modificação estrutural das larvas se processa a um ritmo coordenado entre diversas estruturas para que se encontrem completas em sincronia (18). Deste modo, o organismo desenvolve-se atravessando fases relativamente estáveis, pontualmente intercaladas pela aquisição de

novas apetências que o tornam distinto de fases anteriores. Uma classificação que tenha em consideração este aspecto da ontogenia larvar indica os momentos em que as mudanças estruturais cumulativas culminam na modificação funcional do desempenho do organismo. O sistema de classificação utilizado neste trabalho tem por base este conceito, sendo adaptado de Pinder & Gozlan (19) e recorre a características facilmente identificáveis para definição de estádios larvares, simplificando a aplicação prática da informação recolhida.

O objectivo do presente trabalho consistiu em descrever morfológicamente o desenvolvimento ontogenético de *Alosa fallax* da eclosão até completar o processo de metamorfose, a partir de exemplares criados em condições controladas. Pretendeu, deste modo, obter uma série representativa das alterações sofridas durante este período visando o estabelecimento da cronologia de estádios facilmente identificáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Os reprodutores de *A. fallax* (5 machos e 5 fêmeas) foram capturados no rio Guadiana a jusante de Mértola (Lat: 37°37'39.72"N, Long: 7°39'57.98"W) com redes de tresmalhe por um pescador profissional a 1 de Julho de 2011. A fecundação foi realizada a bordo da embarcação através do método a seco (20). Seleccionaram-se indivíduos maduros, cujos gâmetas fossem prontamente libertados. Após enxugar os peixes, os gâmetas foram extraídos aplicando uma ligeira pressão sobre a zona abdominal para uma tina de vidro, onde foram homogeneizados com um pincel de cerdas macias. Adicionou-se-lhes 500 mL de água do rio para iniciar a fecundação, mantendo a homogeneização do meio por 5 minutos. O excesso de esperma foi então lavado passando os ovos várias vezes por água. O transporte dos ovos fez-se em frascos de 500 mL, aproximadamente 100 mL de ovos por frasco.

Uma hora após a colecta, os ovos contidos em cada frasco foram transferidos para uma incubadora cilíndrico-cónica de 4 L, com arejamento de fundo e renovação da água bidiária com tratamento profilático de azul-de-metileno. As larvas recém-eclodidas foram transferidas para 3 aquários de 50 L cada, com circulação de água através de filtros de esponja a ar comprimido. As larvas estiveram sujeitas ao fotoperíodo natural, à temperatura de 24° C ($\pm 1^\circ$ C) e a salinidade foi progressivamente aumentada (1g/L/dia) de 0g/L para 4g/L ao 13° dia após a activação. As larvas foram alimentadas três vezes ao dia, pelas 9:00, 13:00 e 17:00, com *nauplii* recém-eclodidos de *Artemia franciscana*, San Francisco Bay Brand®.

Entre cinco a dez indivíduos foram periodicamente amostrados (Tabela II.I), sacrificados por *overdose* de MS222 (1g/L) e preservados em Formalina a 10% tamponizada em fosfato. As amostras recolhidas foram posteriormente transferidas para etanol a 70%. O diâmetro dos ovos (D) e o comprimento total das larvas (C_T - distância entre a extremidade do focinho e a extremidade da barbatana caudal, 0,1 mm) foram medidos à lupa com uma ocular micrométrica. O desenvolvimento ontogenético (Tabela II.II) foi observado utilizando um microscópio estereoscópico *Zeiss Lumar* e registado através de uma câmara digital *Olympus BX60*. Ao início de cada estágio, o número de miómeros pré e pós-anais foi contado à transparência, sobre luz transmitida. A tipologia (ver figura 3 em ref.17) e posição (ver figuras 2 e 3 em ref.17) dos melanóforos foram aferidas seguindo a classificação de Pinder (17).

Tabela III. Datas de amostragem para descrição do desenvolvimento larvar por estágio, número de amostrados por evento de amostragem e comprimento total médio e desvio-padrão (*média e desvio-padrão correspondentes ao diâmetro dos ovos).

| Dias pós-activação | N | $\bar{x} \pm s$ (C_T mm) | Dias pós-activação | N | $\bar{x} \pm s$ (C_T mm) |
|--------------------|----|-----------------------------|--------------------|---|-----------------------------|
| 0,5 | 10 | $2,2 \pm 0,1$ * | 11 | 9 | $8,4 \pm 0,2$ |
| 1 | 10 | $2,2 \pm 0,1$ * | 14 | 6 | $8,8 \pm 0,2$ |
| 1,5 | 10 | $2,3 \pm 0,1$ * | 16 | 6 | $9 \pm 0,3$ |
| 2 | 10 | $2,2 \pm 0,1$ * | 18 | 5 | $9,3 \pm 0,7$ |
| 2,5 | 10 | $2,2 \pm 0,1$ * | 21 | 5 | $10,1 \pm 1,3$ |
| 3 | 10 | $6,5 \pm 0,1$ | 24 | 7 | $11,3 \pm 1,3$ |
| 3,5 | 7 | $6,7 \pm 0,2$ | 27 | 5 | $13,4 \pm 0,6$ |
| 4 | 6 | $7,0 \pm 0,0$ | 32 | 5 | $15,6 \pm 0,8$ |
| 4,5 | 5 | $6,7 \pm 0,2$ | 36 | 5 | $16,8 \pm 1,7$ |
| 5 | 6 | $7,7 \pm 0,1$ | 40 | 5 | $19,2 \pm 1,2$ |
| 5,5 | 6 | $7,5 \pm 0,1$ | 44 | 5 | $20,5 \pm 2,2$ |
| 6 | 6 | $7,7 \pm 0,3$ | 48 | 5 | $20,2 \pm 1,3$ |
| 6,5 | 7 | $7,9 \pm 0,2$ | 53 | 5 | $22,8 \pm 3,2$ |
| 7 | 9 | $7,8 \pm 0,1$ | 58 | 5 | $22,8 \pm 0,6$ |
| 8 | 10 | $8,1 \pm 0,3$ | 63 | 5 | $25,4 \pm 5,4$ |
| 9 | 7 | $8,3 \pm 0,2$ | 70 | 9 | $26,8 \pm 4,5$ |

Para efeitos de descrição definiu-se o início do desenvolvimento (Fig. II.1) como o momento de activação do ovo (dia 0), considerado coincidente com o evento de fecundação por motivos práticos. As taxas de fecundação foram determinadas amostrando as incubadoras 24 horas após a activação, altura em que o desenvolvimento embrionário dos ovos é distinguível a olho nu dos oócitos não activados. A taxa de fecundação foi

definida 24 horas após a activação como a razão do número de ovos viáveis no total de ovos e oócitos amostrados - N=2.512 a 4 de Junho de 2011 (ver Capítulo III) e N=4.808 a 2 de Julho de 2011. Foi recolhida uma amostra de oócitos não hidratados (N=200) e uma amostra de ovos 24 horas após a activação (N=200), para comparar a fresco o aumento de diâmetro pré- e pós-hidratação e endurecimento do córion.

Tabela II.II. Definição e diagnose da classificação por estádios.

| Estádio | Evento ontogenético diagnosticante do início do estádio |
|---------------------------------|---|
| Embrião (E) | Fecundação/Activação |
| Embrião Livre (E _L) | Eclosão |
| Larva 1 (L ₁) | Início da alimentação exógena |
| Larva 2 (L ₂) | Formação dos primeiros raios da barbatana dorsal |
| Larva 3 (L ₃) | Flexão da notocorda |
| Larva 4 (L ₄) | Formação completa das barbatanas |
| Larva 5 (L ₅) | Formação completa das escamas |

RESULTADOS

Embrião

As taxas de fecundação dos oócitos foram de 78,7% a 4 de Junho de 2011 e de 77,1% a 2 de Julho de 2011. Os oócitos maduros têm um diâmetro médio de 1,76 mm (s=0,06mm). Após hidratação e endurecimento do córion, os ovos são ligeiramente ovais e têm um diâmetro médio de 2,4 mm (s=0,4mm), contraindo para cerca de 2,2 mm após preservação (Tabela II.I). O vitelo é granulado e tem cerca de 1,5 mm de diâmetro. O embrião com 24 horas apresenta já uma forma longilínea medindo aproximadamente metade do perímetro do córion e desenvolveu uma estrutura ocular rudimentar não pigmentada. Com 48 horas, o comprimento do embrião é superior ao perímetro do córion e com 60 horas os olhos encontram-se parcialmente pigmentados (Figs. II.2a, II.2b).

Embrião Livre

A eclosão ocorreu ao terceiro dia após a activação, entre as 72 e as 84 horas (Tabela II.I). Os embriões apresentam um C_T de 6,5 mm à eclosão (Fig. II.1) e o comprimento pré-anal (C_{pra}, da extremidade do focinho ao ânus) corresponde a 4/5 do C_T. Os embriões livres têm muitas reservas vitelinas, a cabeça encontra-se flectida sobre o vitelo, os olhos estão bem pigmentados e numa posição inferior na cabeça. A boca não se encontra formada, mas o tubo digestivo encontra-se aberto. As pregas, ou barbatanas primordiais, peitorais estão presentes e as pregas dorsal, ventral e caudal estão unidas numa prega contínua sobre o

plano sagital. A pigmentação corporal está geralmente ausente, excepto pelo vitelo que se encontra ponteadado por melanóforos muito ramificados e alguns melanóforos pouco ramificados soltos ao longo da zona médio-ventral pré-anal. No início deste estágio são identificáveis em média 48 miómeros, 42 pré-anais e 6 pós-anais (Fig. II.2c).

Larva 1

O começo da alimentação exógena determina o início do período larvar e o fim do período embrionário (Tabela II.I). Este estágio termina com o início da formação dos raios da barbatana dorsal (Fig. II.2d). As larvas neste estágio apresentam um C_T que varia entre 7 mm e 9 mm (Fig. II.1) e a relação C_{pra}/C_T mantém-se a 4/5. Este estágio tem uma duração aproximada de 7 dias, iniciando-se ao quarto dia após a activação, quando se desenvolve a estrutura bucal funcional, permitindo a ingestão. Os olhos migram para uma posição superior na cabeça e a estrutura opercular encontra-se em desenvolvimento, não cobrindo ainda as brânquias por completo. Desenvolve-se uma linha contínua de melanóforos pouco ramificados com origem na região do coração, bifurcando-se em forma parabólica sobre o vitelo, terminando acima da zona de futura formação das barbatanas pélvicas. Uma segunda linha contínua de melanóforos pouco ramificados forma-se na região médio-ventral, iniciando-se na zona de futura formação das barbatanas pélvicas e terminando junto ao ânus. Ao quinto dia é evidente o espessamento das pregas dorsal e caudal nas zonas de futura formação das respectivas barbatanas (*anlagen*), começando a prega dorsal a prolongar-se verticalmente na zona de formação da respectiva barbatana. Ao sexto dia completa-se a absorção do vitelo. No início deste estágio são identificáveis em média 49 miómeros, 44 pré-anais e 5 pós-anais.

Larva 2

O início deste estágio é caracterizado pela formação dos primeiros raios da barbatana dorsal, terminando com a flexão da notocorda (Tabela II.I). Os primeiros raios da barbatana dorsal formam-se entre o 10º e o 12º dia após a activação, embora se tenha observado um indivíduo em que se encontravam em formação ao quinto dia, coincidindo com o início da alimentação exógena (Fig. II.2e). Este estágio dura aproximadamente 10 dias e os exemplares apresentam um C_T entre 9 mm e 11 mm (Fig. II.1), mantendo uma relação C_{pra}/C_T de 4/5. A formação da bexiga-natatória é observável em alguns indivíduos. A pigmentação médio-ventral estende-se agora à zona pós-anal e os melanóforos estão sensivelmente mais espaçados e ramificados, facto que também se verifica na linha parabólica. Forma-se um par de melanóforos internos pós-oculares, um de cada lado, e

uma linha vertical compacta de melanóforos pouco ramificados demarcando a zona onde o rebordo do opérculo assentará anteriormente à inserção da barbatana peitoral. Na zona supra-visceral, parede superior da cavidade abdominal, forma-se uma linha descontínua de melanóforos pouco ramificados. Um a três melanóforos ramificados formam-se na prega da barbatana caudal. No início deste estágio são identificáveis em média 52 miómeros, 45 pré-anais e 7 pós-anais.

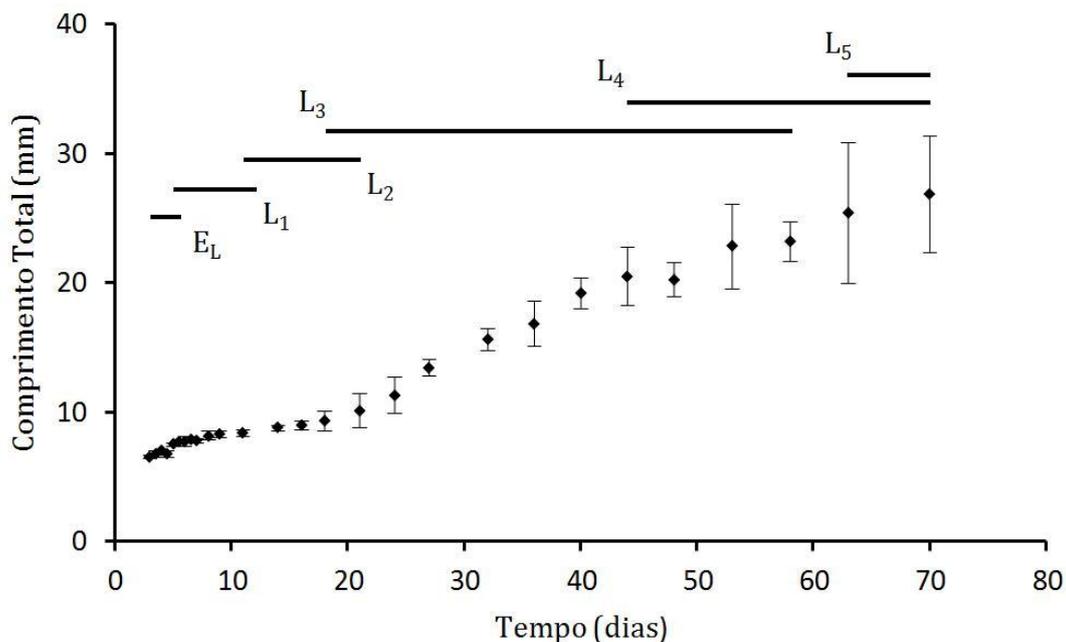


Figura II.1. Comprimento total médio (mm) e desvio padrão de *A. fallax* expressos em dias pós-activação do ovo. Ocorrência temporal dos estádios de desenvolvimento definidos (E_L - Embrião Livre; L₁ - Larva 1; L₂ - Larva 2; L₃ - Larva 3; L₄ - Larva 4; L₅ - Larva 5).

Larva 3

Este estágio inicia-se com a flexão evidente da notocorda, acompanhada pela subsequente formação dos primeiros raios da barbatana caudal (Fig. II.2f). Este estágio termina quando se completa o processo de formação das barbatanas (Tabela II.I). Ao 18º dia observam-se os primeiros exemplares neste estágio. Todos os exemplares amostrados a partir do 24º dia apresentam a notocorda flectida com formação dos elementos da barbatana caudal. Ao 21º dia formam-se os primeiros raios da barbatana anal, ao 32º dia os primeiros raios pélvicos e ao 40º dia os primeiros raios peitorais. A barbatana dorsal desloca-se para uma posição mais anterior e as pélvicas recuam ficando inseridas sensivelmente ao nível da inserção dos primeiros raios da barbatana dorsal no final deste estágio. As últimas larvas a completar as barbatanas surgiram ao 54º dia (Fig. II.1). Este estágio compreende

exemplares com um C_T entre 11 mm e 22 mm e uma relação C_{pra}/C_T que se aproxima a 3/4. No início deste estágio a prega dorsal ainda não foi totalmente reabsorvida. A pigmentação torna-se mais abundante durante este estágio, com os melanóforos a aumentar em número e a adquirir uma tonalidade mais escura. As linhas de pigmentação parabólica e médio-ventral tornam-se descontínuas devido ao afastamento dos melanóforos. Formam-se grupos de melanóforos na cabeça, zonas interocular e do focinho, na zona pós-opercular sobre a inserção das barbatanas peitorais e espalhados pela barbatana caudal em geral. Surgem também os primeiros melanóforos nas linhas dorsal e lateral. A pigmentação supra-visceral intensifica-se de igual modo. Os opérculos terminam também o seu desenvolvimento neste estágio, cobrindo as brânquias por completo. Os miómeros continuam a formar-se durante este estágio, em que as larvas apresentam em média 59, 46 pré-anais e 13 pós-anais.

Larva 4

Este estágio inicia-se quando se completa a formação das barbatanas e termina com surgimento das primeiras escamas (Tabela II.I). O início deste estágio coincide com o desaparecimento da prega ventral. A formação das barbatanas ocorre de forma sequencial: Dorsal, Caudal, Anal, Pélvicas e Peitorais (Fig. II.2g). O primeiro indivíduo neste estágio foi amostrado ao 44º dia. Os exemplares neste estágio apresentam um C_T entre 22 mm e 28 mm (Fig. II.1) e estão presentes até ao 70º dia, último dia de amostragem. A pigmentação desenvolve-se de forma acentuada durante este período, com o aumento da densidade de melanóforos de forma generalizada por todo o corpo da larva e diminuição relativa do seu tamanho. Formam-se várias fileiras de melanóforos pouco ramificados no dorso. A zona superior à linha médio-lateral fica pigmentada com um número elevado de melanóforos distribuídos aleatoriamente, ao passo que na zona inferior à linha o número é menor. A linha médio-lateral destaca-se em termos de pigmentação. Na zona dorsal observam-se linhas bem desenhadas de melanóforos de maior área que os circundantes. A cabeça encontra-se igualmente pigmentada com uma elevada densidade de melanóforos nas zonas interocular, operculares, do focinho e dos lábios. As barbatanas ímpares desenvolvem também pigmentação especialmente na sua base. Os melanóforos supra-viscerais tornam-se menos evidentes à transparência devido à opacidade do tecido muscular. No início deste estágio são contabilizados em média 60 miómeros, 41 pré-anais e 19 pós-anais. O comprimento da cavidade abdominal diminui e o ânus adquire uma posição mais anterior, correspondendo o C_{pra} a cerca de 2/3 do C_T .

Larva 5

Este estágio tem início com a formação das primeiras escamas e termina quando atingida a total cobertura do corpo por escamas, o desenvolvimento da linha lateral se completa e a característica pigmentação prateada é adquirida (Tabela II.I). Ao 63º dia após a activação observam-se os primeiros exemplares com escamas formadas e salientes na quilha ventral e escamas em desenvolvimento ao longo dos flancos, mas ainda não expostas. Ao 70º dia vários indivíduos apresentavam escamas formadas e expostas na quilha ventral e em formação nos flancos (Fig. II.2h). O menor exemplar medido com escamas formadas tinha um C_T de 28 mm. O C_{pra} é agora pouco inferior a $2/3$ do C_T . A pigmentação intensificou-se de acordo com o padrão descrito para o estágio anterior, contudo a cor dos melanóforos é esbatida e eventualmente deixam de ser observáveis devido ao desenvolvimento da pigmentação prateada do tegumento. Os miómeros pós-cefálicos tornam-se também difíceis de contar à transparência. As barbatanas dorsal e anal tornam-se mais amplas e inserem-se a um nível mais anterior, recuando as pélvicas para um nível posterior à inserção da dorsal. Contam-se 4 a 5 raios não segmentados e 15 a 16 raios segmentados na barbatana dorsal, 3 a 4 raios não segmentados e 19 a 20 raios segmentados na barbatana anal.

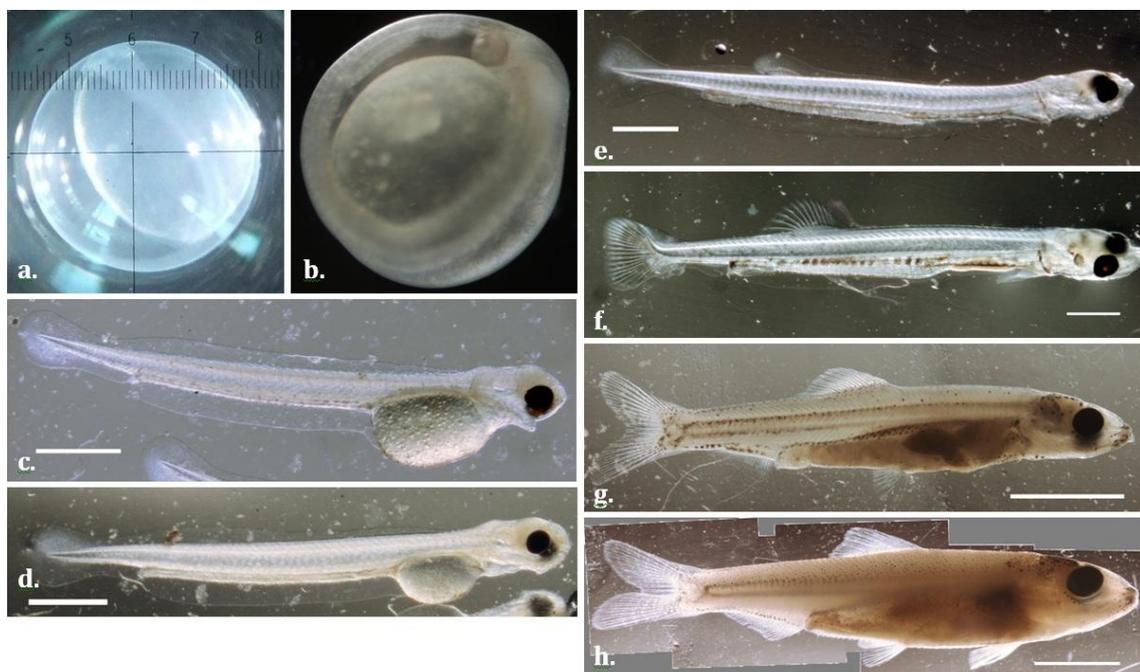


Figura II.2. Indivíduos representantes dos diferentes estádios de desenvolvimento definidos (a. Embrião 24h; b. Embrião 60h; c. Embrião livre; d. Larva 1; e. Larva 2; f. Larva 3; g. Larva h; f. Larva 5) e escalas (a. sem escala, $D \approx 2,2$ mm; b. sem escala, $D \approx 2,2$ mm; c. 1mm; d. 1mm; e. 1mm; f. 1mm; g. 5mm; h. 5mm).

DISCUSSÃO

A descrição larvar resultante deste trabalho é mais pormenorizada nos diferentes estádios que define do que a apresentada na bibliografia disponível para *A. fallax* (13, 14). Esta descrição segue o conceito do desenvolvimento ontogenético saltatório (18), utilizando a formação de uma série de caracteres funcionais para definição e diagnose de seis estádios (embrião livre e cinco larvares), ao invés de se limitar apenas ao processo de flexão da notocorda e de formação do complexo caudal (14) ou a categorias de comprimento (13). Este tipo de classificação foi considerado mais apropriado para a descrição de uma espécie que apresenta variabilidade fenotípica ao longo da sua área de distribuição geográfica (13, 16, 21) e híbrida com uma espécie congénere, visto que a sequência do desenvolvimento dos caracteres funcionais será pouco afectada a sofrer alterações (Tabela II.III).

Tabela II.III. Principais eventos observados por estádio de desenvolvimento em *Alosa fallax*.

| Estádio | Principais eventos ontogenéticos |
|---------------------------------|--|
| Embrião Livre (E _L) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Rearranjo posicionamento cefálico ▪ Desenvolvimento da estrutura bocal |
| Larva 1 (L ₁) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Transição para uma alimentação exógena ▪ Absorção das reservas vitelinas |
| Larva 2 (L ₂) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Desenvolvimento dos primeiros raios dorsais ▪ Desenvolvimento dos opérculos |
| Larva 3 (L ₃) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Flexão da notocorda e desenvolvimento do complexo caudal ▪ Formação das barbatanas (Dorsal, Caudal, Anal, Pélvicas, Peitorais) ▪ Desaparecimento das diversas pregas primordiais |
| Larva 4 (L ₄) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Conclusão do desenvolvimento dos raios das barbatanas (segmentação, ramificação e ossificação) ▪ Aumento marcado da pigmentação melânica |
| Larva 5 (L ₅) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Desenvolvimento das escamas, linha lateral e pigmentação prateada |

O diâmetro registado para os ovos foi pouco variável. O crescimento larvar inicial foi lento, até ao 20º dia após a activação. Verificou-se que as larvas passam pelos estádios E_L, L₁ e L₂, iniciando o estádio L₃ sem grande aumento do C_T. Com o início do estádio L₃, o crescimento acelera, porém no período entre os estádios L₃ e L₄ o crescimento diminui ligeiramente, começando a registar-se a dessincronização do desenvolvimento e uma maior dispersão do C_T entre larvas (Fig. II.1). Após concluída a formação das barbatanas, a larva é em muito morfologicamente idêntica ao indivíduo adulto. Nos estádios seguintes (L₄ e L₅) as grandes alterações sofridas são ao nível da pigmentação e do desenvolvimento da cobertura de escamas, sendo as modificações morfométricas menores.

Analisando este padrão de desenvolvimento de acordo com a teoria do desenvolvimento saltatório, nos primeiros estádios (E_L, L₁, L₂) as larvas são bastante precoces (22), tendo

necessidade de desenvolver várias estruturas internas e os processos fisiológicos a elas associados (23). Após desenvolvida a aptidão metabólica para lidar com o meio, no período L₃ a larva sofre alterações morfológicas que aumentam a sua capacidade de propulsão e modificam vários aspectos comportamentais (24) como, por exemplo, o posicionamento preferencial na coluna de água e a eficiência predatória, permitindo-lhe o aumento da velocidade de crescimento. A dispersão de tamanhos individuais torna-se então mais evidente, possivelmente devido a um ritmo de desenvolvimento diferencial inicial, que apenas se faz notar quando a taxa de crescimento aumenta. Doravante, o organismo desenvolverá caracteres funcionais mais subtis (L₄, L₅), encontrando-se condicionado pelo desenvolvimento anterior ao grande “salto”. Por observação de uma quase estagnação inicial do crescimento, procedeu-se, ao 13º dia após activação dos ovos, ao aumento da salinidade de 0g/L para 4g/L, 1g/L/dia. Considerações sobre o efeito do factor salinidade no desenvolvimento larvar de *A. fallax* são apresentadas no Capítulo 3.

O período de incubação (período entre a activação e a eclosão) está de acordo com o reportado para a espécie (12). O diâmetro dos ovos ($D=2,2\text{mm}$) e o comprimento total dos embriões à eclosão ($C_T=6,5\text{mm}$) são distintos dos observados no Mar do Norte (14), onde o comprimento total do embrião à eclosão ($C_T=4,5\text{mm}$) não se aproxima do perímetro do ovo ($4,25\text{mm}<D<4,60\text{mm}$). Não será de excluir que esta discordância de valores entre D e C_T possa estar relacionada com um gradiente latitudinal da espécie, sendo o espaço perivitelino relatado por Munk & Nielson (14) ($1,65\text{mm}<D_{\text{vitelo}}<1,85\text{mm}$) maior do que o agora observado ($D_{\text{vitelo}}=1,5\text{mm}$) e podendo a eclosão ocorrer num momento do desenvolvimento embrionário mais precoce. Diferenças observadas relativamente a diâmetros e comprimentos podem também ser parcialmente devidas a diferentes técnicas de preservação, não especificadas na bibliografia.

A ordem geral descrita na literatura disponível sobre as alterações sofridas durante o processo de desenvolvimento larvar corresponde à observada, embora alguns eventos ocorram a valores de C_T diferentes. Quignard & Douchment (13) descrevem que a flexão da notocorda ocorre a C_T superiores aos registados neste estudo, mas a conclusão do processo de metamorfose ocorre a C_T inferiores. O estabelecimento de uma comparação precisa com a informação bibliográfica é difícil devido à fraca descrição de parte dos caracteres utilizados para a diagnose dos estádios. Por exemplo, a definição de estádios baseados nos comprimentos por Quignard & Douchment (13) não parece adequada tendo em conta a grande dispersão de valores de C_T observada neste estudo nos estádios larvares mais avançados (Fig. II.2). A descrição da formação, localização e tipologia dos melanóforos é também pobre nas descrições existentes, assim como a contabilização do

número de miómeros ao longo da ontogenia larvar, que é inexistente. No período da experiência (70 dias) não se observaram peixes com a metamorfose completa, porém Taverny *et al.* (25) referem que a fase larvar na natureza dura entre 15 a 20 dias. Esta informação poderá indicar que as condições de cultivo são limitantes do crescimento de *Alosa* spp. dado que vários estudos *ex situ* indicam a conclusão da metamorfose por volta do segundo mês de vida (26, 27).

A sequência de formação de alguns caracteres em *Alosa fallax* é distinta da utilizada na bibliografia que se tomou por base para a definição e diagnose de diferentes estádios larvares (17, 19), pelo que se efectuaram as necessárias alterações. Embora existindo trabalhos de descrição larvar para Clupeidae (28), a opção recaiu sobre os modelos anteriormente mencionados pela simplicidade de aplicação prática, característica que melhor se adequava à índole deste trabalho. Apesar do presente estudo apresentar uma descrição mais pormenorizada de *Alosa fallax* relativamente às existentes (13, 14), esta descrição poderá ser ainda mais aprofundada. De salientar que não foi possível usar a bexiga-natatória como característica diagnosticante devido à dificuldade em identificar esta estrutura nos exemplares preservados, recorrendo-se em contrapartida à formação dos primeiros raios da barbatana dorsal (L_2), coincidente em alguns indivíduos com a detecção de indícios da formação da bexiga-natatória. Reconhece-se que os exemplares terão sofrido alguma contracção, possivelmente diferenciada entre estruturas e estádios, mas não contabilizada. Adicionalmente, a descrição dos padrões de pigmentação poderá ser mais detalhada na tipificação, distribuição e, em especial, na quantificação precisa dos melanóforos existentes, principalmente nos estádios mais precoces. Poderá também ser útil o registo temporal da variação de outros índices morfométricos para além do C_T (29, 30). Portanto, é importante expandir a informação obtida neste estudo através de técnicas de análise mais avançadas. O registo contínuo do embrião usando técnicas fotográficas para determinação de estádios embrionários e a utilização de técnicas histológicas para descrição da formação de diversas estruturas internas possivelmente diagnosticantes são particularmente importantes (31).

Apesar dos constrangimentos, neste trabalho foi identificada a ocorrência de caracteres conspícuos, que poderão contribuir potencialmente para a distinção entre larvas de *Alosa* spp. na Europa. De uma perspectiva conservacionista, a amostragem larvar permite avaliar espacio-temporalmente a reprodução e a sobrevivência larvar, podendo auxiliar na interpretação de variações no recrutamento (6, 32). Por outro lado, através da amostragem larvar é possível averiguar a presença de *Alosa* spp. em locais onde o efectivo reprodutor se apresenta reduzido, considerando uma detectabilidade potencial maior das

larvas relativamente aos adultos devido à grande fecundidade deste género (12). Só com a distinção ao nível específico é possível a correcta interpretação destes estudos ecológicos dirigidos às fases larvares. Nesta medida, a realização de um trabalho similar em *A. alosa*, prestando especial atenção a híbridos *A. alosa* x *A. fallax*, é essencial para fins comparativos caso se pretenda, por exemplo, elaborar uma chave dicotómica. Com esta informação poderemos então efectuar, de uma forma eficaz, a monitorização do recrutamento destas espécies migradoras em território nacional e propor medidas de gestão e de conservação adequadas para ambas as espécies.

REFERÊNCIAS

- (1) Houde E.D. (2001) Fish Larvae. In: Steele J.H., Thorpe S., Turekian K. (eds.) *Encyclopedia of Ocean Sciences*, Academic Press, London, 928-938.
- (2) Balon E.K. (1979) The juvenilization process in phylogeny and the altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 4, 193-198.
- (3) Balon E.K. (1981) Saltatory Processes and Altricial to Precocial Forms in the Ontogeny of Fishes. *American Society of Zoologists*, 21, 573-596.
- (3) Balon E.K. (1999) Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). *Environmental Biology of Fishes*, 56, 17-38.
- (4) Kendall A.W.Jr., Ahlstrom E.H., Moser H.G. (1984) Early life history stage of fishes and their characters.. In: Moser H.G., Richards W.J., Cohen D.M., Fahay M.P., Kendall A.W.Jr., Richardson S.L. (eds.) *Ontogeny and Systematics of Fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Lawrence, KS, 11-22.
- (5) Leis, J.M. (1993) Minimum requirements for published descriptions of larval fish development. *Japanese Journal of Ichthyology*, 40, 393-395.
- (6) Houde E.D. (1994) Differences between marine and freshwater fish larvae: implications for recruitment. *ICES Journal of Marine Science*, 51, 91-97.
- (7) Brown C., Day R.L. (2002) The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries*, 3, 79-94.
- (8) Assis C.A., Almeida P.R., Moreira F., Costa J.L., Costa M.J. (1992) Diet of the twaite shad *Alosa fallax* (Lacépède) (Clupeidae) in the River Tagus Estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology*, 41, 1049-1050.
- (9) Costa M.J., Almeida P.R., Domingos I.M., Costa J.L., Correia M.J., Chaves M.L., Teixeira C.M. (2001) Present status of the main shads' populations in Portugal. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 362/363, 1109-1116.
- (10) Pina T., Esteves E., Andrade J.P. (2003) Gross and histological observations of ovarian development in twaite shad, *Alosa fallax fallax*, from the Rivers Mira and Guadiana (Portugal). *Scientia Marina*, 67, 313-322.
- (11) Esteves E., Pina T., Andrade J.P. (2009) Diel and seasonal changes in nutritional condition of the anadromous twaite shad *Alosa fallax fallax* (Lacépède, 1803) larvae. *Ecology of Freshwater Fish*, 18, 132-144.

- (12) Aprahamian M.W., Baglinière J.L., Sabatié R., Alexandrino P., Aprahamian C.D. (2002) Synopsis of Biological Data on *Alosa alosa* and *Alosa fallax* spp. Environment Agency, UMR, INRA-ENSA, ENSAR, University of Porto, 315 pp.
- (13) Quignard J.P., Douchement C. (1991) *Alosa fallax fallax* (Lacépède, 1803) In: Hoestlandt H. (ed.) *The Freshwater Fishes of Europe. Clupeidae, Anguillidae*. Vol. 2, 225-256. Aula-Verlag Wiesbaden.
- (14) Munk P., Nielsen J.G. (eds.) (2005) *Eggs and larvae of North Sea fishes*. Biofilia, Frederiksberg, Denmark, 26-27.
- (15) Alexandrino P.J. (1996) Estudo de Populações de sável (*Alosa alosa* L.) e savelha (*Alosa fallax* Lacépède). Análise de diferenciação interespecífica, subestruturação e hibridação. Tese de Doutoramento, Universidade do Porto, 185 pp.
- (16) Alexandrino P., Faria R., Linhares D., Castro F., Le Corre M., Sabatié R., Baglinière J.L., Weiss S. (2006) Interspecific differentiation and intraspecific substructure in two closely related clupeids with extensive hybridization, *Alosa alosa* and *Alosa fallax*. *Journal of Fish Biology*, 69(B), 242-259.
- (17) Pinder A. C. (2001) *Keys to larval and juvenile stages of coarse fishes from fresh waters in the British Isles*. Freshwater Biological Association Scientific Publications 60, 136 pp.
- (18) Balon E.K. (1985) The theory of saltatory ontogeny and life history models revisited. In: Balon E. K. (ed.) *Early life histories of fishes*. Dr W Junk Publishers, Dordrecht, 13-30.
- (19) Pinder A.C., Gozlan R. E. (2004) Early ontogeny of sunbleak. *Journal of Fish Biology*, 64, 762-775.
- (20) Urbányi B., Horváth Á., Bokor Z. (2009) Artificial fertilization in aquaculture species: from normal practice to chromosome manipulation, In: Cabrita E., Robles V., Herráez P. E. (ed.) *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. Marine Biology Series, 183-216.
- (21) Le Corre M., Alexandrino P., Sabatié M.R., Aprahamian M., Bagliniere, J.L. (2005) Genetic characterisation of the Rhodanian twaite shad, *Alosa fallax rhodanensis*. *Fisheries Management and Ecology*, 12, 275-282.
- (22) Wiggins T.A., Bender Jr.T.R., Mudrak V.A., Coll J.A. (1985) The Development, Feeding, Growth, and Survival of Cultured American Shad Larvae Through the Transition from Endogenous to Exogenous Nutrition. *The Progressive Fish-Culturist*, 47, 87-93.

- (23) Zambonino Infante J.L., Cahu C.L., (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 477-487.
- (24) Ross R.M., Backman T.W.H., Limburg K.E. (1992) Group-size mediated metabolic rate reduction in American shad. *Transactions of the American Fisheries Society*, 121, 385-390.
- (25) Taverny C., Cassou-leins J.J., Cassou-leins F., Elie P. (2000) De l'œuf à l'adulte en mer. In: Baglinière J.L., Elie P. (Eds.): "Les aloses *Alosa alosa* et *Alosa fallax* spp. Ecobiologie et variabilité des populations". INRA-CEMAGREF, Paris, pp. 93-124
- (26) Heinrich, J.W. (1981) Culture, feeding and growth of alewives hatched in the laboratory. *Progressive Fish-Culturist*, 43, 3-7.
- (27) Howey R.G. (1985) Intensive Culture of Juvenile American Shad. *The Progressive Fish-Culturist*, 47, 203-212.
- (28) Ré P., Meneses I. (2008). Early stages of marine fishes occurring in the Iberian Peninsula. IPIMAR/IMAR, 282pp.
- (29) Lam C.N.H., Roff J.C. (1977) A Method for Separating Alewife *Alosa pseudoharengus* from Gizzard Shad *Dorosoma cepedianum* Larvae. *Journal of Great Lakes Research*, 3, 313-316.
- (30) Shelton W.L., Stephens R.R. (1980) Comparative Embryogeny and Early Development of Threadfin and Gizzard Shad. *The Progressive Fish-Culturist*, 42, 34-41.
- (31) Shardo J.D. (1995) Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the american shad, *Alosa sapidissima* (Wilson, 1811) *Journal of Morphology* 225, 125-167.
- (32) Savoy T.F., Crecco V.A., (1988) The timing and significance of density-dependent and density-independent mortality of American shad, *Alosa sapidissima*. *Fishery Bulletin*, 86, 467-482.

CAPÍTULO III

CULTIVO LARVAR

INTRODUÇÃO

A savelha, *Alosa fallax* (Lacépède, 1803), é um clupeídeo anádromo cosmopolita em grande parte da Europa, distribuindo-se ao longo da costa oriental do Atlântico Norte, de Marrocos ao Mar Báltico, e estando presente em toda a costa do Mar Mediterrâneo (1). Apesar da sua vasta distribuição, esta espécie encontra-se vulnerável a pressões antropogénicas localizadas no meio dulciaquícola e estuarino, extremamente negativas devido à obrigatoriedade de reprodução em meio dulciaquícola (2). Embora efeitos metapopulacionais tenham conferido à espécie alguma resiliência à degradação de parte dos locais de reprodução (3-6), caso não se actue de modo a promover a recuperação dos ecossistemas lóticos, poder-se-á comprometer o estado das suas populações a longo prazo (7).

De entre as medidas aplicadas para a recuperação ou restabelecimento de populações de *Alosa* spp. encontra-se o recrutamento artificial (8). Medidas desta natureza são empregues desde o início do séc. XX a espécies norte-americanas (9). Recentemente incluiu-se na lista de espécies *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758) (10), espécie simpátrica de *A. fallax* cujos efectivos populacionais têm sofrido um maior impacto como consequência da actividade humana (11). O trabalho realizado para a sua reintrodução no Reno (10) veio demonstrar não só a importância dos estudos ecológicos (12, 13), mas também do maneiio em aquacultura para o sucesso das medidas de recrutamento artificial, nomeadamente através da optimização da produção e da condição larvar (14, 15). Baglinière *et al.* (16) denotaram em 2003 que o conhecimento disponível sobre a biologia e ecologia de *A. alosa* teria de ser aprofundado antes de se proceder ao delineamento de um programa para a sua reintrodução. Em contexto nacional, diversas espécies dulciaquícolas ameaçadas foram já alvo de estudos de reprodução em cativeiro para salvaguarda *ex situ* e eventuais acções de reforço populacional (17-19). Existem indicações de que trabalhos similares deverão ser feitos abordando a reprodução de *Alosa* spp. (20), mas o conhecimento da biologia larvar do género é ainda reduzido para Portugal (21).

O desenvolvimento larvar dos teleósteos depende de múltiplos factores ambientais que condicionam aspectos fisiológicos, etológicos e, conseqüentemente, o sucesso do recrutamento (22). Para o êxito da produção em sistemas de aquacultura é necessário identificar destes factores o espectro que optimize a condição das larvas, maximizando a sobrevivência dos peixes criados *ex situ* aquando da libertação (14). Embora a aquacultura de *Alosa* spp. seja comum na América do Norte (9), são escassos os trabalhos abordando a larvicultura de espécies europeias e destes menos são aqueles dirigidos à optimização dos

sistemas de cultivo (10). Sendo o recrutamento condicionado pela velocidade do desenvolvimento larvar (23), os resultados da experimentação no cultivo larvar podem ainda ser transpostos para a interpretação dos padrões de recrutamento no meio natural. A intervenção no sentido da redução das taxas de mortalidade durante a fase larvar representa um enorme potencial para a recuperação da sustentabilidade populacional dada a grande abundância de indivíduos nesta fase.

De entre os factores ambientais que influenciam o desenvolvimento dos teleósteos (24-27), a alimentação é um factor especialmente relevante numa fase do ciclo de vida em que as reservas energéticas são rapidamente dispendidas no processo de crescimento (28-30). Em larvicultura, o fornecimento de uma dieta adequada é determinante do sucesso de produção (31), sendo por vezes o factor limitante na domesticação de novas espécies (28, 32, 33). A temperatura é outro factor ambiental crucial na regulação das taxas metabólicas dos teleósteos, sendo o seu efeito mais marcado no crescimento e sobrevivência nas fases larvares devido à reduzida acumulação de reservas energéticas (25, 26, 34). A salinidade é um factor a ter em consideração na aquacultura de peixes diádromos uma vez que os valores ideais deste parâmetro poderão variar ao longo da ontogenia, dependendo do desenvolvimento e funcionalidade das estruturas de regulação osmótica (27, 35-38).

A compreensão detalhada do desenvolvimento precoce é um factor-chave para a rentabilização de recursos na aplicação de técnicas de aquacultura e obtenção de uma produção eficiente, pelo que nunca deverá ser descurada no estudo prévio da viabilidade de aplicação de medidas de recrutamento artificial (14, 39). De igual modo, a compreensão da ecologia das fases larvares é essencial para garantir as condições do habitat necessárias à sustentabilidade da espécie a longo prazo (13).

O presente trabalho teve, portanto, como objectivo avaliar a viabilidade de produzir recrutas de *Alosa fallax*, do momento da fertilização até ao estágio juvenil, em condições de saúde que propiciem a sua sobrevivência após libertação. Assim, pretendeu testar a influência da temperatura, salinidade e frequência de alimentação no crescimento e mortalidade larvar, com o propósito de rentabilizar esforços de produção e compreender aspectos mediadores do recrutamento.

MATERIAL E MÉTODOS

A captura dos reprodutores realizou-se a 3 de Junho de 2011, 5 km a montante de Mértola (Lat: 37°40'52.45"N, Long: 7°39'43.25"W), utilizando redes de tresmalhe. A identificação dos reprodutores capturados foi realizada através da observação do número e morfologia

das branquiespinhas (1). O procedimento de colecta, fecundação, transporte e acomodação dos gâmetas foi realizado de acordo com o mencionado no Capítulo 2. Chegados ao laboratório, aproximadamente uma hora após o evento de fecundação, os ovos foram transferidos para incubadoras cilíndrico-cônicas de 4 L com arejamento de fundo. Parte dos ovos permaneceram nas incubadoras até à eclosão, com renovação total da água e tratamento profilático com azul-de-metileno a cada 12 horas. Estes indivíduos foram utilizados para testar o efeito da salinidade e a frequência da alimentação no crescimento e mortalidade. Uma outra porção dos ovos foi repartida pelo sistema experimental para testar a influência da temperatura no desenvolvimento.

Teste da Salinidade e da Frequência de Alimentação

O efeito da salinidade e frequência de alimentação na sobrevivência e crescimento larvar de *A. fallax* foi testado submetendo as larvas a seis salinidades distintas: 0 g/L, 2,5 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L e 20 g/L, e a duas frequências de alimentação (1x/dia e 3x/dia). Os valores de salinidade desejados foram obtidos por dissolução de sal de salina não refinado. A unidade experimental considerada (replicado) consistiu de um aquário de 1 L onde foram colocadas dez larvas com três dias pós-eclosão sem período de adaptação à salinidade de teste. Para cada salinidade em teste foram realizados seis replicados, dos quais metade foi alimentada uma vez ao dia, por volta das 9:00, sendo à outra metade fornecido alimento três vezes ao dia, pelas 9:00, 13:00 e 17:00. Em cada momento de alimentação foram fornecidos 0,2 mL escorridos de *nauplii* de *Artemia franciscana* recém-eclodidos. A experiência decorreu durante dez dias com registo diário da mortalidade em cada replicado. Após este período mediu-se o comprimento total ($C_T \pm 0,1\text{mm}$) de cada indivíduo sobrevivente. O C_T no início da experiência terá sido equivalente uma vez que a proveniência dos gâmetas foi igual para todos os indivíduos.

Para fins estatísticos foram agrupados os valores de C_T respeitantes a cada três replicados mantidos a uma mesma combinação de condições de salinidade e alimentação. Uma vez que os valores de C_T não cumpriam os pressupostos de normalidade e homocedestividade, mesmo após transformação, foi realizada uma análise de comparação de medianas (Kruskal-Wallis, $P < 0,01$) entre as cinco salinidades testadas, separadamente para cada experiência de frequência de alimentação. *A posteriori* realizou-se um teste de Dunn ($P < 0,01$) para determinar entre que salinidades existiam diferenças significativas de C_T . A influência da frequência de alimentação no C_T das larvas sujeitas às diferentes condições de salinidade foi testada através de um teste de Mann-Whitney ($P < 0,01$), separadamente para cada salinidade.

Teste da Temperatura

O efeito da temperatura da água no crescimento larvar de *A. fallax* foi testado a 20°C, 24°C e 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), replicando quatro vezes cada temperatura. Os ovos recém-fecundados foram repartidos por doze grupos de 500 a 1000 ovos e instalados em incubadoras no interior de aquários de 100 L. Cada quatro aquários foram gradualmente acomodados a uma das três temperaturas em teste ($\approx 1^\circ\text{C}/\text{h}$). Da activação à repartição pelo sistema experimental e início do condicionamento térmico decorreram cerca de 6 horas. Dentro da incubadora, a entrada de água manteve a sua circulação, suspendendo os ovos para manter a sua oxigenação e impedir a proliferação de fungos a partir dos oócitos não fecundados. A malhagem da rede utilizada para a saída de água da incubadora (0,2mm) permitia a saída das larvas após a eclosão, retendo os ovos no seu interior.

Nos aquários a circulação e arejamento da água fez-se como dupla função dos filtros de esponja. Efectuaram-se renovações parciais de água semanalmente para remoção dos detritos acumulados no fundo do aquário e a lavagem dos filtros. A salinidade foi gradualmente aumentada a partir de 0 g/L para 4 g/L ao ritmo de 1 g/L.dia⁻¹ após a eclosão. As larvas estiveram sujeitas ao fotoperíodo natural. A primeira alimentação foi fornecida 48 horas após a eclosão, sendo realizados três eventos de alimentação diários, pelas 9:00, 13:00 e 17:00, com cerca de 10⁶ *nauplii* recém-eclodidos de *Artemia franciscana* a cada aquário. Aos 45 dias de vida livre iniciou-se o desmame progressivo para uma dieta formulada “Skretting Gemma Wean Diamond” ($\approx 0,5\text{mm}$), fornecida seis vezes ao dia em quantidade dependente da aceitação. A partir dos 75 dias, até à conclusão da experiência, os peixes foram alimentados apenas com ração, uma a duas vezes ao dia.

As larvas foram medidas vivas à lupa binocular, utilizando uma ocular micrométrica ($C_T \pm 0,1\text{mm}$). Realizou-se um evento de amostragem a cada dois dias durante o primeiro mês de vida livre, efectuando-se posteriormente medições quinzenais até à conclusão da experiência (100 dias após activação). Durante o primeiro mês, foram medidas 12 larvas por replicado a cada evento de amostragem. Posteriormente, mediram-se 20 larvas por evento de amostragem. As larvas mais precoces ($C_T < 15\text{mm}$) foram aleatoriamente amostradas com uma rede, transferidas para uma placa de Petri e imobilizadas por remoção da água em excesso. Larvas de maiores dimensões ($C_T \approx 15\text{mm}$), com maior mobilidade, foram anestesiadas numa solução de 0,5 mL/L de MS222 para permitir uma medição rápida e minimizar o *stress* da manipulação. Após a medição, as larvas foram imediatamente transferidas para tinas com água sem anestésico e devolvidas ao aquário de origem após recuperação.

Para efeitos de comparação da influência das temperaturas testadas no crescimento larvar, agruparam-se os dados dos diferentes replicados por temperatura. As regressões entre o tempo após a eclosão (dias) e os C_T medidos nos diferentes testes de temperatura foram determinadas para dois períodos distintos e comparadas usando análises de covariância (ANCOVA, $P < 0,01$). O primeiro período compreende os primeiros 30 dias após a eclosão no qual se compararam as 3 temperaturas testadas. O segundo período compreendeu a experiência do início ao final, comparando os dados recolhidos somente às temperaturas de 24°C e de 28°C dado que a população amostrada a 20°C diminuiu marcadamente após o primeiro período. A mortalidade final foi aferida contando os peixes sobreviventes em cada replicado no último dia da experiência, comparando-o com o número de larvas eclodidas, estimado a partir da taxa de fecundação multiplicada pelo número de ovos inicial no replicado.

RESULTADOS

Teste da Salinidade e da Frequência de Alimentação

▪ *Crescimento*

Os C_T médios observados em cada tratamento de alimentação variaram significativamente devido à salinidade (Fig. III.1b, teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,01$). Nas larvas alimentados 1x/dia, o C_T observado no teste a 0 g/L foi significativamente menor do que o C_T observado nos restantes testes (teste de Dunn, $Q > 3,29$; $P < 0,01$), excepto a 15 g/L, salinidade à qual foram considerados pelo teste como marginalmente menores (teste de Dunn, $Q > 2,81$; $P < 0,05$) devido ao número de exemplares sobreviventes ($N=4$). As larvas alimentadas 3x/dia a salinidades de 0 g/L foram consideradas significativamente menores do que os exemplares medidos nos testes a 10 g/L e a 15 g/L (teste de Dunn, $Q > 3,29$; $P < 0,01$) e marginalmente menores do que os exemplares do teste a 5 g/L (teste de Dunn, $Q > 2,81$; $P < 0,05$). As comparações entre as restantes salinidades não foram significativamente distintas para ambos os tratamentos de alimentação (teste de Dunn, $P > 0,05$). Do conjunto de replicados testado a cada salinidade, aqueles que foram alimentados mais frequentemente apresentaram sempre um C_T médio superior, embora apenas com diferença significativa a 0 g/L e 10 g/L (teste de Mann-Whitney, $P < 0,01$), sendo a diferença especialmente evidente à menor salinidade (Fig. III.1b).

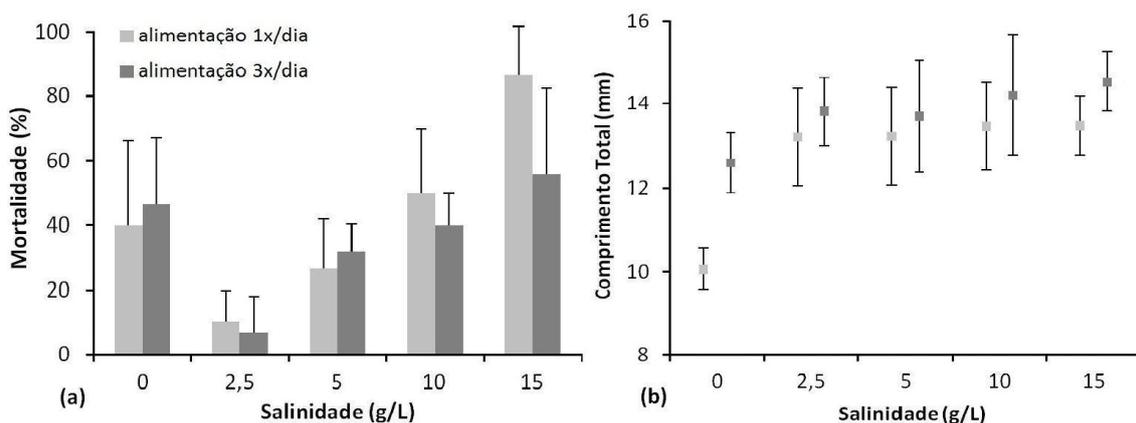


Figura III.1. (a) Mortalidades médias e desvios-padrão observados nos testes por salinidade e frequência de alimentação. (b) C_T médios e desvios-padrão observados no final da experiência nos testes por salinidade e frequência de alimentação.

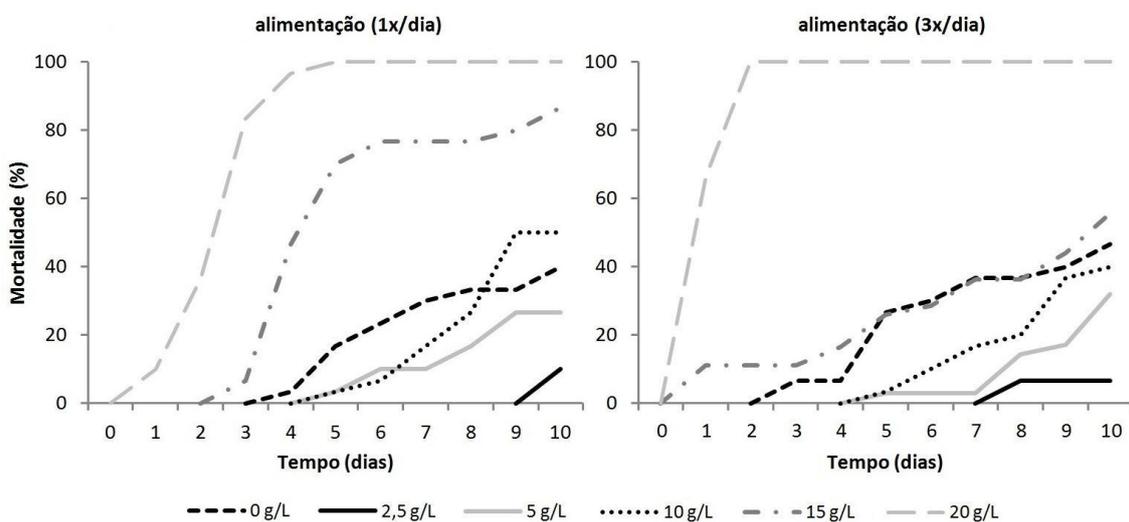


Figura III.2. Mortalidade cumulativa às diferentes salinidades por frequência de alimentação durante o período da experiência.

▪ Mortalidade

A menor mortalidade observada foi no teste a 2,5 g/L, aproximadamente 10% independentemente da frequência de alimentação (Fig. III.1a), e registou-se apenas no final do período da experiência (Fig. III.2). Os valores de mortalidade médios a salinidades de 0 g/L, 5 g/L e 10 g/L foram relativamente constantes (30 a 50%), sendo pouco influenciados pela frequência de alimentação (Fig. III.1a). A mortalidade das larvas nestes testes iniciou-se geralmente entre o 3º e o 5º dia da experiência (Fig. III.2). A 15 g/L a mortalidade observada foi elevada (80%) nos replicados alimentados 1x/dia, mas inferior nos que foram alimentados 3x/dia (50%) (Fig. III.1a). Valores de salinidade de 20 g/L conduziram à mortalidade total das larvas nos primeiros dias após início da experiência, independentemente da frequência de alimentação (Fig. III.2). De uma forma geral, a

mortalidade média às salinidades de 10 g/L e 15 g/L foi superior nos replicados alimentados 1x/dia relativamente aos alimentados 3x/dia (Fig. III.1a).

Teste da Temperatura

▪ Crescimento

Durante o primeiro mês o crescimento das larvas foi relativamente síncrono. Após o primeiro mês, observou-se um decréscimo na taxa de crescimento a todas as temperaturas, acompanhado de uma maior dispersão de C_T (Tabela III.II, Fig. III.3). As ANCOVAs realizadas entre os diferentes testes de temperatura (20°C, 24°C e 28°C) indicam diferenças significativas (ANCOVA, $P < 0,01$) no crescimento das larvas durante os diferentes períodos de crescimento (Tabela III.II, Fig. III.3).

▪ Mortalidade

Os valores de mortalidade final foram relativamente elevados em todos os testes, porém a 20°C a mortalidade foi quase total, enquanto a 24°C e a 28°C foi similar (Tabela III.I).

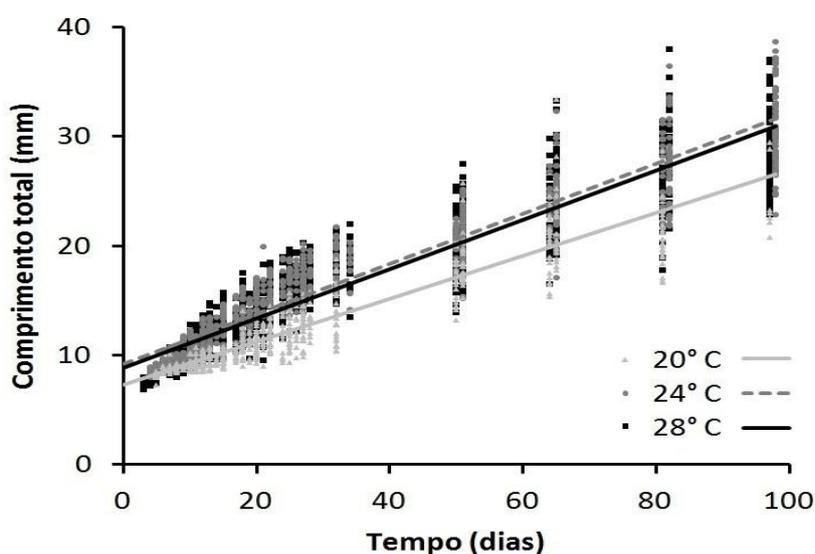


Figura III.3. Regressões ($y = a + bx$) para os C_T por temperatura em teste.

Tabela III.I. Mortalidade final média e desvio-padrão entre os quatro replicados sujeitos a cada teste de temperatura

| | 20° C | 24° C | 28° C |
|-------------------|-------|-------|-------|
| Mortalidade (%) | 98,3 | 71,2 | 72,6 |
| Desvio-padrão (%) | 0,6 | 11,0 | 6,7 |

Tabela III.II. Valores para as regressões lineares ($y = a + bx$), ajuste do modelo aos dados (R^2), valor da estatística t (t) e p-value (P)

| Período | Temperatura | A | b | T | P | R^2 |
|---------------|-------------|-------|------|-------|------|-------|
| 1º mês | 20° C | 7,06 | 0,20 | 32,02 | 0,00 | 0,68 |
| | 24° C | 6,79 | 0,39 | 67,19 | 0,00 | 0,87 |
| | 28° C | 6,55 | 0,40 | 70,60 | 0,00 | 0,88 |
| 2º e 3º meses | 20° C | 12,46 | 0,12 | 5,73 | 0,00 | 0,23 |
| | 24° C | 12,23 | 0,20 | 15,61 | 0,00 | 0,45 |
| | 28° C | 12,09 | 0,18 | 15,81 | 0,00 | 0,44 |
| Total | 20° C | 7,26 | 0,20 | 58,64 | 0,00 | 0,85 |
| | 24° C | 9,17 | 0,23 | 78,61 | 0,00 | 0,89 |
| | 28° C | 8,87 | 0,23 | 85,50 | 0,00 | 0,87 |

DISCUSSÃO

Os três factores testados demonstraram ter uma influência significativa no processo de desenvolvimento larvar da *Alosa fallax*, observável através de um crescimento e mortalidade diferenciais. A mortalidade larvar observada foi menor quando as larvas se encontravam a uma salinidade de 2,5 g/L, a uma temperatura superior a 20°C e eram alimentadas mais frequentemente. A maior frequência de alimentação resultou também num crescimento superior. A temperatura da água condicionou o crescimento e a mortalidade, sendo, dos valores testados, o valor intermédio (24°C) aquele que mais se aproximará do ideal para a espécie. A salinidade de 0 g/L foi aquela que mais restringiu o crescimento, diferenciando-se notoriamente das restantes. A salinidade de 20 g/L mostrou-se letal para larvas em início de alimentação exógena. Os resultados obtidos estão de uma forma geral de acordo com a informação existente para outras espécies do género *Alosa* (24-27, 29-32, 34-38).

Vários estudos laboratoriais foram realizados sobre o desenvolvimento da capacidade de osmorregulação de *Alosa* spp. (27, 35-38). Embora *A. fallax* se reproduza em locais a montante da cunha salina (38), as larvas mais precoces são facilmente arrastadas pela corrente (40), podendo ser transportadas para zonas de maior salinidade. As formas larvares altriciais possuem órgãos ainda em desenvolvimento podendo não estar aptas para uma regulação osmótica eficaz em águas salobras. A resposta a este factor observada em *Alosa fallax* é semelhante à de outras espécies congéneres (27, 35-38), tendo provado uma tolerância considerável a salinidades elevadas poucos dias após a eclosão, apenas perecendo a 20 g/L, embora com uma sobrevivência óptima a uma salinidade ligeiramente

mais elevada do que a típica do meio dulciaquícola (Fig. III.1a). Este aumento de salinidade actua aproximando a pressão osmótica do meio à pressão osmótica do organismo (41). Não obstante, existe alguma disparidade do valor ideal observado para *A. fallax* relativamente àquele observado para outras espécies de *Alosa*, que parecem preferir salinidades próximas de 10g/L (36, 38), meio isosmótico (41). A capacidade de hiposmorregulação em ambiente marinho só se desenvolve no final do desenvolvimento larvar (37), ocorrendo antes de efectuada a migração activa para jusante (27).

À semelhança de outras espécies pertencentes ao género, as larvas de *Alosa fallax* aceitam prontamente *nauplii* de *Artemia* spp. recém-eclodidos como primeira fonte de alimento exógena, já que estes apresentam o tamanho e comportamento ideais (28, 29). Outros alimentos testados preliminarmente, desde microalgas e rotíferos a ração microencapsulada, foram ignorados parcial ou totalmente, limitando o crescimento. Como expectável, a frequência de alimentação promoveu o crescimento (Fig. III.1b) (25). De notar que nas condições de cultivo do presente trabalho, a interacção entre os factores alimentação e salinidade foi considerada especialmente relevante, visto que os *nauplii* de *Artemia* spp. têm uma sobrevivência reduzida em ambiente dulciaquícola. Assim, sendo as larvas a 0 g/L tiveram a disponibilidade de alimento temporalmente mais restrita apesar de a dosagem ser idêntica à das restantes salinidades, crescendo conseqüentemente mais devagar e com menor dispersão de tamanhos, mesmo no tratamento com maior frequência de alimentação. O aumento de C_T às restantes salinidades testadas com a alimentação 3x/dia relativamente àquelas alimentadas 1x/dia, poderá estar relacionado com a disponibilidade dos *nauplii* de diferentes tamanhos (31). Às salinidades de 10 g/L e 15 g/L, a mortalidade média é superior nos replicados alimentados 1x/dia quando comparada com a dos alimentados 3x/dia (Fig. III.1a). Isto sugere que a estes valores de salinidade, a necessidade de osmorregular poderá exigir um maior dispêndio energético, portanto uma alimentação mais frequente.

O crescimento foi considerado significativamente distinto entre as três temperaturas testadas, apesar da aparente proximidade gráfica das regressões a 24°C e 28°C. É provável que a 28°C as larvas sofram stress térmico, já que a temperatura a que se desenvolvem os organismos heterotérmicos regula o seu ritmo metabólico (22). Temperaturas acima do ideal aceleram os processos de interacção molecular, mas limitam o tempo de vida médio enzimático, exigindo ao organismo um consumo energético superior. Assim, é possível que a temperatura não seja só um factor limitante directo, mas também indirecto, já que a alimentação foi a mesma entre replicados nos diferentes testes e a concentração de oxigénio em solução terá sido comparativamente reduzida a uma temperatura mais

elevada. Os indivíduos mantidos a 20°C têm um crescimento notoriamente mais lento, já que temperaturas abaixo do ideal limitam o metabolismo celular e o crescimento do organismo. É reconhecido que para *Alosa* spp. as temperaturas ideais de crescimento serão superiores a 20°C (24-26, 34), contudo a mortalidade quase total dos indivíduos mantidos a esta temperatura mais baixa foi inesperada. O tempo de eclosão também apresentou diferenças, tendo as larvas nos replicados a 28°C, eclodido passados 3 dias após a activação, nos replicados a 24°C eclodiram no dia seguinte, e a 20°C a eclosão só se iniciou ao quinto dia após a activação e foi pouco síncrona, com indivíduos a eclodirem durante um período superior a 24 horas.

A mortalidade final média obtida nos replicados a 24°C e 28°C foi elevada (Tabela III.I). Embora não se tenham determinado taxas de mortalidade devido à dificuldade da contagem precisa do número de larvas perdidas, várias causas podem explicar estes valores. Primeiro, o protocolo experimental exigia a manipulação das larvas para medição, sendo reconhecido que as larvas de *Alosa* spp. são particularmente sensíveis a *stress* nestas condições (29). Os cuidados tomados durante a manipulação resultaram numa mortalidade imediata baixa, porém a mortalidade consequente a longo prazo não foi investigada. Segundo, cerca de um décimo das larvas de cada replicado morreu por dessecação quando aderiram à parede do aquário. Este fenómeno ocorreu num período transitório em que os indivíduos se localizavam preferencialmente junto ao perímetro da linha de água e desenvolveram a capacidade para se impulsionarem para fora de água. Por último, no final da experiência, cerca de 30% das larvas apresentavam algum tipo de deformação bucal, tumescente ou em forma de bolha (Fig. III.4). Este é um aspecto prioritário a investigar, sendo necessário descobrir a natureza da sua ocorrência dado que os progenitores, dez no total, pertenciam ao *stock* natural. Adicionalmente, as larvas poderão ter sofrido um défice alimentar ou nutricional nas duas últimas semanas da experiência em que alimentação foi menos regular e apenas com base em ração formulada.

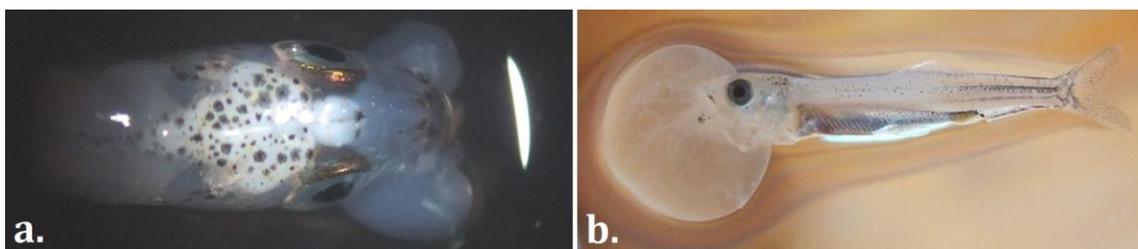


Figura III.4. Casos extremos de deformações da estrutura bucal tumescentes (a) e membranares (b).

Devido às limitações deste estudo, é importante realizar mais testes em sistemas de cultivo mais automatizados para afinação da produção larvar. Não obstante, a experimentação desenvolvida forneceu indicações claras de quais as condições básicas de temperatura, salinidade e disponibilidade alimentar que promovem o crescimento e a sobrevivência de *Alosa fallax*. Igualmente, demonstrou que é praticável a obtenção de gâmetas a partir do *stock* selvagem com taxas de fecundação elevadas, o que elimina os custos inerentes à manutenção de um *stock* reprodutor e mitiga a perda de diversidade genética associada a este tipo de acções. Por último, estes dados acerca do condicionamento do desenvolvimento larvar revelaram-se potencialmente importantes para interpretação da situação ecológica da espécie no Guadiana durante as primeiras fase de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- (1) Quignard J.P., Douchement C. (1991) *Alosa fallax fallax* (Lacépède, 1803) In: Hoestlandt H. (ed.) *The Freshwater Fishes of Europe. Clupeidae, Anguillidae*. Vol. 2, 225-256. Aula-Verlag Wiesbaden.
- (2) Costa M.J., Almeida P.R., Domingos I.M., Costa J.L., Correia M.J., Chaves M.L., Teixeira C.M. (2001) Present status of the main shads' populations in Portugal. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 362/363, 1109-1116.
- (3) Thiel R., Riel P., Neumann R., Winkler H.M. (2004) Status of the anadromous twaite shad (*Alosa fallax* Lacepède, 1803) in German and adjacent waters of the Baltic Sea. ICES CM2004/S:08, 236-237.
- (4) Le Corre M., Alexandrino P., Sabatié M.R., Aprahamian M., Bagliniere, J.L. (2005) Genetic characterisation of the Rhodanian twaite shad, *Alosa fallax rhodanensis*. *Fisheries Management and Ecology*, 12, 275-282.
- (5) Lopez, M.A., Gazquez N., Olmo-Vidal J.M., Aprahamian M.W., Gisbert E. (2007) The presence of anadromous twaite shad (*Alosa fallax*) in the Ebro River (western Mediterranean, Spain): an indicator of the population's recovery? *Journal of Applied Ichthyology*, 23, 163-166.
- (6) Volk J., Bekkevold D., Loeschcke V. (2007) Weak population differentiation in northern European populations of the endangered anadromous clupeid *Alosa fallax*. *Journal of Fish Biology*, 71, 461-469.
- (7) Jonsson B., Waples R.S., Friedland K.D. (1999) Extinction considerations for diadromous fishes. *Journal of Marine Science*, 56, 405-409.
- (8) Philippart J.C. (1995) Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biological conservation*, 72, 281-295.
- (9) Hendricks, M.L. 2003. Culture and transplant of alosines in North America. In: Limburg K.E. and Waldman J.R. (eds.) Biodiversity, status, and conservation of the world's shads. *American Fisheries Society*, 35, Bethesda, Maryland, 303-312.
- (10) Scharbert A., Beeck P., Rochard E., St. Pierre R., Jatteau P. (2011) Management Plan to the LIFE project "The re-introduction of the Allis shad (*Alosa alosa*) to the Rhine system" (LIFE06 NAT/D/000005), 36 pp.
- (11) Rogado L. (coord.), Alexandrino P., Almeida P.R., Alves J., Bochechas J., Cortes R., Domingos I., Filipe F., Madeira J., Magalhães F. (2005) *Alosa fallax* Savelha In: Cabral M.J.,

Almeida J., Almeida P.R., Dellinger T., Ferrand de Almeida N., Oliveira M.E., Palmeirim J.M. Queiroz A.I., Rogado L., Santos-Reis M. (eds.) *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa.

(12) Sarrazin F., Barbault R. (1996) Reintroduction: challenges and lessons for basic ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 474-478.

(13) McDowall R.M. (1999) Different kinds of diadromy: Different kinds of conservation Problems. *Journal of Marine Science*, 56, 410-413.

(14) Fushimi H. (2001) Production of juvenile marine fish for stock enhancement in Japan. *Aquaculture*, 200, 33-53.

(15) Brown C., Day R.L. (2002) The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries*, 3, 79-94.

(16) Baglinière J.L., Sabatié M.R., Rochard E., Alexandrino P., Aprahamian M.W. (2003) The allis shad (*Alosa alosa*): biology, ecology, range, and status of populations. In: Limburg K.E., Waldman J.R., (eds.) *Biodiversity, Status and Conservation of the World's Shad. American Fisheries Society Symposium*, 35, 103-124.

(17) Gil F., Faria C., Almada V.C. (2010) An efficient technique for the captive breeding of an endangered freshwater fish *Salaria fluviatilis* (Pisces: Blenniidae), with a description of its ontogeny. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41, 49-56.

(18) Gil F., Sousa-Santos C., Almada V.C. (2010) A simple and inexpensive technique for the *ex situ* reproduction of critically endangered cyprinids –*Achondrostoma occidentale* as a case study. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41, 661-664.

(19) Carrapato C., Ribeiro F. (*in press*) Larval development of the Iberian cyprinid *Anaecypris hispanica*, *Limnetica*.

(20) Bernardo J.M., Sousa L., Matos J., Matono P., Maximino P., Costa A.M. (2001) *Biologia e Ecologia dos Peixes Migradores no rio Guadiana - Relatório Final. Estudos de Biologia e Ecologia de Animais - Peixes Migradores. Universidade de Évora, Departamento de Ecologia. 178 pp.*

(21) Esteves E.B.O. (2006) Ecology of the life-history stages of shad *Alosa fallax fallax* Lacépède, 1803) in the River Mira, with a note on *Alosa* sp larvae in the River Guadiana. Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente, Universidade do Algarve, Faro.

(22) Landsman S.J., Gingerich A.J., Philipp D.P., Suski C.D. (2011) The effects of temperature change on the hatching success and larval survival of largemouth bass

Micropterus salmoides and smallmouth bass *Micropterus dolomieu*. *Journal of Fish Biology*, 78, 1200-1212.

(23) Betti P., Machinandiaarena L., Ehrlich M.D. (2009) Larval development of Argentine hake *Merluccius hubbsi*. *Journal of Fish Biology*, 74, 235-249

(24) Crecco V.A., Savoy T.F. (1985) Effects of Biotic and Abiotic Factors on Growth and Relative Survival of Young American Shad, *Alosa sapidissima*, in the Connecticut River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 1640-1648.

(25) Leach S.D., Houde E.D. (1999) Effects of environmental factors on survival, growth, and production of american shad larvae. *Journal of Fish Biology*, 54, 767-786

(26) Aprahamian M.W., Aprahamian C.D. (2001) The influence of water temperature and flow on year class strength of twaite shad (*Alosa fallax fallax*) from the river Severn, England. *Bulletin Français de la Pêche Pisciculture*, 362/363, 953-972.

(27) Leguen I., Véron V., Sevellec C., Azam D., Sabatié R., Prunet P., Baglinière J.L. (2007) Development of hypoosmoregulatory ability in allis shad *Alosa alosa*. *Journal of Fish Biology*, 70, 630-637.

(28) Divanach P., Kentouri M. (2000) Hatchery techniques for specific diversification in Mediterranean finfish larviculture. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*, 47, 75-89

(29) Heinrich J.W. (1981) Culture, feeding, and growth of alewives hatched in the laboratory. *The Progressive Fish-Culturist*, 43, 3-7.

(30) Howey R.G. (1985) Intensive Culture of Juvenile American Shad. *The Progressive Fish-Culturist*, 47, 203-212.

(31) Wiggins T.A., Bender Jr.T.R., Mudraka V.A., Coll J.A. (1985) The Development, Feeding, Growth, and Survival of Cultured American Shad Larvae Through the Transition from Endogenous to Exogenous Nutrition. *The Progressive Fish-Culturist*, 47, 87-93.

(32) Johnson J.H., Dropkin D.S. (1995) Effects of prey density and short term food deprivation on the growth and survival of American shad larvae. *Journal of Fish Biology*, 46, 872-879.

(33) Lavens P., Sorgeloos P. (1996) Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 361, 295 pp.

(34) Kellogg R.L. (1982) Temperature Requirements for the Survival and Early Development of the Anadromous Alewife. *The Progressive Fish-Culturist*, 44, 63-73

(35) Chittenden M E.Jr. (1972) Salinity tolerance of young blueback herring, *Alosa*

Aestivalis. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1, 123-125.

(36) Limburg K., Ross R. M. (1995) Growth and mortality rates of larval american shad, *Alosa sapidissima*, at different salinities. *Estuaries*, 2, 335-340

(37) Zydlewski J., McCormick S.D. (1997) The ontogeny of salinity tolerance in the American shad, *Alosa sapidissima*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 182-189.

(38) Bardonnnet A., Jatteau Ph. (2008) Salinity tolerance in young Allis shad larvae (*Alosa alosa* L.). *Ecology of Freshwater Fish*, 17, 193-197.

(39) Leber K.M. (2002) Advances in marine stock enhancement: shifting emphasis to theory and accountability In: Stickney R.R., McVey J.P. (eds.) *Responsible Marine Aquaculture*. CAB International. 79-90.

(40) Jatteau P., Bardonnnet A., Belaud A., Dauba F., Sabatié M.R., Véron V. (2002) Ecology of the young stages of allis shad *Alosa alosa* - First investigation on habitats colonized before downstream migration. INIST-CNRS, 57 pp.

(41) Takei Y., Kawakoshi A., Tsukada T., Yuge S., Ogoshi M., Inoue K., Hyodo S., Bannai H., Miyano S. (2006) Contribution of comparative fish studies to general endocrinology: structure and function of some osmoregulatory hormones. *Journal of Experimental Zoology*, 305A, 787-798.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies anádromas desempenham um papel ecológico importante nos ecossistemas lóticos, mediando um fluxo de nutrientes do meio marinho para o meio dulciaquícola (1). Na elaboração e implementação de estratégias de conservação eficazes há que compreender o ciclo de vida destas espécies e de que modo este é condicionado pelos múltiplos factores ambientais. O reforço populacional através de recrutamento artificial só deverá ser aplicado quando enquadrado num plano de recuperação da sustentabilidade ecológica da espécie e nunca a longo prazo (2-4). O recrutamento artificial deve ser fundamentado de modo a mitigar potenciais efeitos de debilitação da diversidade genética populacional (5).

O presente trabalho disponibilizou informação útil para a produção de recrutas de *Alosa fallax* e optimização da sua condição, fornecendo indicações sobre cuidados a prestar na selecção dos locais e períodos mais apropriados para a sua libertação de modo a minimizar o *stress* de adaptação aos parâmetros ecológicos. Vem ainda contribuir com uma ferramenta para a monitorização da reprodução e recrutamento de *A. fallax* (6), estabelecendo uma descrição detalhada de uma série de estádios larvares definidos para esta espécie. Não obstante, é importante estabelecer uma ligação entre os aspectos ontogenéticos e ecológicos do desenvolvimento de *A. fallax* avaliando de que modo o desenvolvimento ontogenético varia perante parâmetros que variam a diferentes escalas, nunca descartando que as variações poderão alterar aspectos morfométricos ou merísticos (7).

Neste trabalho, foram identificadas três grandes fases funcionais no desenvolvimento larvar. Uma primeira fase em que a larva tem mobilidade e capacidade predatória limitadas (Embrião livre, Larva 1, Larva 2), uma segunda fase que compreende o desenvolvimento das barbatanas em que a larva já apresenta um padrão natatório mais direccional e dinâmico (Larva 3) e uma última fase após completa a formação das barbatanas, quando a natação se assemelha já à dos juvenis, com detecção e reacção a predadores e presas a grande distância. Às larvas de *A. fallax* está associada, desde um momento precoce do desenvolvimento, a capacidade de osmorregular em meios salobros, embora a capacidade de osmorregulação em ambiente marinho só se desenvolva perto da conclusão da metamorfose (8). Observou-se que para fins de produção *ex situ*, esta capacidade é francamente benéfica quando a alimentação das larvas tem por base *nauplii* de *Artemia* spp.. No meio natural a interacção entre os factores alimentação e salinidade é desconhecida e considerações sobre os benefícios de um meio salobro durante o desenvolvimento larvar serão especulativas. Ademais, a faixa de salinidade potencialmente propicia ao desenvolvimento é, no rio Guadiana, relativamente estreita (9)

e móvel, condicionada pela maré e pelas descargas fluviais, pelo que as larvas mais precoces necessitariam de possuir alguma capacidade de retenção. Esteves (10) relata a captura de clupeídeos no Guadiana apenas junto à boca do estuário e até cerca de 10 km a montante, onde a salinidade é superior à suportada pelos estádios larvares mais precoces de *A. fallax*, pelo que a metodologia de amostragem utilizada deverá ser afinada de acordo com a necessidade da amostragem de todo o troço do rio em que se realize a reprodução.

No rio Guadiana, a alteração da dinâmica hidrológica poderá ter vindo alterar padrões de temperatura (11). Os registos de temperatura da água à superfície (50 cm) realizados entre Maio e Agosto de 2011 no canal principal em Mértola, apresentaram valores mais baixos do que em anos anteriores (Tabela IV.I), restando perceber se esta alteração foi pontual ou será permanente devido ao funcionamento da Barragem de Alqueva. Neste trabalho, demonstrámos que as baixas temperaturas da água são desfavoráveis ao desenvolvimento de *A. fallax*, directa e indirectamente caso venha a diminuir a produtividade do meio. Por outro lado, de acordo com as predições de alteração da distribuição de peixes diádromos por modelos de aquecimento global (12), testou-se também uma temperatura mais elevada à média histórica, que se determinou estar perto do limite superior aceitável para o desenvolvimento larvar da espécie.

Tabela IV.I. Temperaturas médias e desvios-padrão do canal principal do rio Guadiana durante os meses de reprodução de *A. fallax* para o ano de 2003 (Ribeiro, dados não publicados) em Brinches (35km a jusante da Barragem de Alqueva) e para o ano de 2011 em Mértola (85km a jusante da Barragem de Alqueva).

| | 2003 | 2011 |
|--------|----------------------|----------------------|
| | $\bar{x} \pm s$ (°C) | $\bar{x} \pm s$ (°C) |
| Maio | 22,9 ± 4,2 | 19,9 ± 0,6 |
| Junho | 26,4 ± 2,5 | 19,8 ± 0,8 |
| Julho | 26,7 ± 1,5 | 20,5 ± 0,7 |
| Agosto | 27,8 ± 1,6 | 21,3 ± 0,6 |

É particularmente importante mencionar que foi detectada uma incidência elevada de deformações bucais deletérias nas larvas. Um estudo futuro debruçando-se sobre a origem destas deformações é indispensável para determinar a natureza desta condição. Existe a hipótese de que possa estar a limitar o recrutamento da espécie caso se trate de um fenómeno genético. Caso se trate de uma condição resultante das condições de cultivo, há que determinar metodologias de manejo para evitar a sua ocorrência.

Na sequência deste trabalho, serão necessários mais estudos seguindo as linhas de investigação apresentadas. Especificamente, salienta-se que sem uma descrição da ontogenia das larvas de *Alosa alosa* não será possível estabelecer uma chave para a distinção das suas larvas relativamente às larvas de *A. fallax*. Deverá ser tida em consideração a inclusão da descrição do desenvolvimento larvar de híbridos de ambas as espécies. *A. alosa* é também uma espécie prioritária para uma futura intervenção de recrutamento artificial em Portugal, mas que devido à sua reduzida abundância envolverá uma logística mais complexa para a obtenção de gâmetas, como, por exemplo, a manutenção de um *stock* reprodutor *ex situ* ou a criopreservação de esperma. No estudo do seu cultivo *ex situ* deverão ser ponderados benefícios e desvantagens inerentes às diversas opções atendendo ao estado de conservação da espécie. Este trabalho fornece um entendimento base da biologia de *Alosa fallax* que permitirá uma melhor monitorização do recrutamento larvar da espécie, incentivará a realização de acções de conservação coordenadas e servirá como suporte à larvicultura de *Alosa* spp. em Portugal.

REFERÊNCIAS

- (1) Willson M.F., Halupka K.C. (1995) Anadromous fish as key-stone species in vertebrate communities. *Conservation Biology*, 9, 489-497.
- (2) Philippart J.C. (1995) Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biological conservation*, 72, 281-295.
- (3) de Groot S.J. (2002) A review of the past and present status of anadromous fish species in the Netherlands: is restocking the Rhine feasible? *Hydrobiologia*, 478, 205-218.
- (4) Le Vay L., Carvalho G.R., Quintio E.T., Lebata J.H., Ut V.N., Fushimi H. (2007) Quality of hatchery-reared juveniles for marine fisheries stock enhancement *Aquaculture*, 268, 1-4, 169-180.
- (5) Waples R.S. (1999) Dispelling some myths about hatcheries. *Fisheries*, 24, 2, 12-21.
- (6) Miller T.J., Crowder L.B., Rice J.A., Marschall E.A. (1988) Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, 1657-1670.
- (7) Gozlan R. E., Copp G.H., Tourenq J. (1999) Comparison of growth plasticity in the laboratory and field, and implications for the onset of juvenile development in sofie, *Chondrostoma toxostoma* *Environmental Biology of Fishes* 56, 153-165.
- (8) Bardonnet A., Jatteau Ph. (2008) Salinity tolerance in young Allis shad larvae (*Alosa alosa* L.). *Ecology of Freshwater Fish*, 17, 193-197.
- (9) Domingues R.B., Anselmo T.P., Barbosa A.B., Sommer U., Galvão H.M. (2010) Tidal Variability of Phytoplankton and Environmental Drivers in the Freshwater Reaches of the Guadiana Estuary (SW Iberia). *International Review of Hydrobiology*. 95, 4-5, 352-369.
- (10) Esteves E.B.O. (2006) Ecology of the life-history stages of shad *Alosa fallax fallax* Lacépède, 1803) in the River Mira, with a note on *Alosa* sp larvae in the River Guadiana. Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente, Universidade do Algarve, Faro.
- (11) Olden J.D., Naiman R.J. (2010) Incorporating thermal regimes into environmental flows assessments: modifying dam operations to restore freshwater ecosystem integrity. *Freshwater Biology*, 55, 86-107.
- (12) Lassalle G., Rochard E. (2009) Impact of twenty-first century climate change on diadromous fish spread over Europe, North Africa and the Middle East. *Global Change Biology*, 15, 1072-1089.

Nada, renada e torna a nadar

No nada eu nado e me hei de afogar

E mesmo que nada, a tese não mudo

O nada existe, o nada é tudo