



CONTRIBUTOS PARA O ESTUDO DA BOGA-PORTUGUESA,
IBEROCHONDROSTOMA LUSITANICUM Collares-Pereira, 1980:
ECOLOGIA, REPRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.

Cristina Maria da Silva Conceição Branco de Lima

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutoramento em Biologia do Comportamento

2024



CONTRIBUTOS PARA O ESTUDO DA BOGA-PORTUGUESA,
IBEROCHONDROSTOMA LUSITANICUM Collares-Pereira, 1980:
ECOLOGIA, REPRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.

Cristina Maria da Silva Conceição Branco de Lima

Tese orientada por Joana Isabel Espírito-Santo Robalo

Tese coorientada por Carla Patrícia Cândido de Sousa Santos

MARE – Marine and Environmental Sciences Centre / ARNET - Aquatic Research
Network

Ispa – Instituto Universitário de Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida, Lisboa,
Portugal

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutoramento em Biologia do Comportamento

2024

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia do Comportamento, realizada sob a orientação de Joana Isabel Espírito Santo Robalo e Carla Patrícia Cândido de Sousa Santos, apresentada no ISPA - Instituto Universitário no ano de 2024

Frequência do plano doutoral em Biologia do Comportamento apoiado por Bolsa de Excelência ISPA

Agradecimentos

Nunca é de ânimo leve que se embarca num projecto de doutoramento. Uma viagem longa (qual Odisseia de Ulisses) e trabalhosa que se tornaria impossível de terminar não fosse o apoio de um conjunto de pessoas importantes. Gostaria aqui de agradecer às pessoas que me acompanharam ao longo destes anos, algumas ao longo de todo o processo, outras em etapas do caminho.

Em primeiro lugar quero agradecer às minhas orientadoras, Joana e Carla, por me darem um apoio incomensurável e terem acreditado na minha capacidade de levar este barco a bom porto. Cada uma à sua maneira, deram-me todo o apoio que precisei e “empurraram-me do ninho” mesmo quando eu achava que não ia conseguir voar. Tenho orgulho em dizer que tenho, nestas duas pessoas, amigas para sempre. Sou-vos imensamente grata.

O trabalho teria sido muito mais difícil se não tivesse a Toca, onde me acompanharam os meus queridos colegas e amigos, a quem agradeço a amizade e o apoio nos dias difíceis: Sara, Miguel, Pedro, Frederico, André, Karen e Ana. A Ana, além de me aturar, também me ajudou a percorrer os meandros estatísticos! E a Sara que me ensinou a assistir e a executar!

Quero também agradecer à Dra. Fátima Gil, do Aquário Vasco da Gama, e todos os funcionários que me ajudaram durante o trabalho de descrição do desenvolvimento embrionário e larvar.

Às minhas amigas, que estão sempre presentes, prontas para dar a mão, para a galhofa e para uma lagriminha básica quando é preciso.

À minha família, Mãe, Pai e meu Mano, por todo o apoio e amor que sempre me deram, um colo sempre disponível para me receber em qualquer altura. Um obrigado gigante!

À Nikita por ser minha companheira de todas as horas e por me obrigar a espairecer, pelo menos, três vezes por dia.

Ao Alexandre, por tanta coisa que é difícil pôr em palavras. Obrigada por partilhares comigo esta Viagem.

Um agradecimento muito grande a todos!

Palavras-chave:

Água doce; ictiofauna endêmica; risco de extinção; conservação

Keywords:

Freshwater; endemic ichthyofauna; extinction risk; conservation

Categorias de Classificação da tese

2400 Animal Experimental & Comparative Psychology

2440 Social & Instinctive Behavior

2500 Physiological Psychology and Neuroscience

2510 Genetics

RESUMO

Nas últimas décadas as ameaças à biodiversidade têm sido cada vez mais numerosas, nomeadamente para os especialmente sensíveis ecossistemas de água doce. Estes ambientes ocupam uma área relativamente reduzida do planeta, porém onde a perda de biodiversidade parece ser mais elevada do que em ambientes terrestres.

A Península Ibérica (PI) constitui um sistema isolado do resto da Europa no que diz respeito a espécies aquáticas. Este isolamento resulta da evolução geomorfológica da região com o estabelecimento dos Pirenéus. O surgimento de formações geológicas complexas, a alteração de escoamento das suas bacias hidrográficas e fenómenos tectónicos condicionaram o curso dos rios e ribeiras e, conseqüentemente, das espécies que neles habitavam. Os peixes de água doce, sendo peixes primários, são intolerantes à salinidade e a única forma de dispersarem é através de contactos entre linhas de água. Como consequência, as suas histórias evolutivas estão inevitavelmente ligadas às das bacias hidrográficas. A PI é rica em endemismos, com cerca de 80% das espécies estritamente dulciaquícolas endémicas. O mesmo se observa nas águas continentais portuguesas com 10 endemismos lusitânicos registados.

Um desses endemismos é a boga-portuguesa, *Iberochondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980, espécie com estatuto de ameaça IUCN *Criticamente em Perigo*. Habita rios e ribeiros pouco profundos do tipo mediterrâneo nas bacias do Tejo, Sado e Ribeiros do Oeste tendo sido objecto de monitorizações em ambientes urbanos, particularmente, nas ribeiras da Lage, Barcarena, Rios Jamor, Lizandro e Ota. Estas monitorizações mostram uma variabilidade na estrutura populacional entre os vários locais e anos amostrados. Em alguns dos locais foram detectadas espécies exóticas e invasoras e o ensombramento registado foi considerado razoável, embora não correspondente à complexidade da galeria ripícola. Uma das ameaças conhecidas para as espécies de água doce continentais portuguesas é a degradação dos habitats que, aliada ao reduzido efectivo, impõe a necessidade de medidas de conservação mais imediatas que incluem a reprodução *ex situ*. Para isso, foi criado um Projecto de conservação com uma vertente de restauro ambiental associada a reprodução em cativeiro em condições semi-naturalistas. A reprodução nestas condições foi bem-sucedida, com uma elevada produção de descendentes subsequentemente libertados nos locais de origem dos reprodutores. De modo a perceber as características das fases iniciais de vida foi registado o desenvolvimento de ovos e larvas de *I. lusitanicum* de uma população do Sado reproduzida em cativeiro. As fases embrionária e larvar, no seu conjunto, são relativamente longas, o que deixa os indivíduos vulneráveis a perturbações e ameaças durante mais tempo. As diferentes populações de *I. lusitanicum* estão isoladas em cursos de água sem contacto e para esclarecer as suas relações filogeográficas, realizou-se uma análise molecular que confirmou existirem diferenças significativas entre dois grandes grupos: Tejo+Oeste e Sado, e a análise morfológica dos indivíduos foi concordante com as diferenças moleculares encontradas. Deste modo, sugere-se a separação da população Tejo+Oeste numa espécie diferente, *Iberochondrostoma tagensis*.

ABSTRACT

In recent decades, threats to biodiversity have been increasingly numerous, particularly for especially sensitive freshwater ecosystems. These environments occupy a relatively small area of the planet, but where the loss of biodiversity appears to be higher than in terrestrial environments.

The Iberian Peninsula (IP) constitutes a system isolated from the rest of Europe regarding aquatic species. This isolation results from the geomorphological evolution of the region with the establishment of the Pyrenees. The emergence of complex geological formations, changes in the flow of its river basins and tectonic phenomena conditioned the course of rivers and streams and, consequently, the species that inhabited them. Freshwater fish, being primary fish, are intolerant to salinity and the only way to disperse is through contact between watercourses. Therefore, their evolutionary histories are inevitably linked to those of river basins. IP is rich in endemism, with around 80% of strictly freshwater species endemic. The same is observed in Portuguese continental waters with 10 Lusitanian endemisms recorded.

One of these is the arched-mouth nase, *Iberochondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980, a species with IUCN category CR- *Critically endangered*. It inhabits Mediterranean type shallow rivers and streams in the Tagus, Sado and Ribeiras do Oeste basins and has been monitored in urban environments, particularly in the Lage, Barcarena, Jamor, Lizandro, and Ota rivers. This monitoring show variability in the population structure between the various locations and years sampled. In some of the locations, exotic and invasive species were detected, and the shading recorded was considered reasonable, although not corresponding to the complexity of the riparian gallery. One of the known threats to Portuguese continental freshwater species is the degradation of habitats which, combined with reduced numbers, imposes the need for more immediate conservation measures that include ex situ reproduction. To this end, a conservation project was created with an environmental restoration aspect associated with captive reproduction in semi-naturalistic conditions. Reproduction under these conditions was successful, with a high production of offspring subsequently released in the breeders' places of origin. In order to understand the characteristics of the initial stages of life, the development of eggs and larvae of *I. lusitanicum* from a population of Sado reproduced in captivity was recorded. The embryonic and larval stages, as a whole, are relatively long, which leaves individuals vulnerable to disturbances and threats for longer. The different populations of *I. lusitanicum* are isolated in watercourses without contact and to clarify their phylogeographic relationships, a molecular analysis was carried out which confirmed that there are significant differences between two large groups: Tejo+Oeste and Sado, and the morphological analysis of the individuals was in agreement with the molecular differences found. Therefore, it is suggested that the Tejo+Oeste population be separated into a different species, *Iberochondrostoma tagensis*.

Índice

Agradecimentos	iii
Palavras-chave/Keywords	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de tabelas	x
Índice de figuras	xiv
Lista de abreviaturas	xx
Introdução	1
Capítulo I Monitorização em ambiente urbano	9
<i>Enquadramento</i>	9
<i>Material e Métodos</i>	11
<i>Resultados</i>	16
<i>Principais conclusões</i>	31
Capítulo II Contribuições para a reprodução <i>ex situ</i>	33
<i>Enquadramento</i>	33
<i>Material e Métodos</i>	38
<i>Resultados</i>	43
<i>Principais conclusões</i>	49
Capítulo III Desenvolvimento embrionário e larvar	53
<i>Enquadramento</i>	53
<i>Material e Métodos</i>	55
Ovos	57
Larvas.....	58

<i>Resultados</i>	60
Fase larvar	65
Larva recém eclodida	67
Desenvolvimento de estruturas de interesse	68
Alimentação/sistema digestivo	70
Olhos	71
Forma da cabeça	72
Vesículas auditivas	73
Bexiga natatória	74
Prega média (<i>Larval median fin fold</i>)	75
Flexão urostilar	75
Barbatanas	77
Raios das barbatanas	79
Formação de escamas	79
Pigmentação	80
Capacidade locomotora	81
<i>Principais conclusões</i>	82
Capítulo IV Análise molecular comparativa	85
<i>Enquadramento</i>	85
<i>Material e Métodos</i>	86
Extração e amplificação de ADN	87
Análise de dados	88
<i>Resultados</i>	89
<i>Principais conclusões</i>	98
Capítulo V Descrição de nova espécie	101
<i>Enquadramento</i>	101

<i>Material e Métodos</i>	101
Amostragem	101
Merística e Morfometria	103
Análise estatística	104
<i>Resultados</i>	104
<i>Iberochondrostoma tagensis</i> (nov. sp.)	107
Holótipo	107
Parátipos	107
Diagnóstico	107
Descrição	108
Padrão de pigmentação	109
Etimologia	109
Nome comum	109
Distribuição	109
Conservação	111
<i>Principais conclusões</i>	111
Discussão	113
Referências bibliográficas	129

Índice de tabelas

Capítulo I Monitorização em ambiente urbano

- Tabela 1.1. Coordenadas geográficas dos locais de amostragem em cada rio, nos quatro anos de amostragem. Estão assinalados os pontos onde se realizou a amostragem (✓) em cada ano----- 12
- Tabela 1.2. Valores de referência dos parâmetros físico-químicos medidos em cada ponto de amostragem. Adaptado de APA (2021) ----- 15
- Tabela 1.3. Comprimento, volume e área do troço amostrado em cada ponto de amostragem----- 17
- Tabela 1.4. Parâmetros físico-químicos dos habitats de *Iberochondrostoma lusitanicum*: resultados obtidos em cada ponto de amostragem nas várias campanhas de monitorização realizadas entre 2018 e 2021----- 19
- Tabela 1.5. Percentagens de ensombramento nos pontos de amostragem de *Iberochondrostoma lusitanicum*----- 21
- Tabela 1.6. Caracterização qualitativa da complexidade da galeria ripícola nos locais amostrados: 0 - galeria ausente, 1 - galeria uniforme (1 tipo de vegetação), 2 - galeria simples (2 a 3 tipos de vegetação), 3 - galeria complexa (4 ou mais tipos de vegetação) - ----- 22
- Tabela 1.7- Densidade média de peixes por unidade de volume em cada campanha de amostragem (n.º indivíduos/m³) - Os incrementos e decréscimos relativamente à campanha de amostragem anterior estão assinalados com setas ascendentes e descendentes, respectivamente----- 23
- Tabela 1.8. Número de indivíduos de *Iberochondrostoma lusitanicum* amostrados (n) por classe de tamanho (mm), obtido para cada local e ano de amostragem----- 25
- Tabela 1.9. Número de exemplares da espécie exótica e invasora lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii*) capturados nos locais de amostragem de *Iberochondrostoma lusitanicum*, nas campanhas de monitorização de 2018 a 2021---- 29

Capítulo II Contribuições para a reprodução *ex situ*

Tabela 2.1. Número de indivíduos fundadores dos *stocks* de reprodução *ex situ* de *Iberochondrostoma lusitanicum* entre 2009 e 2019----- 39

Tabela 2.2. Populações de *Iberochondrostoma lusitanicum* em reprodução no Aquário Vasco da Gama em cada ano do programa----- 44

Capítulo III Desenvolvimento embrionário e larvar

Tabela 3.1. Características e eventos ontogenéticos considerados de interesse na observação do desenvolvimento embrionário de *Iberochondrostoma lusitanicum*, adaptados de Faria et al. (2010) e Kimmel et al. (1995) ----- 58

Tabela 3.2. Periodicidade das observações do desenvolvimento larvar das duas posturas de *Iberochondrostoma lusitanicum* analisadas. As contagens são feitas em dias após a eclosão (DAE) ----- 59

Tabela 3.3. Características consideradas de interesse para a descrição da fase larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum* baseadas em Parichy et al. (2009) ----- 60

Tabela 3.4. Descrição dos ovos de *Iberochondrostoma lusitanicum* analisados: cor, transparência e forma ao longo dos primeiros nove dias após postura----- 62

Tabela 3.5. Dimensões e forma do saco vitelino durante a fase embrionária dos ovos da primeira e segunda posturas de *Iberochondrostoma lusitanicum*, com a indicação dos dias decorridos após a postura (DAP) ----- 63

Tabela 3.6. Eventos da fase embrionária de *Iberochondrostoma lusitanicum* com o dia após a postura (DAP) em que foram observados pela primeira vez (dia 0 a dia 9) ----- 64

Tabela 3.7. Marcos do desenvolvimento larvar da primeira postura de *Iberochondrostoma lusitanicum* seguindo a designação de Parichy et al. (2009) para a descrição das fases (Faseamento Composto) com indicação dos comprimentos standard (CS) e dos dias após a eclosão (DAE) correspondentes----- 69

Tabela 3.8. Marcos do desenvolvimento larvar da segunda postura de <i>Iberochondrostoma lusitanicum</i> seguindo a designação de Parichy et al. (2009) para a descrição das fases (Faseamento Composto) com indicação dos comprimentos standard (CS) e dos dias após a eclosão (DAE) correspondentes-----	70
---	----

Capítulo IV Análise molecular comparativa

Tabela 4.1. Populações de <i>Iberochondrostoma lusitanicum</i> analisadas: bacia e sub-bacia amostradas e respectivo número de amostras (N) para as quais foram obtidas sequências dos genes citocromo <i>b</i> e beta-actina -----	87
---	----

Tabela 4.2. <i>Primers</i> e condições de amplificação utilizados -----	88
---	----

Tabela 4.3. F_{ST} para os pares de populações analisados -----	94
---	----

Tabela 4.4. Número de amostras sequenciadas para o gene <i>cytb</i> , número de haplótipos e <i>sites</i> polimórficos encontrados, diversidade genética e nucleotídica e número médio de diferenças emparelhadas (<i>mean number of pairwise differences</i> - MNPD) para cada população-----	96
---	----

Tabela 4.5. Lista de autapomorfias em cada haplótipo de <i>Iberochondrostoma lusitanicum</i> e de <i>Iberochondrostoma</i> nov.sp. -----	97
--	----

Capítulo V Descrição de nova espécie

Tabela 5.1. Valores médios, variação e desvio padrão das variáveis merísticas e morfométricas registados para <i>Iberochondrostoma tagensis</i> nov. sp. e <i>Iberochondrostoma lusitanicum</i> (Sado). As abreviaturas estão listadas na secção Material e Métodos. As medições apresentam-se em mm-----	105
---	-----

Tabela 5.2. Resultados da análise discriminante <i>stepwise</i> para os dados merísticos. As variáveis com poder discriminante estão assinaladas com * -----	106
--	-----

Tabela 5.3. Resultados da análise discriminante realizada com os dados morfométricos. As variáveis com poder discriminante estão assinaladas com * -----	106
--	-----

Tabela 5.4. Valores médios e amplitude dos caracteres distintivos entre *Iberochondrostoma tagensis* e *Iberochondrostoma lusitanicum*. As setas indicam se o valor encontrado para *I. tagensis* é superior ou inferior ao encontrado para *I. lusitanicum*----- 108

Índice de figuras

Introdução

Capítulo I Monitorização em ambiente urbano

Figura 1.1. Localização dos pontos de amostragem onde foram efectuadas as monitorizações anuais de populações de *Iberochondrostoma lusitanicum*, em ambiente urbano: Barcarena (BAR1, BAR3), Lage (LAG1, LAG2, LAG4, LAG5), Jamor (J1, J2, J3, J4), Lizandro (LZD1, LZD2) e Ota----- 11

Figura 1.2. Temperaturas médias nos cursos de água amostrados----- 18

Figura 1.3. Número de indivíduos amostrados em cada local de amostragem, nos quatro anos da monitorização----- 23

Figura 1.4. Comprimentos médios obtidos até à furca, em milímetros, dos indivíduos amostrados por local e por ano de amostragem----- 24

Figura 1.5. Estrutura populacional da população de *Iberochondrostoma lusitanicum* da ribeira de Barcarena: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem----- 25

Figura 1.6. Estrutura populacional da população de *Iberochondrostoma lusitanicum* da ribeira da Lage: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem----- 26

Figura 1.7. Estrutura populacional da população de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Rio Jamor: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem----- 27

Figura 1.8. Estrutura populacional da população de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Rio Lizandro: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem----- 28

Capítulo II Contribuições para a reprodução *ex situ*

Figura 2.1. Tanque de reprodução de *Iberochondrostoma lusitanicum* (população do Sado) ----- 40

Figura 2.2. Maternidade usada para manter uma sub-amostra da postura da população de *Iberochondrostoma lusitanicum*, em 2021 (ver Cap. III) ----- 42

Figura 2.3. Número de indivíduos de *Iberochondrostoma lusitanicum* nascidos em cativeiro, por *stock* de reprodução e população----- 46

Figura 2.4. Censos anuais realizados para os quatro *stocks* da população de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Sado mantidos em cativeiro no AVG (2009-2013, 2013-2016, 2016-2019 e 2019-2023). O primeiro ano de cada *stock* corresponde ao número inicial de reprodutores e os restantes referem-se ao número total de indivíduos presentes no tanque no ano em questão (reprodutores e seus descendentes) ----- 47

Figura 2.5. Valores incrementais para a população de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Sado, entre gerações consecutivas, para os vários *stocks* de reprodução estabelecidos em cativeiro----- 48

Figura 2.6. Valores incrementais para a população de *Iberochondrostoma lusitanicum* em cativeiro da ribeira da Lage, para o segundo *stock* de reprodução, 2013-2016----- 49

Capítulo III Desenvolvimento embrionário e larvar

Figura 3.1. Ovos de *Iberochondrostoma lusitanicum* numa das meadas de lã colocadas no tanque----- 55

Figura 3.2. Vista do tanque de reprodução de *Iberochondrostoma lusitanicum* no Aquário Vasco da Gama (esquerda), onde é possível ver a estrutura circular que contém a maternidade (detalhe à direita) ----- 56

Figura 3.3. Variação da temperatura da água durante a fase embrionária para a primeira postura de *Iberochondrostoma lusitanicum*----- 61

Figura 3.4. Variação da temperatura durante a fase embrionária para a segunda postura de *Iberochondrostoma lusitanicum*----- 61

Figura 3.5. Evolução ovo/embrião de *Iberochondrostoma lusitanicum* na segunda postura (objectiva 2x, ampliação 20x) nos dias 0, 3, 5, 6 e 8 após a postura----- 65

Figura 3.6. Variação da temperatura da água do tanque ao longo da amostragem durante a fase larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*, para a primeira postura----- 66

Figura 3.7. Variação da temperatura da água do tanque ao longo da amostragem durante a fase larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*, para a segunda postura----- 66

Figura 3.8. Larva de *Iberochondrostoma lusitanicum* recém eclodida (esquerda) e detalhe da zona da barbatana peitoral já em formação (direita). É possível observar a forma da cabeça, o padrão de pigmentação inicial e a posição, forma e extensão do saco vitelino (CS= 6,4 mm; objectiva 2x- 20x ampliação na foto da larva e objectiva 4.8x- 48x ampliação no detalhe da barbatana peitoral) ----- 67

Figura 3.9. Evolução do sistema digestivo de *Iberochondrostoma lusitanicum*, desde a fase de redução do saco vitelino até ao surgimento de estômago e intestino funcionais (de cima para baixo e da esquerda para a direita). Todas as fotografias são tiradas com objectiva 2x (ampliação 20x) com excepção da foto do dia 0 que foi tirada com objectiva 1x (ampliação 10x) ----- 71

Figura 3.10. Evolução dos olhos durante o desenvolvimento embrionário (ovo dia 1, 3 e 5 AP) e larvar (larva dia 0 AE- 6,09 mm CS, dia 13 AE- 6,9 mm CS, dia 28 AE- 10 mm CS e dia 44 AE- 12,1 mm CS) de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Todas as fotografias foram registadas com a objectiva 2x (ampliação 20x) com excepção da do dia 44 que foi registada com objectiva 1x (ampliação 10x) ----- 72

Figura 3.11. Evolução da forma da cabeça das larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Dias 0, 2, 3 e 10 AE, com objectiva 2x (ampliação 20x) e nos dias 39 e 65 AE com objectiva 1x (ampliação 10x) ----- 73

Figura 3.12. Localização dos otólitos nas vesículas auditivas no momento da eclosão das larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum* com CS 6,09 mm (esquerda) e cinco dias após a eclosão, larva com CS 7,05 mm. Fotografias com objectiva 2x, ampliação 20x ----- 73

Figura 3.13. Evolução da bexiga natatória ao longo do desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*, com alteração de uma câmara para duas. Fotografias da esquerda com objectiva 1x, ampliação 10x; fotografias da direita com objectiva 2x, ampliação 20x----- 74

Figura 3.14. Larva de *Iberochondrostoma lusitanicum* recém eclodida com a prega média visível----- 75

Figura 3.15. Alterações na prega média, flexão urostilar e evolução das barbatanas caudal e anal em larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum* com CS entre 6,10 mm (0 DAE) e 15,68 mm (53 DAE). De cima para baixo, CS 6,1 mm, 7,05mm, 7,31 mm, 8,84 mm, 11,88 mm e 15,68 mm (objectiva 1x, ampliação 10x) ----- 76

Figura 3.16. Barbatanas peitorais numa larva de *Iberochondrostoma lusitanicum* com 6,20 mm CS, no primeiro dia após a eclosão (vista ventral), com objectiva 2x e ampliação 20x----- 77

Figura 3.17. Surgimento da barbatana dorsal nas larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Fotografias de cima e de baixo, à esquerda tiradas com objectiva 2x-ampliação 20x; foto de baixo, à direita tirada com objectiva 1x, ampliação 10x----- 78

Figura 3.18. Evolução das barbatanas pélvicas de *Iberochondrostoma lusitanicum*. De cima para baixo e da esquerda para a direita: 6,87 mm CS; 12,86 mm CS; 13,78 mm CS; 14,12 mm CS; 16,63 mm CS e 19,78 mm CS----- 79

Figura 3.19. Exemplo do padrão de pigmentação em losango observado nas escamas, no final do desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Larva com CS 23,0 mm e 92 dias após eclosão (objectiva 1x, ampliação 10x) ----- 80

Figura 3.20. Exemplo de alterações da pigmentação ao longo do desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*. As duas fotografias de cima foram tiradas com objectiva 2x (ampliação 20x) e as duas fotografias de baixo com objectiva 1x (ampliação 10x) ----- 81

Capítulo IV Análise molecular comparativa

Figura 4.1. Populações de *Iberochondrostoma lusitanicum* amostradas para a análise molecular (genes *cytb* e *bact*) ----- 86

Figura 4.2. Rede de haplótipos do gene nuclear beta-actina obtida para *Iberochondrostoma lusitanicum*. Os haplótipos assinalados com * foram codificados seguindo o método descrito na secção “Material e Métodos” ----- 90

Figura 4.3. Rede de haplótipos do gene mitocondrial *cytb* obtida para *Iberochondrostoma lusitanicum* ----- 92

Capítulo V Descrição de nova espécie

Figura 5.1. Localização dos pontos de captura da série tipo de *Iberochondrostoma tagensis*, na ribeira da Lage, e do conjunto comparativo de *Iberochondrostoma lusitanicum*, na ribeira de Grândola----- 102

Figura 5.2. Representação dos detalhes morfométricos registados para *Iberochondrostoma tagensis* (nov. sp.). 1- Comprimento pré-orbital, 2- comprimento da cabeça, 3- diâmetro do olho, 4- comprimento pré-dorsal, 5- comprimento pré-anal, 6- comprimento standard, 7- altura da cabeça, 8- comprimento das barbatanas pélvicas, 9- altura pré-dorsal, 10- altura pré-anal, 11- altura do pedúnculo caudal----- 103

Figura 5.3. Holótipo de *Iberochondrostoma tagensis*, da Ribeira da Lage, bacia do Tejo inferior. Oeiras, Lisboa, Portugal. Referência CLL21. CS=61.9 mm----- 107

Figura 5.4. Distribuição de *Iberochondrostoma tagensis* (azul) e *Iberochondrostoma lusitanicum* (verde). 1 - Tejo-Alviela; 2 - Tejo-Maior; 3 - Tejo-Ota; 4 - Tejo-Grande da Pipa; 5 - Tejo-Trancão; 6 - Tejo-Muge; 7 - Tejo-Sorraia; 8 - Tejo-Coina; 9 - Lizandro; 10 - Samarra; 11 - Colares; 12 - Caparide; 13 - Lage; 14 - Barcarena; 15 - Jamor; 16 - Sado-Marateca; 17 - Sado-São Martinho; 18 - Sado-Alcáçovas; 19 - Sado-Xarrama; 20 - Sado-Odivelas; 21 - Sado-Roxo; 22 - Sado-Grândola; 23 - Sado-Corona; 24 - Sado-Campilhas; 25 - Melides; 26 - Junqueira. (*) sub-bacias onde foram detectadas introgressões para o gene mitocondrial cytb----- 110

Lista de Abreviaturas

AC - altura da cabeça

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

APC - altura do pedúnculo caudal

APrA - altura pré-anal

APrD - altura pré-dorsal

AVG – Aquário Vasco da Gama

Bact - beta- actina

CBP - comprimento das barbatanas pélvicas

CC - comprimento cabeça

CPrA - comprimento pré-anal

CPrD - comprimento pré-dorsal

CPrOr - comprimento pré-orbital

CS - comprimento standard

Cytb - citocromo *b*

DO - diâmetro olho

ELL - escamas linha lateral

ELLAb - escamas abaixo da linha lateral

ELLAc - escamas acima da linha lateral

F_{ST} – Índice de diferenciação genética

INAG – Instituto da Água

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

MNHNC - Museu Nacional de História Natural e da Ciência

MNPD – Mean number of pairwise differences

P.I. – Península Ibérica

RA - raios barbatana anal (RAe- raios espinhosos e RAr- raios ramificados)

RD - raios barbatana dorsal (RDe- raios espinhosos e RDr- raios ramificados)

SNIRH - Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos

Introdução

Nas últimas décadas tem vindo a ser registada uma elevada perda de biodiversidade em todos os ecossistemas (WWF, 2020), cujos efeitos são agravados pelas alterações climáticas que inegavelmente têm vindo a ocorrer (e.g. Weiskopf et al., 2020). Os ecossistemas de água doce, apesar de terem uma importância fundamental, ocupam uma área relativamente pequena do globo (Tickner et al., 2020), são particularmente sensíveis (Dudgeon et al., 2006) e estima-se que a perda de biodiversidade nestes ambientes seja mais elevada do que nos ambientes terrestres (Costello, 2015), com uma em cada três espécies de água doce em risco de extinção (Collen et al., 2014; WWF, 2020).

A Península Ibérica (P.I.) está isolada do resto da Europa desde o levantamento dos Pirenéus a Nordeste da península (Doadrio & Carmona, 2004), o que condicionou de forma determinante a evolução da ictiofauna de água doce deste território (Miqueleiz et al., 2022). Existem duas teorias principais para a origem das espécies ibéricas, uma que aponta para uma colonização antiga da P.I. através da Europa Central (“*northern-dispersal hypothesis*”; Banareescu, 1973) e outra que sugere uma colonização mais recente através de uma rede lacustre existente na actual região do Mediterrâneo, numa fase designada por Lago Mare (“*southern sea-dispersal hypothesis*”; Bianco, 1990). Estas teorias não se excluem mutuamente, e podem ter contribuído ambas para explicar a colonização da P.I. por diferentes linhagens de peixes dulciaquícolas (Bănărescu & Coad, 1991; Robalo, 2007). Estes autores propuseram que os ciprinídeos europeus terão tido origem na Ásia e que terão seguido duas vias diferentes de colonização, uma pelo norte e a outra pelo sul, e que terão dado origem às espécies agora endémicas das áreas mediterrâneas. Independentemente da forma de colonização, chegaram à P.I. três linhagens principais de leuciscídeos, uma que deu origem às espécies do género *Squalius*, outra as espécies dos géneros *Achondrostoma*, *Pseudochondrostoma*, *Iberochondrostoma* e *Parachondrostoma* e a terceira deu origem ao género *Anaecypris* (Robalo, 2007). Como já foi referido, estas linhagens ficaram isoladas das restantes espécies europeias desde a formação da cadeia montanhosa dos Pirenéus, cuja presente configuração foi atingida no Miocénico (Muñoz et al., 1986; Puigdefàbregas et al., 1992; Stange et al., 2016).

A actual rede hidrográfica da P.I. é relativamente recente (durante o Pleistocénico, entre 2,6 e 1,8 M.a.) e, embora actualmente os rios ibéricos escoem para o Atlântico ou para o Mediterrâneo, nem sempre foi o caso. As condições climáticas na P.I. durante o Miocénico (entre 11,6 e 3,6 M.a.) seriam semi-áridas a subtropicais, com longas estações secas e com bacias, predominantemente, endorreicas que potenciaram a acumulação de sedimentos (Cunha et al., 2005; Pais et al., 2012). Apesar da evolução de todas as bacias endorreicas seguir as mesmas fases - enchimento sedimentar, alteração de escoamento endorreico para exorreico e erosão de vales fluviais (Alonso-Zarza et al., 2002; Gutiérrez-Elorza et al., 2002; Pais et al., 2012) - na P.I. nem todas tiveram uma evolução síncrona. Nas bacias da zona oriental da península a evolução foi anterior à das bacias da zona mais ocidental, da costa Atlântica (De Vicente et al., 2011). Entre o Pliocénico e o Pleistocénico inferior, alterações geológicas conjugadas com alterações do regime climático (de árido para húmido), levaram a modificações nas bacias (Pais et al., 2012; Pimentel & Azevedo, 1990), que resultaram no escoamento exorreico das mesmas.

Exemplos desta evolução das bacias são a bacia do Tejo Inferior e bacia de Alvalade (localizada na actual zona terminal da bacia do rio Sado). O enchimento da bacia do Tejo inferior corresponde, no Paleogénico, a um escoamento endorreico, enquanto no Neogénico o escoamento da bacia era feito de nordeste para sudoeste, isto é, um regime exorreico. Entre o Miocénico e o Pliocénico esse regime sofreu uma alteração, devido a movimentos tectónicos, tornando-se endorreico, mas no final do Pliocénico, com o estabelecimento de um clima mais quente e húmido, o sistema retomou o escoamento exorreico (Cunha et al., 2005; Pais et al., 2012). No caso da bacia de Alvalade, esta está separada da bacia do Tejo inferior por uma formação geológica do Paleozóico que só foi transposta pelo rio Sado durante o Quaternário (Pais et al., 2012). Entre o Pliocénico e o Pleistocénico inferior, a placa ibérica sofreu um fenómeno de levantamento e basculamento para sudoeste que, juntamente com o regime climático mais húmido que existia nesta época, contribuíram para a alteração do regime de escoamento das bacias de endorreico para exorreico, passando estas, no Pleistocénico, a drenar para o Atlântico e estabelecendo-se assim o sistema de drenagem moderno (Cunha et al., 2019; De Vicente et al., 2011; Pais et al., 2012; Pimentel & Azevedo, 1990). Posteriormente, as bacias do Tejo inferior e de Alvalade foram também sujeitas a períodos de transgressão e regressão marinhas, tornando possível a confluência de linhas de água nas zonas de foz em períodos de regressão marinha (Pais et al., 2012) e redução dos habitats estritamente dulciaquícolas

a áreas de menor dimensão por intrusão da cunha salina em períodos de intensa transgressão marinha.

Todos estes factores têm vindo a produzir profundas alterações na paisagem, o que influencia também as possíveis rotas de dispersão e isolamento das espécies ao longo do tempo (Sousa-Santos et al., 2019). Mais concretamente, as vias de dispersão dulciaquícola podem ter surgido ou desaparecido em consequência de eventos paleogeomorfológicos e/ou paleoclimáticos como a captura fluvial, a confluência de fozes em épocas de regressão marinha, o contacto entre cabeceiras por erosão remontante, o deslizamento tectónico de blocos com inversão do sentido do escoamento fluvial ou o *overspill* de bacias endorreicas em épocas de elevada pluviosidade (Alonso-Zarza et al., 2002; Casas-Sainz & de Vicente, 2009; De Vicente et al., 2011; Garcia-Castellanos et al., 2003; Gutiérrez-Elorza et al., 2002; Pais et al., 2012). Estes factores podem igualmente justificar, sobretudo os que impuseram o isolamento de linhagens em áreas geográficas restritas, o número relativamente elevado de endemismos existentes na P.I. e noutras penínsulas meridionais (Robalo, 2007).

Ao contrário das espécies migradoras, as espécies de peixes dulciaquícolas, às quais é atribuída a tipologia residente em território ibérico, são incapazes de colonizar outros rios por via marítima, por serem peixes primários e, em consequência, intolerantes à salinidade. Por isso, após a colonização da P.I., a dispersão destes peixes por todo o território estaria bastante limitada ou mesmo impossibilitada por vias marinhas ou terrestres, não só pela sua intolerância fisiológica, como também pelas características “insulares” dos rios e ribeiros (Bianco, 1990). No entanto, a dispersão dos peixes primários por todo o território ibérico foi possível devido a condições muito particulares, de origem tectónica, orogénica e/ou climatérica, que resultaram no surgimento de vias dulciaquícolas passíveis de serem utilizadas por estes peixes como é o caso, por exemplo, de capturas de rios, reversões fluviais, contactos entre fozes em períodos de regressão marinha, ou contacto entre afluentes geograficamente próximos (Coelho et al., 2005; Robalo, 2007; Sanjur et al., 2003; Sousa-Santos et al., 2019; Sousa-Santos, Gante, et al., 2014). O último período glacial no Pleistocénico, por exemplo, devido à acentuada regressão marinha (Dias et al., 1997), terá permitido a dispersão de espécies entre rios actualmente isolados, através dos extensos deltas e confluência de fozes que se formaram nos troços terminais das bacias, por recuo da linha de costa.

Além das características físicas e morfológicas do território que tanto condicionaram a história evolutiva da ictiofauna nativa no passado, as actuais condições climatológicas e meteorológicas, têm uma importante contribuição na distribuição das espécies. As variações sazonais dos caudais nos cursos de água são características dos rios de regime mediterrânico, mais frequentes no sul do país (INAG, 2008). O clima mediterrânico caracteriza-se por uma sazonalidade nos padrões de pluviosidade e de temperatura, com Invernos frios com precipitação alta e Verões secos e com temperaturas elevadas (e.g. Bonada & Resh, 2013). A variação anual da precipitação é importante nestas regiões, pois define o ano hidrológico em causa: seco, normal ou húmido (Bonada & Resh, 2013). Com efeito, os rios de regime mediterrânico sofrem alterações sazonais do caudal bastante expressivas, com cheias nos meses de maior pluviosidade e secas nos meses estivais, em que estes cursos de água ficam muitas vezes reduzidos a pequenos pegos (Feio & Ferreira, 2019). Aqui, os organismos estão sujeitos a um volume de água mais reduzido, a uma temperatura da água mais elevada e uma concentração mais baixa de oxigénio, o que potencia interações bióticas como a competição por espaço ou alimento, a predação e aumento da exposição a agentes patogénicos, podendo introduzir alterações físicas e comportamentais aos indivíduos (Magoulick & Kobza, 2003). Como consequência, a conectividade das comunidades piscícolas que os habitam encontra-se limitada no Verão, sendo restabelecida quando o regime hidrológico o permite. Estas oscilações na conectividade têm impacto nas histórias vitais das espécies e mesmo no seu *pool* genético (Magalhães et al., 2003; Sousa-Santos, Robalo, et al., 2014).

No actual cenário de alterações climáticas, e em conjunto com o impacto antropogénico (p. ex. poluição, extracção de água e a alteração de habitats), prevê-se que as características sazonais destes rios sejam exacerbadas, com períodos de seca e de cheias mais extremos. Isto aumenta a importância do estudo das espécies que habitam estes cursos de água, pois mesmo estando adaptadas a estes regimes, podem sofrer ameaças adicionais ou agravamento para condições mais extremas. A fauna piscícola de água doce da Península Ibérica é rica em endemismos - 80% das espécies nativas estritamente dulciaquícolas são endémicas (Doadrio et al., 2011) - e o mesmo se verifica para as águas continentais portuguesas, com 10 endemismos lusitânicos registados, cerca de 23% da fauna piscícola nativa portuguesa (Collares- Pereira et al., 2021; Feio & Ferreira, 2019; Rogado et al., 2005) - *Lampetra alavariensis* Mateus, Alves, Quintella & Almeida 2013, *Lampetra auremensis* Mateus, Alves, Quintella & Almeida 2013,

Lampetra lusitanica Mateus, Alves, Quintella & Almeida 2013 (Mateus et al., 2013), *Achondrostoma occidentale* Robalo, Almada, Sousa Santos, Moreira & Doadrio 2005, *Achondrostoma oligolepis* Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat 2005, *Iberochondrostoma almakai* Coelho, Mesquita & Collares-Pereira 2005, *Iberochondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980, *Iberochondrostoma olisiponense* Gante, Santos & Alves 2007, *Squalius aradensis* Coelho, Bogutskaya, Rodrigues & Collares-Pereira 1998 e *Squalius torgalensis* Coelho, Bogutskaya, Rodrigues & Collares-Pereira 1998 (Rogado et al., 2005). Do ponto de vista das categorias de ameaça, das espécies endémicas de Portugal, três são *Criticamente em Perigo* – CR- (*L. auremensis*, *L. lusitânica*, *A. occidentale*), uma *Pouco Preocupante* (*A. oligolepis*) e seis são consideradas *Em Perigo* (*L. alavariensis*, *I. almakai*, *I. lusitanicum*, *I. olisiponense*, *S. aradensis*, *S. torgalensis*) segundo a mais recente revisão taxonómica do Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Migradores de Portugal Continental (Magalhães et al., 2023). As principais ameaças tradicionalmente listadas para estas espécies são: poluição, introdução de espécies exóticas, sobre-exploração, alteração do fluxo e destruição ou degradação de habitats (Dudgeon et al., 2006). No entanto, Reid et al. (2019) actualizou esta lista com 12 ameaças emergentes adicionais: alterações do clima; comércio digital e espécies invasoras; doenças infecciosas; *blooms* de algas nocivas; aumento de infraestruturas hidroelétricas; novos contaminantes; nano-materiais de produção humana; poluição por microplásticos, luz e ruído; salinização; decréscimo de cálcio e o efeito cumulativo de vários factores de pressão.

Apesar de estarem descritos 10 endemismos para os cursos de água continentais portugueses (Collares- Pereira et al., 2021; Rogado et al., 2005), o conhecimento sobre estas espécies é heterogéneo, nomeadamente sobre aspectos da sua ecologia, histórias vitais, distribuição ou genética das populações. Estas lacunas no conhecimento representam uma limitação ao delineamento e implementação de medidas de conservação adequadas a cada espécie. Torna-se imperativo colmatar estas lacunas antes que seja tarde e que os efectivos populacionais diminuam para valores críticos, que ameacem a sobrevivência da espécie. Esta tese tem como objectivo geral colmatar essas lacunas para uma das espécies endémicas de Portugal, com estatutos de ameaça IUCN *Criticamente em Perigo* - CR (A2ce+3ce+4ce) e nacional *Em Perigo*, e que ocorre em rios do centro do país de regime marcadamente mediterrânico (Feio & Ferreira, 2019; INAG, 2008; Robalo, Doadrio et al., 2007) - a boga-portuguesa *Iberochondrostoma lusitanicum*.

A boga-portuguesa foi inicialmente descrita por Collares-Pereira (1980) com o nome *Chondrostoma lusitanicum* e foi incluída na família Cyprinidae. Recentemente, após uma revisão taxonómica, passou, juntamente com outras espécies, para a família Leuciscidae (Chen & Mayden, 2009; Schönhuth et al., 2018). Esta espécie endémica apresenta um comprimento total inferior a 15 cm, com uma forma alongada. As escamas têm um tamanho médio e possui uma boca arqueada com lábios finos. A maxila superior está mais desenvolvida que a inferior, a comissura localiza-se claramente à frente da borda anterior do olho. No que concerne às branquias, são de tamanho reduzido e em grande número. Possui 6 dentes faríngeos do lado esquerdo e 5 do lado direito, dispostos numa só fileira. Estes são planos, com coroas oblíquas e não denticulados. Relativamente às barbatanas, a dorsal e a anal possuem um tamanho médio muito semelhante, ambas com 6 a 8 raios, sendo que a primeira está inserida ligeiramente antes das barbatanas pélvicas; os lóbulos da barbatana caudal são arredondados (Collares-Pereira, 1980, 1983b). A coloração da região dorsal é um pouco mais escura que no resto do corpo e apresenta pontuações negras (Collares-Pereira, 1980). A linha lateral é sempre pigmentada (Collares-Pereira, 1980) e apresenta entre 43 e 53 escamas com cânula, 9,5 a 12 escamas acima da linha lateral e 6 a 8 abaixo (Collares-Pereira, 1983b). Possui um cariótipo $2n=50$ e a sua fórmula de cariótipo haplóide é $7M: 15SM:3^a$ (Collares-Pereira, 1983a; Rodrigues & Collares-Pereira, 1996).

Encontra-se distribuída pelas bacias hidrográficas do Lizandro, Samarra, Colares, Jamor, Barcarena, Lage, Tejo, Sado, Melides, Junqueira (Collares-Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2009) e, mais recentemente, confirmada a presença na ribeira de Caparide (Sousa-Santos, Com. Pess.). Habita rios e ribeiros pouco profundos com caudal médio do tipo mediterrâneo, com vegetação nas margens (Alves & Coelho, 1994), e sobrevive à fragmentação dos cursos de água no Verão em pegos à sombra de vegetação (Robalo et al., 2009). Nos locais onde está presente, esta espécie está sujeita a diferentes tipos de ameaça, entre os quais poluição das linhas de água, extracção de água para rega de culturas agrícolas, espécies exóticas e degradação do habitat (Collares-Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2009). Como resultado da tipologia dos rios que habita e das pressões a que está sujeita, esta espécie encontra-se muito fragmentada e com graves reduções no seu tamanho, podendo ocorrer a extinção local de populações por factores estocásticos como um episódio agudo de poluição ou depleção drástica do teor de oxigénio dissolvido para níveis fisiologicamente letais (Mesquita et al., 2001; Rogado et al., 2005). Apesar de

ainda não existirem dados acerca da ecologia trófica desta espécie, é expectável que tenha o mesmo tipo de alimentação que espécies do mesmo género *Iberochondrostoma*, ecologicamente próximas, consumindo assim algas, detritos, zooplâncton e macroinvertebrados aquáticos (Collares- Pereira et al., 2021).

A época de reprodução da boga-portuguesa está descrita como sendo entre Abril e Maio (Robalo et al., 2009), mas é possível a ocorrência de posturas desde Março (obs. pessoal). Segundo a descrição do comportamento reprodutor de *I. lusitanicum* feita por Carvalho et al. (2003), a reprodução inicia-se com um aumento dos movimentos e das interações entre machos e fêmeas e com a fêmea a ser seguida por um ou mais machos, sem que haja registo de comportamentos agonísticos entre estes. Estas sequências nupciais ocorrem a poucos centímetros do substrato e terminam ou com o afastamento do(s) macho(s) ou em desova: esta ocorre após a fêmea ser pressionada contra o substrato, pedras ou aglomerados de plantas aquáticas, por um ou mais machos que mantêm o corpo comprimido lateralmente contra o corpo da fêmea (Carvalho et al., 2003). Uma das características destes ovos é a capacidade de aderirem ao substrato, vegetação ou rochas (Carvalho et al., 2003), o que possibilita a sua manutenção no local de postura e impede que sejam arrastados pela corrente. Em locais onde ocorram em simpatria, a boga-portuguesa pode gerar híbridos com *I. olisiponense* (Sousa-Santos, Gante, et al., 2014).

Os objectivos específicos deste trabalho são abordados ao longo de cinco capítulos, enquadrados por uma introdução geral e uma discussão onde se salientam as principais contribuições desta tese. Em cada capítulo encontra-se ainda um enquadramento teórico específico para cada temática a abordar.

Na área de distribuição considerada existem cursos de água de várias dimensões e com diferente impacto antropogénico. Para perceber o efeito das populações humanas nas populações de boga-portuguesa tem vindo a ser feita uma monitorização regular em ambientes urbanos e, neste trabalho, são apresentados os resultados das monitorizações entre 2018 e 2021 (CAPÍTULO I).

O evidente decréscimo do efectivo populacional desta espécie e o reconhecimento das ameaças às suas populações levou a que, desde 2007 se tivesse recorrido à reprodução em cativeiro. Em condições ambientais adversas, o recurso a este método é, muitas vezes, uma medida necessária para populações com números de efectivos muito baixos, baixa diversidade genética e/ou condições físicas do habitat inadequadas (Bentsen & Olesen, 2002; Maitland & Morgan, 2002; Sousa et al., 2008). A reprodução em cativeiro é uma

ferramenta de conservação *ex situ* que se define pela reprodução de espécies fora do seu habitat natural (Frankham et al., 2010) e é uma medida que, idealmente, se utiliza somente em último recurso, quando é impossível a sobrevivência da espécie no meio natural. Os resultados da reprodução *ex situ* de boga-portuguesa, assim como a metodologia utilizada, encontram-se no CAPÍTULO II. Neste âmbito, tornou-se imprescindível compreender as várias fases do desenvolvimento embrionário e larvar (CAPÍTULO III) para perceber quais as fases mais sensíveis da ontogenia da espécie.

Já antes desta tese começar a ser desenvolvida foram publicadas evidências que sugeriam a existência de uma espécie por descrever, incluída até agora sob a designação de boga-portuguesa (Robalo, Doadrio et al., 2007). Para deslindar esta componente taxonómica foi necessário recorrer a técnicas moleculares incluindo indivíduos representativos da área de distribuição desta espécie, que se encontram detalhados no CAPÍTULO IV. Além dos dados moleculares, foram também utilizados dados morfométricos e merísticos que permitiram confirmar a existência de uma nova espécie, *Iberochondrostoma tagensis*, e a sua descrição encontra-se no CAPÍTULO V.

Capítulo I – Monitorização em ambientes urbanos

Enquadramento

A boga-portuguesa é endémica de uma área relativamente pequena do Centro-Oeste de Portugal, que compreende maioritariamente o baixo Tejo e Sado e ribeiras adjacentes (Collares- Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2009). Um grupo significativo destas ribeiras está localizado em zonas urbanas com grande densidade populacional. Por esta razão considerou-se necessário acompanhar o estado biológico destas populações realizando anualmente monitorizações pós estivais. A monitorização do estado destas populações é de vital importância, uma vez que esta, assim como outras espécies nativas, sofrem todos os anos constrangimentos à sua área de ocorrência e habitat disponível, resultantes da diminuição de caudal que ocorre no Verão (INAG, 2008a). Estas alterações podem levar à diminuição do efectivo populacional, quer por dificuldade em encontrar habitat adequado para permanência ou para desova, quer pelo aumento da exposição a predadores (Beja, 1996; Ilhéu et al., 2007).

No caso dos rios em ambiente urbano, existe uma pressão acrescida decorrente da presença humana. Estes ambientes tendem a ter um grande aporte de poluentes e contaminantes que podem debilitar a condição física e, em último caso, levar à morte (e.g. Poulin, 1992) de indivíduos em diferentes fases do desenvolvimento. Dependendo do poluente e da espécie de peixe, as fases iniciais são potencialmente mais susceptíveis (Solomon et al., 2013). A exposição a quantidades elevadas de determinados poluentes, herbicidas e insecticidas, tem vindo a revelar-se comprovadamente nociva para várias espécies de peixes, inclusivamente a nível genómico e para o desenvolvimento ontogenético (e.g. Carrola et al., 2014; A. R. B. Lima et al., 2019). Além disso, o microbioma e a carga de nutrientes dos efluentes urbanos potenciam o estabelecimento de agentes patogénicos, como, por exemplo, *Aeromonas sp.* (Colin et al., 2021; Ory et al., 2016), o que constitui um factor adicional de ameaça para estas espécies, particularmente em ambientes com uma forte presença humana.

Segundo a Diretiva Quadro da Água (Comissão Europeia, 2000), “estado ecológico” é definido como “a expressão da qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos associados às águas de superfície”. Estes ecossistemas aquáticos só podem ser assim considerados se se tratar de massas de água não modificadas ou com

reduzidos níveis de alteração antrópica. Em alternativa devemos referir-nos a “potenciais ecológicos” quando já não é possível recuperar o seu estado pristino (Feio & Ferreira, 2019). Este estado (ou potencial) ecológico, em cada momento de monitorização, é estabelecido com recurso a um conjunto de parâmetros biológicos, físico-químicos e hidromorfológicos que podem ser monitorizados e comparados com os critérios de referência estabelecidos. Na plataforma SNIRH (Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos-<https://snirh.apambiente.pt/>) são disponibilizados alguns dados de monitorizações realizadas pela APA (Agência Portuguesa do Ambiente).

O azoto é um elemento de extrema importância para os organismos e as suas várias formas e interações no seu ciclo são fundamentais para diversos processos biológicos (Zhang et al., 2020). Isto torna-o um elemento cuja monitorização é fulcral também nos ecossistemas fluviais. O crescente aporte de azoto proveniente da agricultura e outras actividades humanas pode perturbar o seu equilíbrio nos sistemas e afectar a sua capacidade de transformação (Zhang et al., 2020). Assim, torna-se fundamental monitorizar os valores de algumas das suas formas como são a amónia, os nitratos e os nitritos. A monitorização dos níveis de fósforo e fosfatos é particularmente importante em zonas com agricultura e pecuária na envolvente das linhas de água, pois muitos dos fertilizantes utilizados naquela actividade, além dos resíduos orgânicos da pecuária, possuem fósforo na sua composição e a escorrência para as linhas de água é inevitável (Mallin & Cahoon, 2020). A utilização de testes colorimétricos é uma forma simples e pouco dispendiosa de medir estes parâmetros físico-químicos, além de possibilitar a reprodução da metodologia em qualquer rio, permitindo uma comparabilidade de resultados mesmo sendo o registo efectuado por diferentes pessoas, e em diversos contextos espaciais e temporais.

Além da caracterização biológica, física e química do habitat de *I. lusitanicum*, também são importantes as informações que dizem respeito a algumas das pressões mais comuns, como são a presença de espécies exóticas invasoras, a extração de água para utilização humana e a presença de actividades poluentes nas margens (C. S. Lima et al., 2022).

Apesar do registo de alguma informação complementar no que diz respeito a variáveis físico-químicas e hidromorfológicas, o foco deste capítulo incide na caracterização das populações de *I. lusitanicum* em ambiente urbano.

Material e Métodos

A metodologia aqui descrita segue os manuais de amostragem desenvolvidos pelo INAG para a fauna piscícola (INAG, 2008a) e para a caracterização abiótica (INAG, 2008b), bem como o procedimento descrito no relatório do projecto AQUARIPORT (Oliveira et al., 2007). As amostragens foram realizadas anualmente, no período pós estival (Setembro), de modo a aferir a condição das populações após os meses mais críticos no que respeita às condições de habitat, nomeadamente: menor disponibilidade de água e temperaturas elevadas (características do regime mediterrânico - ver Introdução).

No que concerne à distribuição da boga-portuguesa, as bacias/sub-bacias localizadas em ambiente urbano monitorizadas entre 2018 e 2021 foram as seguintes: Lage, Jamor, Barcarena, Lizandro e Ota (Figura 1.1).

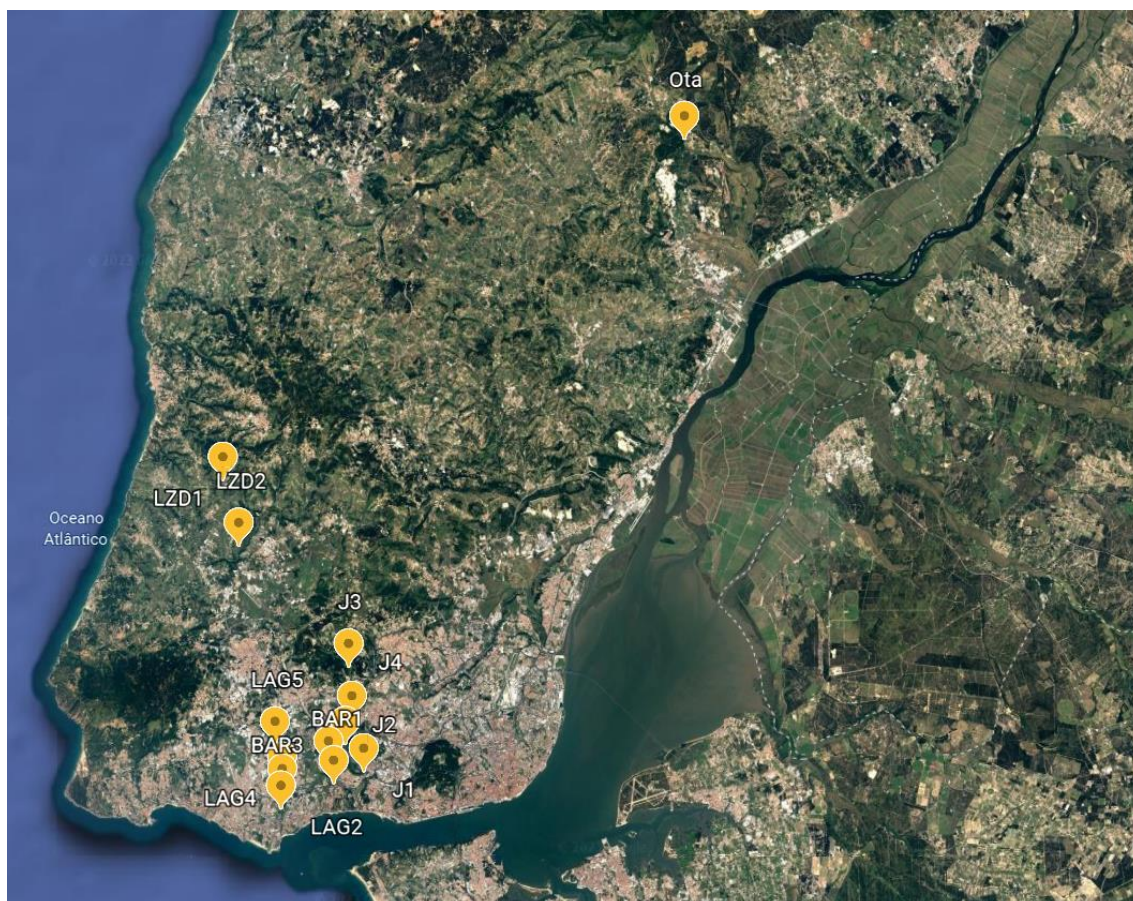


Figura 1.1- Localização dos pontos de amostragem onde foram efectuadas as monitorizações anuais de populações de *Iberochoondrostoma lusitanicum*, em ambiente urbano: Barcarena (BAR1, BAR3), Lage (LAG1, LAG2, LAG4, LAG5), Jamor (J1, J2, J3, J4), Lizandro (LZD1, LZD2) e Ota.

Os locais a monitorizar foram escolhidos de acordo com a sua acessibilidade, adequabilidade à prática da pesca elétrica (locais com pouca profundidade de água e largura reduzida) e condições para a retenção de água na época seca, fornecendo refúgio às espécies aí existentes. Sempre que possível, foi escolhido um mínimo de dois locais de amostragem em cada rio. Em alguns anos, não foi possível realizar a amostragem nos locais escolhidos por estes não cumprirem temporariamente os requisitos. Para alguns foi possível encontrar um local alternativo, mas não para todos, o que resultou em anos com somente um ponto de amostragem em determinado rio (Tabela 1.1).

Tabela 1.1

Coordenadas geográficas dos locais de amostragem em cada rio, nos quatro anos de amostragem. Estão assinalados os pontos onde se realizou a amostragem (✓) em cada ano.

		Latitude	Longitude	2018	2019	2020	2021
Barcarena	BAR1	38.713965	-9.273301	✓	✗	✓	✓
	BAR3	38.725869	-9.27741	✓	✓	✓	✗
Lage	LAG1	38.70875	-9.313988	✓	✓	✓	✓
	LAG2	38.698288	-9.315029	✓	✗	✗	✗
	LAG4	38.716143	-9.314012	✓	✗	✗	✗
	LAG5	38.738086	-9.3196	✗	✓	✓	✗
Jamor	J1	38.721546	-9.249361	✓	✓	✗	✓
	J2	38.73851	-9.263871	✓	✗	✗	✗
	J3	38.786415	-9.261368	✗	✗	✓	✓
	J4	38.75403	-9.258702	✗	✗	✓	✗
Lizandro	LZD1	38.901504	-9.361733	✗	✓	✓	✓
	LZD2	38.86085	-9.348873	✗	✓	✓	✓
Ota	OTA3	39.112543	-8.994873	✗	✗	✓	✗

A monitorização do estado das populações de peixes nativos e seus habitats foi realizada no fim do período estival (em Setembro, imediatamente antes das primeiras chuvas) e incluiu a captura, através de pesca elétrica, de indivíduos pertencentes à espécie *I. lusitanicum* e sua caracterização morfométrica. Esta recolha foi realizada por operadores com licenças emitidas pelo ICNF (Licenças n.º. 390/2021/CAPT e n.º. 388/2021/CAPT; credenciais de pesca n.º. 59/2021 e n.º. 57/2021).

A captura de peixes com recurso a pesca elétrica é um método de captura activo e selectivo, com comprovada eficácia em habitats fluviais, aplicado em todas as amostragens de ictiofauna dulciaquícola realizadas pela equipa MARE-ISPA desde 2002. Com esta técnica de amostragem, o operador progride ao longo do leito do rio descrevendo transectos em ziguezague entre as duas margens (de modo a cobrir todos os microhabitats), munido de um aparelho portátil (SAMUS®, modelo 725G), e coadjuvado por, pelo menos, um técnico auxiliar. Este aparelho tem uma bateria de 12V como fonte de alimentação e está ligado a três cabos, um (positivo) ligado à vara de pesca com camaroeiro manejada pelo operador, outro que permanece sempre submerso (negativo) e, finalmente, o terceiro que tem um interruptor de segurança controlado pelo operador e que permite o corte imediato da corrente, caso seja necessário. O campo eléctrico é gerado de modo intermitente, tendo a corrente pulsada um máximo de 600 watts (ver detalhes do procedimento em <http://www.electro-fisher.com>). Com a criação de um campo eléctrico momentâneo, os organismos ficam atordoados e emergem à superfície, permitindo a sua recolha com um camaroeiro e colocação em baldes com água fresca e oxigenada, onde permanecem até ao seu processamento. Algumas medidas de segurança aplicadas são a realização dos transectos no sentido jusante-montante (minimizando o risco de queda dos operadores e permitindo também uma maior eficácia na captura); a prospecção de troços de baixa profundidade (<1,40m) e substrato não pantanoso, que permitam a progressão dos operadores sem risco de afogamento ou atolamento; e a utilização de equipamentos em materiais não condutores, designadamente botas de borracha e vara e camaroeiros com cabos de plástico (INAG, 2008a). Após a captura, os peixes foram colocados temporariamente num recipiente (de volumetria adequada ao número de indivíduos capturado) com água do rio, para recuperação total após o atordoamento provocado pela descarga eléctrica. Posteriormente, procedeu-se ao processamento dos indivíduos para recolha dos seguintes dados: comprimento à furca (CF), sexo (no caso de ser possível observar caracteres sexuais secundários evidentes: abdómen dilatado nas fêmeas e

presença de tubérculos nupciais nos machos), presença de parasitas externos (em particular, *Lernaea* sp.), ocorrência de lesões ou feridas. Os indivíduos com CF menor que 40 mm foram apenas contabilizados para aferir o número total de juvenis no local, não tendo sido medidos para minimizar o *stress* decorrente do manuseamento necessário para aquisição desses dados e para evitar eventuais erros de identificação decorrentes da dificuldade em visualizar os caracteres diagnosticantes da espécie em indivíduos que ainda não completaram o seu desenvolvimento.

Além destes registos foram também realizadas análises à qualidade da água (nitritos, nitratos, fosfatos e amónia) com recurso a testes colorimétricos (JBL Testlab e Sera Quick Test – 04960 (Tabela 1.2)). Foram ainda registadas as seguintes variáveis físico-químicas, com recurso a sondas multiparamétricas (HANNA-Instruments®, modelos HI98129 e HI9146-04): temperatura, pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigénio dissolvido. Em cada momento de amostragem, foram também registados aspectos qualitativos dos habitats fluviais para caracterizar cada ponto de amostragem, nomeadamente o ensombramento e a complexidade da galeria ripícola, bem como a presença e abundância de espécies de peixes exóticas invasoras e de lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii* Girard, 1852).

Tabela 1.2

Valores de referência dos parâmetros físico-químicos medidos em cada ponto de amostragem. Adaptado de APA (2021).

Parâmetro	Unidades	Excelente/Bom	Bom/Razoável
Temperatura	° C	-	10,0 - 27,0
Condutividade	µS/cm	-	1000
pH	escala de Sørensen	6,5-8,5	6,0-9,0
Oxigênio dissolvido	mg O ₂ /l	8,0-12,0	5,00
Sólidos Dissolvidos Totais (TDS)	mg/l	12,50	25,50
Nitritos	mg NO ₂ /l	0,03	0,20
Nitratos	mg NO ₃ /l	5,00	10,00
Azoto Amoniacal	mg NH ₄ /l	0,30	0,50
Fosfatos	mg PO ₄ /l	0,20	0,40

Os dados obtidos nas campanhas de monitorização foram analisados estatisticamente através de análises de regressão e correlação, utilizando o *software* SPSS v. 29.0.0.0 (241) (IBM SPSS Statistics). As variáveis ambientais “complexidade da galeria ripícola” e “percentagem de ensombramento” foram codificadas de 0 a 3 (0- ausente, 1- uniforme, 2- simples (2 ou 3 tipos de vegetação), 3- complexa (4 ou mais tipos de vegetação)) e de 0 a 4 (0- 0%, 1- <30%, 2- entre 30 e 60%, 3- entre 60 e 90%, 4- >90%), respectivamente. A adequabilidade da análise de componentes principais foi verificada através da medida de Kaiser-Meyer-Olkin e do teste de esfericidade de Bartlett.

Resultados

Nos quatro anos de amostragem descritos neste trabalho foi amostrado, nas cinco bacias/sub-bacias (Lage, Jamor, Barcarena, Lizandro, Ota), um total de 1271 indivíduos. No Rio Ota foi somente amostrado um exemplar de *I. lusitanicum* em 2020. Por essa razão, os dados relativos a esta sub-bacia não foram considerados nas análises.

Dos rios amostrados, somente o Rio Lizandro não foi amostrado em 2018, tendo sido iniciada a sua monitorização em 2019. Assim, foi considerado um período de amostragem entre 2018 e 2021 para o Rio Jamor e as ribeiras de Oeiras (Lage e Barcarena) e entre 2019 e 2021 para o Rio Lizandro. A área e o volume dos pontos de amostragem estão registados na Tabela 1.3.

Tabela 1.3

Comprimento, volume e área do troço amostrado em cada ponto de amostragem.

	Ponto de amostragem	Comprimento troço (m)	Volume (m ³)	Área (m ²)
2018	LAG1	50,00	70,5	407,0
	LAG2	43,00	32,2	114,2
	LAG4	47,00	71,1	190,5
	BAR1	50,00	74,2	167,4
	BAR3	90,00	26,3	184,1
	J1	30,00	51,8	127,0
	J2	43,00	57,4	188,9
2019	LZD1	36,00	51,6	125,9
	LZD2	30,00	43,2	79,0
	LAG1	8,27	94,2	107,0
	LAG5	11,54	36,1	42,9
	BAR3	54,00	16,6	115,7
	J1	34,00	34,0	83,5
2020	LZD1	17,00	44,3	73,0
	LZD2	6,00	24,3	28,4
	LAG1	8,30	78,9	96,3
	LAG5	26,00	22,0	98,8
	BAR1	15,00	21,7	46,8
	BAR3	40,00	17,6	85,6
	J3	6,79	1,6	13,7
	J4	5,00	28,6	34,5
2021	LZD1	25,00	89,8	157,6
	LZD2	30,00	81,0	118,7
	LAG1	10,00	24,5	40,9
	BAR1	15,00	18,8	45,5
	J1	60,00	34,7	250,5
	J3	6,55	30,3	33,3

As temperaturas médias da água oscilaram entre 17,5 e 24,5 ° C, registadas na Lage, em 2019, e em Barcarena, em 2021, respectivamente (Figura 1.2).

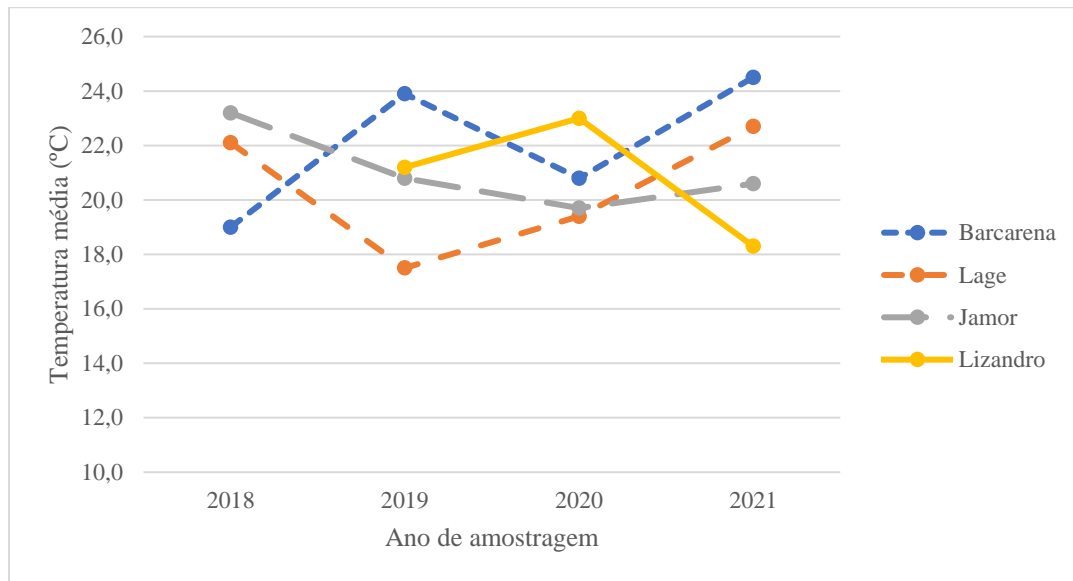


Figura 1.2 – Temperaturas médias nos cursos de água amostrados.

Na Tabela 1.4 apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados em cada ponto e ano de amostragem.

Tabela 1.4

Parâmetros físico-químicos dos habitats de Iberochondrostoma lusitanicum: resultados obtidos em cada ponto de amostragem nas várias campanhas de monitorização realizadas entre 2018 e 2021.

Ano	Ponto de Amostragem	Temperatura (°C)	O ₂ dissolvido (mg/L)	Condutividade de eléctrica (µs/cm)	pH	Sólidos dissolvidos totais (TDS) mg/L	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Amónia (mg/L)	Fosfatos (mg/L)
2018	BAR1	18,20	10,39	0,88	7,01	0,44	1,00	0,01	0,05	1,20
	BAR3	19,80	11,48	0,86	7,04	0,43	1,00	0,01	0,10	1,80
2019	BAR3	23,90	11,00	0,82	7,55	0,41	s.d.	0,01	s.d.	0,40
2020	BAR1	20,80	5,40	0,99	6,98	0,50	0,00	0,00	0,00	1,75
	BAR3	20,80	10,80	0,80	7,33	0,41	0,00	0,00	0,00	2,50
2021	BAR1	24,50	8,40	0,80	7,36	0,40	0,00	0,01	s.d.	s.d.
2018	LAG1	22,80	9,55	1,09	7,59	0,55	0,50	s.d.	s.d.	s.d.
	LAG2	21,80	7,94	0,94	7,46	0,47	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.
	LAG4	21,70	8,30	0,92	7,50	0,46	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.
2019	LAG1	17,50	7,70	0,90	6,71	0,45	1,00	0,10	s.d.	0,02
	LAG5	17,50	6,30	1,17	6,58	0,59	s.d.	0,60	s.d.	0,05
2020	LAG1	20,60	10,70	0,84	7,21	0,42	5,00	0,00	1,20	0,25
	LAG5	18,20	5,10	0,87	6,57	0,44	0,75	0,05	6,10	0,25
2021	LAG1	22,70	10,60	0,73	7,65	0,36	1,00	0,05	s.d.	s.d.
2018	J1	23,50	8,34	0,73	7,50	0,37	0,05	0,05	0,05	0,10
	J2	22,90	11,42	0,77	8,50	0,38	0,01	0,01	0,10	0,20
2019	J1	20,80	11,00	0,77	8,26	0,38	0,50	0,03	s.d.	0,20
2020	J3	19,60	8,10	0,60	6,64	0,30	0,25	0,00	0,10	0,00
	J4	19,70	6,30	0,77	6,96	0,38	0,00	0,05	0,10	0,75
2021	J1	24,00	12,30	0,73	7,62	0,36	1,00	0,01	s.d.	s.d.
	J3	17,10	6,40	0,72	6,66	0,36	0,00	0,00	s.d.	s.d.
2019	LZD1	22,90	10,30	1,02	8,91	0,51	0,75	0,05	s.d.	0,60
	LZD2	19,50	10,20	0,98	8,20	0,49	1,00	0,10	s.d.	1,80
2020	LZD1	24,50	8,50	0,86	6,72	0,43	0,00	0,03	0,00	2,50
	LZD2	21,40	9,20	0,81	6,93	0,41	0,25	0,05	0,00	5,00
2021	LZD1	20,80	7,30	0,78	6,84	0,39	0,00	0,03	s.d.	s.d.
	LZD2	15,80	8,30	0,88	6,62	0,44	1,00	0,25	s.d.	s.d.

Em relação aos valores obtidos para o teor de oxigénio dissolvido, em 2020, o ponto de amostragem LAG5 (ribeira da Lage) foi o que apresentou valores mais baixos, com 5,10 mg/L, mas ainda dentro dos valores considerados razoáveis.

No que diz respeito aos valores obtidos para os nitritos, todos os pontos estão dentro dos valores bons/razoáveis, exceto o ponto de amostragem LAG5 (ribeira da Lage) em 2019 e o ponto LZD2 (Rio Lizandro), em 2021, que apresentavam 0,60 e 0,25 mg/L, respectivamente. Todos os pontos apresentaram valores normais de amónia, com excepção dos pontos de amostragem da ribeira da Lage (LAG1 e LAG5), em 2020, com valores muito acima do razoável (1,20 e 6,10 mg/L, respectivamente). O teor de fosfatos

foi o parâmetro que apresentou os valores mais preocupantes: em 2018, os dois pontos amostrados na ribeira de Barcarena tinham valores acima do limite (1,20 e 1,80 mg/L), sendo que o mesmo aconteceu em 2020 (1,75 e 2,50 mg/L). Também em 2020, o ponto de amostragem J4 (Rio Jamor) apresentou um teor de fosfatos de 0,75 mg/L, valor acima do limite aceitável. Todos os pontos amostrados no Rio Lizandro apresentaram igualmente valores elevados: 0,60 e 1,80 mg/L em 2019 e 2,50 e 5,00 mg/L em 2020. Os restantes parâmetros físico-químicos analisados apresentaram valores entre o Excelente e o Razoável, estando assim dentro dos valores considerados aceitáveis (Tabela 1.2).

No que diz respeito às condições de ensombramento nos locais de amostragem (Tabela 1.5), a ribeira da Lage apresentou percentagens razoáveis (entre 30 a >90%) em todas as campanhas de monitorização exceto na efectuada em 2018, quando o ponto de amostragem LAG4 apresentava menos de 30% de ensombramento. Na ribeira de Barcarena os níveis de ensombramento eram globalmente mais baixos, nunca apresentando mais de 60% de ensombramento. O Rio Jamor foi o que apresentou maior variação da percentagem de ensombramento do canal, com pontos de amostragem sem qualquer ensombramento e outros com mais de 90%. No ponto LAG1 e BAR1, o ensombramento existente corresponde a uma zona das ribeiras que se encontra debaixo de dois viadutos. Assim, apesar de apresentar uma percentagem elevada de ensombramento, a galeria ripícola é inexistente (ver Tabela 1.6).

Tabela 1.5

*Percentagens de ensombramento nos pontos de amostragem de *Iberochondrostoma lusitanicum*.*

Rio	Ponto amostragem	2018	2019	2020	2021
Lage	LAG1	30-60	60-90	>90	>90
	LAG2	>90	-	-	-
	LAG4	<30	-	-	-
	LAG5	-	>90	>90	n.a.
	BAR1	30-60	-	<30	<30
Barcarena	BAR3	<30	<30	60	n.a.
	J1	<30	0	n.a.	0
Jamor	J2	0	-	-	-
	J3	-	-	>90	60-90
	J4	-	-	>90	n.a.
	LZD1	-	30-60	30-60	30-60
Lizandro	LZD2	-	30-60	<30	<30

Nota: em alguns pontos não foi determinada esta percentagem e, por isso, apresentam-se como n.a. (não aplicável).

No que diz respeito à avaliação da complexidade da galeria ripícola (Tabela 1.6) pode observar-se que os pontos de amostragem efectuados nos rios Lizandro e Jamor e na ribeira de Barcarena apresentavam níveis mais elevados do que os restantes.

Tabela 1.6

Caracterização qualitativa da complexidade da galeria ripícola nos locais amostrados: 0 - galeria ausente, 1 - galeria uniforme (1 tipo de vegetação), 2 - galeria simples (2 a 3 tipos de vegetação), 3 - galeria complexa (4 ou mais tipos de vegetação).

Rio	Ponto amostragem	2018	2019	2020	2021
Lage	LAG1	0	0	2	0
	LAG2	3	-	-	-
	LAG4	3	-	-	-
	LAG5	-	2	2	n.a.
Barcarena	BAR1	3	-	2	0
	BAR3	3	3	3	n.a.
Jamor	J1	3	0	n.a.	0
	J2	3	-	-	-
	J3	-	-	3	3
	J4	-	-	3	n.a.
Lizandro	LZD1	-	3	3	2
	LZD2	-	3	2	2

Nota: em alguns pontos não foi determinada a complexidade da galeria e, por isso, apresentam-se como n.a. (não aplicável).

A densidade média de peixes amostrados por unidade de volume variou entre 0,37 indivíduos/m³, registado na ribeira da Lage em 2020, e 3,26 indivíduos/m³ registado na ribeira de Barcarena, em 2019 (Tabela 1.7). Considerando os resultados obtidos para cada local, verifica-se que a densidade média de indivíduos/m³ sofre incrementos e decréscimos em relação ao ano anterior, sem que haja um padrão consistente de descida/subida deste parâmetro. Além disso, o padrão observado não é idêntico para todos os locais de amostragem: de 2018 para 2019 houve um incremento acentuado das densidades na ribeira de Barcarena e no Rio Jamor, e um decréscimo acentuado na ribeira da Lage; de 2019 para 2020, registou-se um decréscimo (de 29, 40 e 41%) em todos os locais, excepto no Rio Lizandro (que registou um incremento de 69%); e de 2020 para 2021, registou-se um incremento substancial na ribeira da Lage (670%), um incremento

ligeiro (19%) na ribeira de Barcarena, um decréscimo ligeiro (27%) no Rio Jamor e um decréscimo acentuado (65%) no Rio Lizandro (Tabela 1.7).

Tabela 1.7

Densidade média de peixes por unidade de volume em cada campanha de amostragem (n.º indivíduos/m³). Os incrementos e decréscimos relativamente à campanha de amostragem anterior estão assinalados com setas ascendentes e descendentes, respectivamente.

Local	2018	2019	2020	2021
Barcarena	1,93	3,26 ↑	2,32 ↓	2,76 ↑
Lage	1,54	0,62 ↓	0,37 ↓	2,85 ↑
Jamor	1,09	2,97 ↑	1,75 ↓	1,28 ↓
Lizandro	*	1,21	2,05 ↑	0,71 ↓

* Para o Lizandro, em 2018, não existe um valor da densidade, pois esse rio só começou a ser amostrado em 2019

No primeiro ano de monitorização, os rios com maior número de indivíduos amostrados foram Barcarena e Lage, tendo esses números sido muito mais reduzidos nos anos subsequentes (Figura 1.3). O local com menor número de indivíduos ao longo dos três anos de amostragem foi o Rio Lizandro.

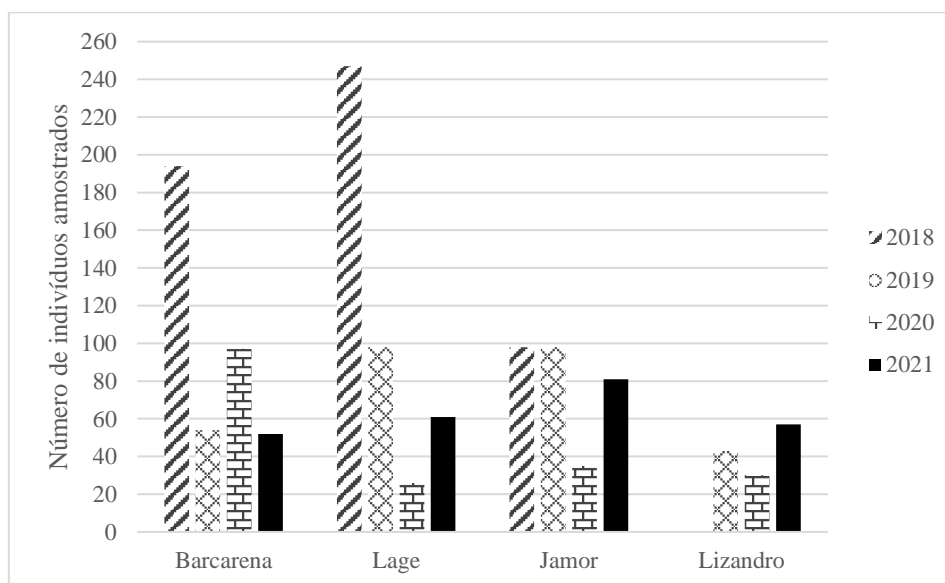


Figura 1.3- Número de indivíduos amostrados em cada local de amostragem, nos quatro anos da monitorização.

Relativamente ao tamanho dos peixes capturados e considerando todas as campanhas de amostragem efectuadas (Figura 1.4), verifica-se que, em média, os valores mais elevados de comprimento à furca foram obtidos no Rio Lizandro (88,7 mm), seguido pelo Rio Jamor (76,1 mm) e ribeira da Lage (75,8 mm). Os indivíduos amostrados na ribeira de Barcarena foram, em média, os de menor dimensão (66,7 mm).

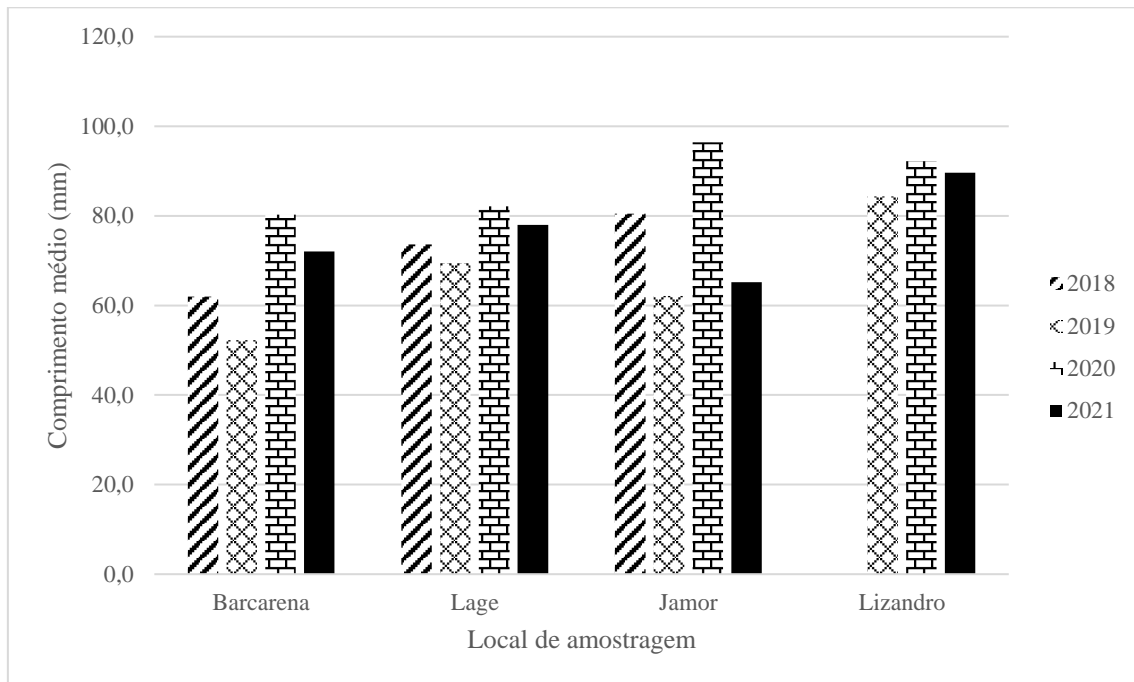


Figura 1.4- Comprimentos médios obtidos até à furca, em milímetros, dos indivíduos amostrados por local e por ano de amostragem.

Os indivíduos capturados foram agrupados por classes de tamanho, para análise da estrutura da população em cada ano de amostragem (Tabela 1.8). Para uma melhor visualização da frequência relativa de cada classe de tamanho, esta informação foi igualmente representada sob a forma de histogramas, para cada local de amostragem (Figuras 1.5 a 1.8).

Tabela 1.8

Número de indivíduos de Iberochondrostoma lusitanicum amostrados (n) por classe de tamanho (mm), obtido para cada local e ano de amostragem.

Ano/ Local	Barcarena				Lage				Jamor				Lizandro		
	2018	2019	2020	2021	2018	2019	2020	2021	2018	2019	2020	2021	2019	2020	2021
Classe tamanho (mm)	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
[10-20[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
[20-30[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[30-40[2	0	3	1	0	0	0	0	0	1	3	0	1	0	0
[40-50[39	22	14	6	36	15	4	2	2	8	0	16	5	1	2
[50-60[60	23	6	15	19	35	2	6	18	41	1	20	0	0	10
[60-70[58	9	8	7	14	8	0	18	28	33	0	19	1	1	6
[70-80[10	0	5	3	70	5	0	13	5	4	3	11	5	4	3
[80-90[2	0	17	5	68	7	7	2	2	2	0	8	10	3	0
[90-100[10	0	21	8	38	18	10	6	12	6	3	4	12	11	8
[100-110[9	0	20	7	1	8	3	11	21	1	9	2	8	7	14
[110-120[4	0	2	0	1	2	0	3	9	1	12	0	1	3	7
[120-130[0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	7
[130-140[0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	194	54	97	52	247	98	26	61	98	98	35	81	43	30	57

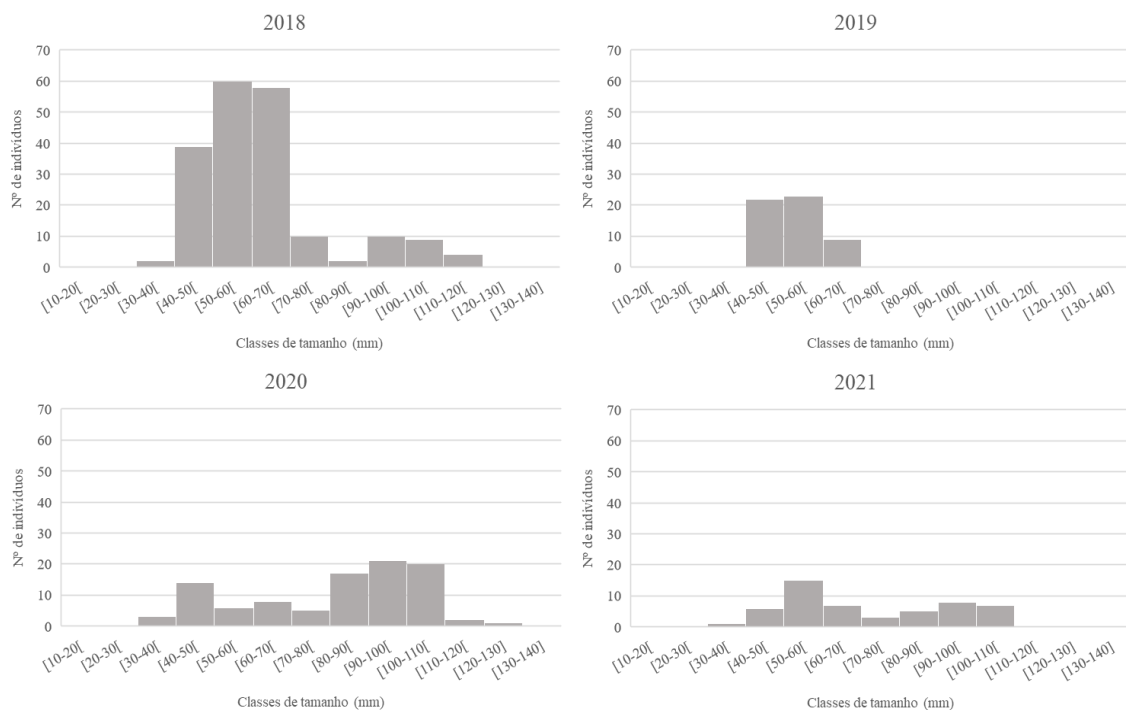


Figura 1.5 – Estrutura populacional de *Iberochondrostoma lusitanicum* da ribeira de Barcarena: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem.

A estrutura da população de *I. lusitanicum* da ribeira de Barcarena (Figura 1.5) sofreu alterações entre 2018 e 2021, quer no que diz respeito ao número de indivíduos capturado por classe de tamanho, quer no número de classes dimensionais amostrado. Com efeito, em 2018, a estrutura desta população era representada por nove classes dimensionais consecutivas, três delas (40-50, 50-60 e 60-70 mm) com um número bastante superior de indivíduos. No ano seguinte, verificou-se uma acentuada redução no número de indivíduos capturados (de 194 em 2018 para 54 em 2019) e no número de classes dimensionais representadas (de nove em 2018 para apenas três em 2019). Nos anos de amostragem subsequentes (2020 e 2021), a representatividade das várias classes dimensionais foi restabelecida (indivíduos distribuídos por, respectivamente, dez e oito classes de tamanho consecutivas), no entanto, não foi registado um incremento de indivíduos por classe de tamanho: ao contrário do verificado em 2018, o número de capturas por classe de tamanho raramente excedeu 10 indivíduos.

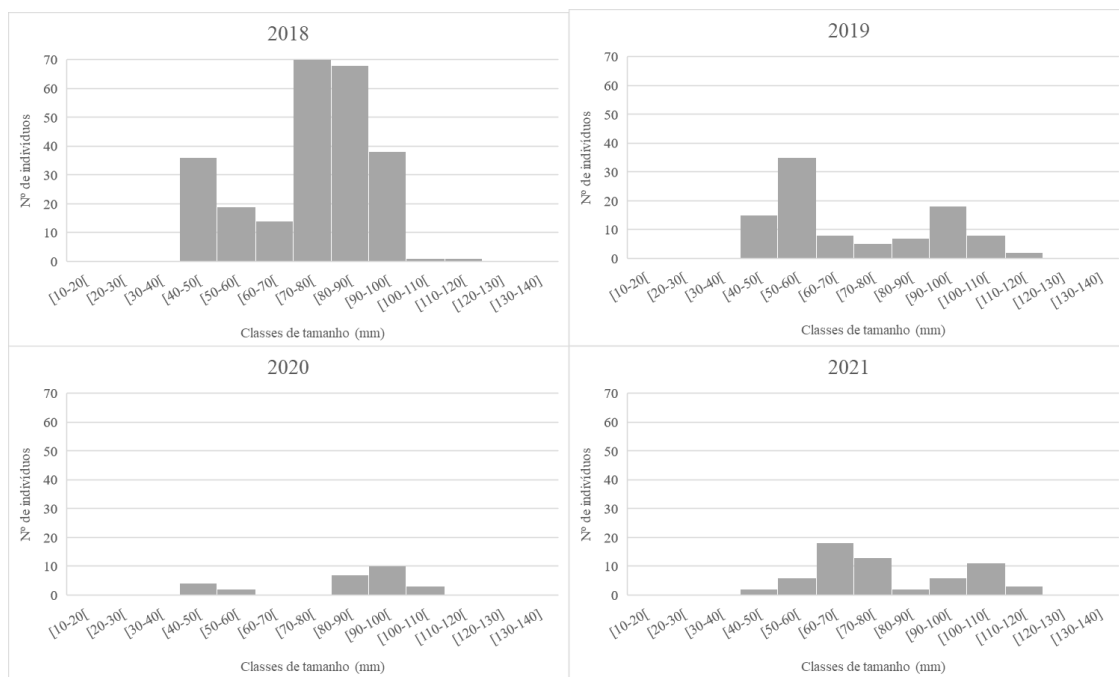


Figura 1.6 – Estrutura populacional de *Iberochondrostoma lusitanicum* da ribeira da Lage: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem.

Na ribeira da Lage (Figura 1.6), observou-se uma tendência semelhante à da ribeira de Barcarena, com maior número de indivíduos capturados em 2018, mas, neste caso, a maior parte distribuída em oito classes de tamanho, sendo que a maior parte dos

indivíduos pertenciam às classes entre os 70 e os 100 mm. Nos anos subsequentes houve uma redução considerável do efectivo capturado, passando de 247 em 2018 para 98 em 2019, apesar de se manterem distribuídos por oito classes de tamanho, com um terço dos indivíduos a pertencer à classe entre 50 e 60 mm. Em 2020, o efectivo capturado foi, mais uma vez, reduzido, passando para apenas 26 indivíduos capturados, distribuídos em classes não consecutivas. Em 2021 o número de capturas voltou a subir, com 61 indivíduos capturados que se distribuíram por oito classes de tamanho consecutivas.

No caso do Rio Jamor (Figura 1.7), o padrão é diferente do acima descrito, com o mesmo número de indivíduos capturados nos dois primeiros anos (98 em 2018 e 2019), mas com diferenças na distribuição por classes. Em 2018, as classes com mais indivíduos foram as dos 60-70 mm (28 indivíduos) e 100-110 mm (21 indivíduos), enquanto em 2019 a maior parte dos indivíduos capturados se encontravam entre os 50 e os 70 mm (41 e 33 indivíduos entre os 50 e os 60 mm e entre 60 e 70 mm, respectivamente). Em 2020 houve uma redução do efectivo capturado ($n=35$), distribuído principalmente entre 100 e 110 mm e entre 110 e 120 mm (9 e 12 indivíduos, respectivamente) e, em 2021, o número voltou a subir com 81 indivíduos capturados que se distribuíram em 8 classes, encontrando-se a maior parte deles entre os 40 e os 70 mm.

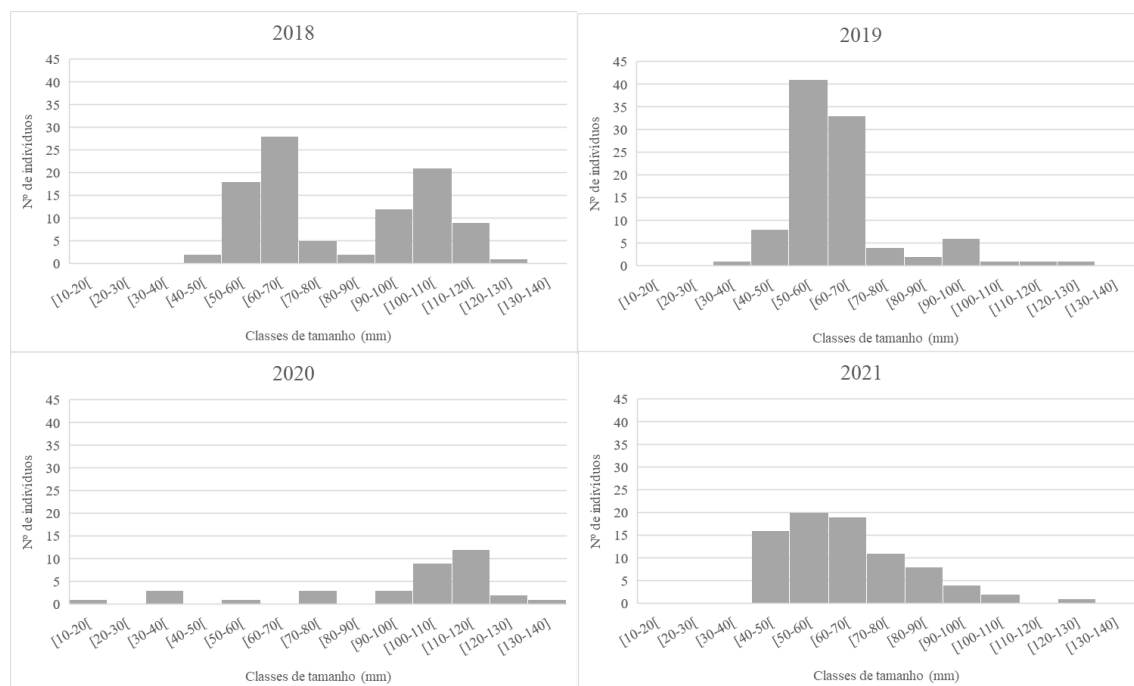


Figura 1.7 – Estrutura populacional de *Iberochoondrostoma lusitanicum* do Rio Jamor: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem.

Finalmente, para o Rio Lizandro, amostrado entre 2019 e 2021, o número de indivíduos capturado foi mais constante, com 43, 30 e 57 indivíduos em 2019, 2020 e 2021, respectivamente. Na sua maioria apresentavam comprimentos entre os 80 e 100 mm (22 indivíduos) em 2019, em 2020 entre os 90 e os 110 mm (18 indivíduos) e, em 2021, entre os 50 e os 60 mm (10 indivíduos) e entre os 100 e os 110 mm (14 indivíduos) (Figura 1.8).

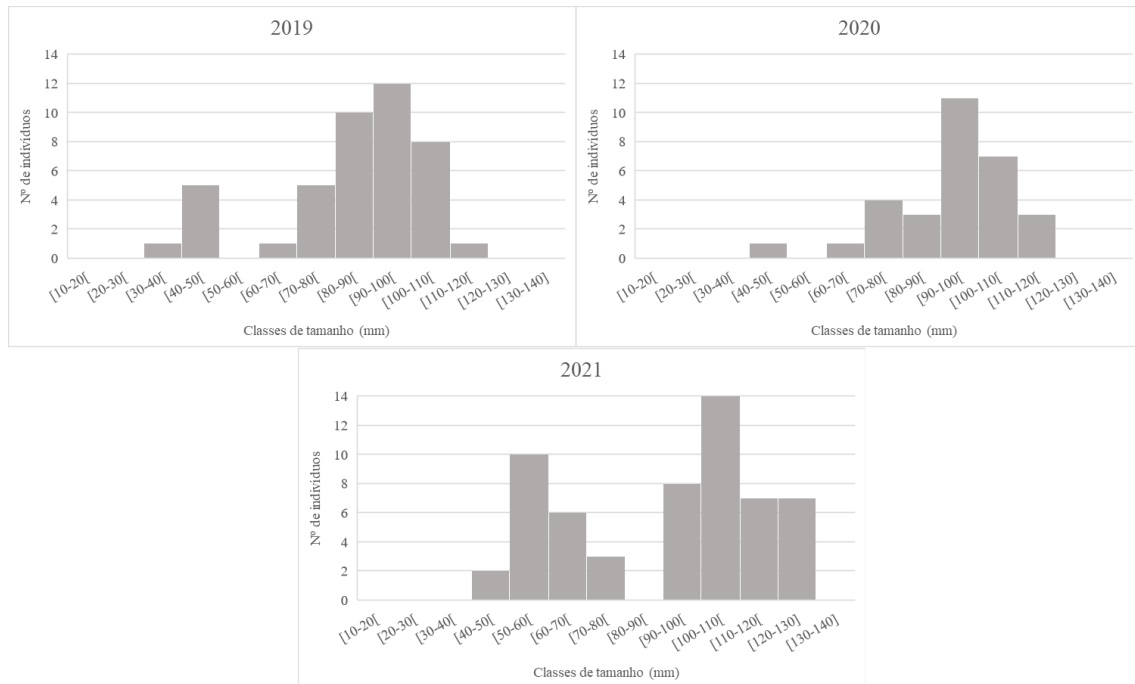


Figura 1.8 – Estrutura populacional de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Rio Lizandro: distribuição dos indivíduos capturados por classes de tamanho, para cada ano de amostragem.

Em relação à presença de espécies piscícolas exóticas e invasoras, foram somente capturadas num dos pontos de amostragem (LZD1), em 2021: sete exemplares da espécie pimpão (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758) e cinco exemplares da espécie perca-sol (*Lepomis gibbosus*, Linnaeus, 1758). Já a presença do crustáceo exótico e invasor lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii*) foi mais variável entre os locais (Tabela 1.9), com os rios Lizandro e Jamor a apresentarem números muito baixos de lagostins, nas várias datas e pontos de amostragem, enquanto nas ribeiras da Lage e de Barcarena, os números eram já mais elevados em alguns pontos de amostragem e em algumas datas. Por exemplo, em 2018 os pontos de amostragem localizados na ribeira da

Lage apresentaram números razoavelmente elevados de lagostins, mas nos anos seguintes sofreram uma diminuição.

Tabela 1.9

Número de exemplares da espécie exótica e invasora lagostim-vermelho-do-Louisiana (Procambarus clarkii) capturados nos locais de amostragem de Iberochoondrostoma lusitanicum, nas campanhas de monitorização de 2018 a 2021.

Rio	Ponto amostragem	2018	2019	2020	2021
Lage	LAG1	>100	<10	<10	0
	LAG2	50-100	0	0	0
	LAG4	50-100	0	0	0
	LAG5	0	10-50	>100	0
Barcarena	BAR1	50-100	0	50-100	10-50
	BAR3	10-50	0	<10	0
Jamor	J1	<10	0	0	0
	J2	0	0	0	0
	J3	0	0	<10	2
	J4	0	0	0	0
Lizandro	LZD1	0	0	0	0
	LZD2	0	0	<10	0

Da matriz de resultados obtidos para as variáveis ambientais analisadas durante as monitorizações anuais, tentou averiguar-se qual ou quais delas teriam mais influência na

variável “*abundância da espécie-alvo*”, traduzida pelo número de indivíduos de *I. lusitanicum* capturados. Verificou-se que o número de indivíduos capturado não está correlacionado com nenhuma das variáveis ambientais testadas (*temperatura*: $R=-0,84$, $p=0,675$; *pH*: $R=0,124$, $p=0,536$; *oxigênio dissolvido*: $R=0,107$, $p=0,596$). Sendo que o esforço amostral não é constante para cada ponto e ano de amostragem, testou-se se o número de indivíduos capturado estava correlacionado com o volume de água amostrado e/ou com o tempo de pesca. Não se encontrou correlação significativa com o volume amostrado ($R=0,302$; $p=0,125$), mas existia uma correlação significativa com o tempo de pesca ($R=0,572$; $p=0,002$). Depois de se aplicar uma correção à variável “*abundância da espécie-alvo*” (“*abundância da espécie-alvo*” / “*tempo de pesca*”) averiguou-se a existência de correlação entre esta nova variável e as três variáveis ambientais descritas acima: os resultados obtidos demonstram a ausência de correlações significativas (*temperatura*: $R=-0,040$, $p=0,844$; *pH*: $R=-0,018$, $p=0,930$; *oxigênio dissolvido*: $R=-0,150$, $p=0,455$).

Considerando que estas variáveis ambientais estão correlacionadas entre si, mas por si só não explicam os valores da abundância de *I. lusitanicum*, realizou-se uma análise de componentes principais para criar nova(s) variável(eis) independente(s) e averiguar a sua relação com a variável “*abundância da espécie-alvo*”. Verificou-se que a primeira componente principal explicava 68,65% da variância observada. A relação entre esta componente e a variável “*abundância da espécie-alvo*” não é significativa ($R= 0,064$; $p=0,75$), assim como entre essa componente e a variável “*abundância da espécie-alvo*” corrigida pelo “*tempo de pesca*” ($R=-0,083$; $p=0,68$). Não se encontraram diferenças significativas para a comparação dos valores obtidos nos diferentes anos de amostragem para a variável “*abundância da espécie-alvo*” ($H(3)= 7,771$, $p=0,051$), nem para a variável “*abundância da espécie-alvo*” corrigida pelo “*tempo de pesca*” ($H(3)=1,919$, $p=0,589$). No que diz respeito a diferenças entre as populações dos diferentes rios/ribeiras amostrados, também não se encontraram diferenças significativas nem para a “*abundância da espécie-alvo*” ($Z=1,618$, g.l.=3; 23, $p=0,213$), nem para a variável “*abundância da espécie-alvo*” corrigida para o “*tempo de pesca*” ($Z=1,08$, g.l.=3; 23, $p=0,377$). A “*abundância da espécie-alvo*” também não está significativamente correlacionada com o “*ensombramento*” ($R_s=-0,314$; $p=0,11$) nem com a “*complexidade da galeria ripícola*” ($R_s=-0,111$; $p=0,581$). A mesma ausência de significância verificou-se quando a “*abundância da espécie-alvo*” corrigida pelo “*tempo de pesca*” foi

correlacionada com o “*ensombramento*” ($R_s=-0,123$; $p=0,54$) e com a “*complexidade da galeria ripícola*” ($R_s=-0,181$; $p=0,367$).

Principais conclusões

As monitorizações descritas neste capítulo são realizadas anualmente com a finalidade de aferir o estado destas populações no fim do período mais crítico do ano, a época seca do Verão. Por isso, a amostragem é direccionada para a captura dos indivíduos, pois são focadas as zonas onde se sabe ser mais provável a existência das espécies que procuramos. São maioritariamente amostradas zonas com a existência de pegos que mantêm a água no Verão e zonas com sombra, vegetação e refúgios aquáticos.

O registo dos comprimentos dos indivíduos amostrados permite fazer uma análise da estrutura da população em cada ponto de amostragem. Com base nesses resultados é possível inferir o estado das populações e, de certa forma, avaliar o sucesso das épocas de reprodução passadas. Por exemplo, em anos em que a maior parte dos indivíduos amostrados se encontra nas classes de tamanho mais baixas, podemos inferir que a época de reprodução anterior terá sido bem-sucedida, pois há muitos indivíduos de tamanho reduzido. Isto se não tiver havido nenhum evento extremo que tenha causado a morte ou a deslocação de grande parte dos indivíduos adultos. Sendo que esta amostragem foi feita após o Verão, quase todos os indivíduos com menos de 60 mm serão indivíduos nascidos nessa Primavera. Existem diferenças na estrutura populacional entre anos e locais de amostragem e, em alguns deles, uma redução acentuada do número de indivíduos capturados.

Em relação ao habitat, nomeadamente, à percentagem de ensombramento e à complexidade da galeria ripícola, nem sempre a maior percentagem correspondia a zonas com uma galeria complexa. Isso é patente em dois dos pontos de amostragem, um na Ribeira da Lage e outro na Ribeira de Barcarena, onde os altos valores de ensombramento se devem à existência de viadutos. Em alguns anos foram detectadas espécies exóticas, nomeadamente, o lagostim-vermelho-do-Louisiana, *Procambarus clarkii*, o que é particularmente preocupante, já que são prejudiciais às espécies e habitats e têm uma grande capacidade de dispersão (Gherardi, 2007; Ilhéu et al., 2007; Souty-Grosset et al., 2016). A presença destas espécies é um factor importante a ter em conta e a sua monitorização e gestão é fundamental.

Este tipo de registos permite criar uma importante série temporal de dados, fundamental para ilustrar as alterações sofridas por estes habitats e, conseqüentemente, os organismos que neles habitam. Estudos como estes complementam, a uma escala mais local, os dados recolhidos pela APA no âmbito das suas competências relacionadas com as obrigações europeias a que Portugal se encontra vinculado, nomeadamente a implementação nacional da Directiva Quadro da Água (Feio & Ferreira, 2019). Apesar de mostrarem uma tendência, não é possível estabelecer um padrão com tão poucos anos de registos, é necessário prolongar no tempo este tipo de monitorizações para que se consigam encontrar eventuais padrões, seus factores responsáveis e relacioná-los com as variáveis ambientais e físico-químicas. As monitorizações locais dos parâmetros físico-químicos deveriam ser efectuadas nas mesmas condições para poderem ser comparáveis (e.g. à mesma hora, exactamente no mesmo local dentro do ponto de amostragem, etc.) e recorrendo a sondas multiparamétricas que apresentam um valor mais preciso e sem as características subjectivas dos testes colorimétricos que, embora sejam práticos, fáceis de utilizar no campo e pouco dispendiosos, são altamente subjectivos dependendo do observador. Em relação à caracterização físico-química dos habitats, uma das lacunas que encontramos é a falta de dados ambientais registados e disponibilizados oficialmente pelas instituições responsáveis. Existem poucas estações de recolha de parâmetros ambientais, as que existem apresentam muitas falhas temporais e o sítio da internet, onde os dados existentes são disponibilizados, é de difícil consulta. Para melhor se perceber as alterações e condições dos habitats, é necessário que as estações de monitorização estejam a funcionar correctamente e que estejam em locais adequados, ou seja, que ilustrem as condições particulares das populações sensíveis e não só em zonas mais abrangentes.

Capítulo II – Contribuições para a reprodução *ex situ*

Enquadramento

No cenário actual de perda acelerada da biodiversidade, todas as medidas de conservação são imprescindíveis. Estas medidas podem ser de dois tipos, *in situ* e *ex situ*, e a sua aplicação deve ser complementar. Quando as populações a conservar se encontram numa situação de gravidade extrema, as medidas de conservação *ex situ* tornam-se mais importantes para responder rapidamente às necessidades das populações em causa (Rytwinski et al., 2021). Como exemplos de tipos de conservação *ex situ* temos os jardins/parques zoológicos, os aquários, jardins botânicos, bancos de genes e programas de reprodução em cativeiro (reprodução *ex situ*) (Kasso & Balakrishnan, 2013).

Uma dessas medidas é a criação de programas de reprodução *ex situ*, uma ferramenta importante na conservação de espécies ameaçadas. Têm sido utilizados com alguma frequência por jardins e parques zoológicos para manter os efectivos populacionais de algumas espécies ameaçadas sem comprometer a viabilidade genética a longo prazo e a possibilidade de devolução à natureza (Frankham et al., 2010). Geralmente, esta abordagem é um último recurso para espécies que apresentam efectivos muito baixos e que, sem algum tipo de medidas de conservação *ex situ*, não sobreviveriam no meio natural (Philippart, 1995; Schönhuth et al., 2003). As razões para a possível extinção destas espécies são de diversas ordens, mas apresentam um ponto em comum, a intervenção humana. Esta pode ser sentida na destruição, directa e indirecta, de habitats (perturbação de solos, extração de água, poluição, etc.), na captura indiscriminada das espécies em questão e/ou na introdução de espécies exóticas que perturbam o equilíbrio dos habitats (Costello, 2022). Os objectivos destes programas de reprodução passam por constituir um reduto da população, com o objectivo final de uma reintrodução e repovoamento, promover a educação ambiental e consciencializar para estas espécies e as ameaças a que estão sujeitas, angariar dinheiro para a sua conservação e fornecer indivíduos para investigação de aspectos das espécies, até então impossíveis de estudar (Frankham et al., 2010).

Sendo os ecossistemas de água doce ambientes particularmente ameaçados, torna-se evidente a necessidade de recorrer a medidas de conservação *ex situ*, nomeadamente os programas de reprodução. Os programas de reprodução *ex situ* de espécies de peixe de

água doce seguem as orientações gerais para outras espécies, sendo, na sua maioria, uma medida de último recurso e que é implementada em conjunto com planos de recuperação dos habitats para posterior repovoamento e reintrodução dos indivíduos reproduzidos (Frankham et al., 2010; Gil, Faria, et al., 2010; Gil, Sousa-Santos, et al., 2010; Sousa-Santos, Gil, et al., 2014). Estas medidas têm sido implementadas em vários países, muitas vezes com o objectivo de suplementar a população de origem com mais indivíduos e com uma monitorização de seguimento, mas nem todas fazem parte de um programa de reprodução *ex situ* pré-estabelecido (Rytwinski et al., 2021). Têm sido aplicados a diversos géneros de peixes de água doce, sendo o grupo dos salmonídeos o mais estudado (Rytwinski et al., 2021) pela sua importância como recurso alimentar.

A escolha das espécies e/ou populações a intervir engloba vários desafios. As definições de espécie ou de unidades de conservação não são consensuais e não existe uma que se aplique a todos os tipos de organismos. Assim, importa aplicar a que melhor se ajusta ao organismo que pretendemos conservar e utilizar as medidas de conservação mais adequadas. No caso das espécies de peixes estritamente dulciaquícolas, as unidades de conservação também não são fáceis de estabelecer. Sendo espécies de peixes primárias, estão praticamente confinadas à bacia hidrográfica onde se encontram, isoladas e muito limitadas na possibilidade de se dispersarem, uma vez que a sua fisiologia incompatível com a salinidade marinha não lhes permite dispersar pelo mar (Berra, 2007). Também a sua deslocação ao longo de uma linha de água está limitada à ecologia da espécie (existem espécies de reduzida dimensão com reduzida capacidade de dispersão, por oposição a espécies potamódromas que efectuam extensas migrações para as zonas de desova, nas cabeceiras dos rios), às condicionantes hidromorfológicas naturais dos rios (e.g. cascatas intransponíveis de jusante para montante, caudais torrenciais) e à existência ou não de barreiras artificiais criadas por intervenção humana (como barragens e açudes). Além das idiosincrasias ecológicas e fisiológicas que condicionam vários aspectos da sua biologia, a história evolutiva de muitas espécies de água doce está intimamente ligada à história geológica e aos processos geomorfológicos que alteram os ambientes onde elas habitam. Com efeito, as espécies primárias de peixes dulciaquícolas estão sujeitas ao isolamento imposto por características geológicas (e.g. desníveis acentuados que impedem a passagem para montante, cadeias montanhosas que isolam linhas de água outrora comunicantes) e ao impedimento de utilizar uma possível via de dispersão marinha. Todos estes processos são dinâmicos e podem sofrer alterações ao longo da

história evolutiva, o que ajuda a explicar alguns processos de especiação, pois esse isolamento geográfico leva, muitas vezes, a um isolamento reprodutor que pode acelerar a diferenciação genética e, conseqüentemente, a existência de estruturação entre populações da mesma espécie ou mesmo o aparecimento de novas espécies. Para estas espécies, portanto, os rios constituem “ilhas” e podem ser-lhes aplicados os princípios teóricos que regem a evolução das espécies insulares: efeito fundador a partir de um número reduzido de colonizadores; isolamento relativamente à fonte de colonizadores; ausência de fluxo genético com outras populações; adaptação ao ambiente local; maior probabilidade de fixação de alelos raros; maior probabilidade de surgirem novas mutações; e maior probabilidade de perda de diversidade por efeitos de consanguinidade e de deriva genética (Bernardi, 2013; Gillespie & Roderick, 2002; Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

Pelo acima exposto, no caso das espécies estritamente dulciaquícolas, torna-se importante a definição das unidades com valor evolutivo que as compõem. Waples (1991) definiu como ESU (*Evolutionary Significant Unit*) as populações que apresentavam isolamento reprodutivo de outras populações conspecíficas e que representam um legado importante na história evolutiva da espécie. Esta questão será abordada mais detalhadamente no Capítulo IV.

Do estabelecimento das unidades evolutivas que é imperativo conservar surge a necessidade de aplicação de um conjunto de medidas de conservação das quais podem fazer parte os programas de reprodução em cativeiro. Estes permitem a manutenção de espécies ou populações que poderiam extinguir-se na natureza por não serem capazes de fazer face às pressões a que estão sujeitas (sobretudo alterações drásticas nos seus habitats, com origem antropogénica) e visam manter a viabilidade genética a longo prazo, manter as espécies como entidades evolutivas dinâmicas e salvaguardar a opção de devolução dos indivíduos ao habitat após a sua regeneração (Frankham et al., 2010).

Grande parte da metodologia associada à conservação *ex situ* de peixes existente até ao momento envolve algum tipo de manipulação dos indivíduos, quer seja em programas de conservação de espécies ameaçadas, quer seja na produção de espécies com interesse comercial (Moorhead & Zeng, 2010; Rakes et al., 1999; Zohar & Mylonas, 2001). Esse tipo de interferência pode causar alterações comportamentais indesejadas (Kelley et al., 2006; O’Sullivan et al., 2020; Ruzzante, 1994), que podem ser prejudiciais se o objectivo do programa de conservação for o repovoamento dos habitats com os

indivíduos reproduzidos em cativeiro (“*supportive breeding*”). Para espécies com a possibilidade de retornarem ao seu habitat natural, é importante aplicar um programa de reprodução o mais natural possível (Maynard et al., 1994; Sousa-Santos, Gil et al., 2014), mesmo que isso não resulte numa optimização do número de descendentes. O principal objectivo é que os descendentes, depois de libertados no meio natural, disponham (o mais possível) do repertório comportamental da espécie em causa, incluindo nos aspectos relacionados com a alimentação, reprodução e fuga de predadores (Gil, Sousa-Santos, et al., 2010; Sousa-Santos, Gil et al., 2014).

Outro dos aspectos a ter em conta nestes programas tem a ver com os efeitos genéticos negativos, entre eles, a perda de diversidade genética por efeitos de deriva (mais pronunciados quando os efectivos populacionais são reduzidos, como é o caso dos *stocks* mantidos em cativeiro, quando comparados com os efectivos populacionais selvagens) e de consanguinidade; adaptação genética ao cativeiro; alterações epigenéticas; e selecção decorrente do ambiente em cativeiro (Ford, 2002; Håkansson, 2004; Woodworth et al., 2002). Para minimizar esta possibilidade, é necessário adoptar medidas de salvaguarda da diversidade genética original da espécie/população, utilizando reprodutores que representem o melhor possível a população/espécie de origem sem comprometer a população selvagem (Hard et al., 1992), controlando o número de eventos de reprodução consecutivos a partir do mesmo *pool* genético (Araki et al., 2007) e efectuando introduções periódicas de indivíduos selvagens no grupo de reprodutores (Ford, 2002). De notar que, apesar de todas as salvaguardas, é sempre possível que haja perdas de diversidade genética na população em cativeiro (Ford, 2002), sobretudo se o alvo do programa de conservação *ex situ* pertencer a um grupo taxonómico com um número muito reduzido de descendentes por geração, fertilização não aleatória, elevada selecção sexual e/ou se a sua diversidade genética na natureza estiver já demasiado depauperada. Os estudos sobre perda de diversidade genética no decurso de programas de conservação *ex situ* são, maioritariamente, focados em espécies com interesse comercial (Araki et al., 2007; Blanchet et al., 2008; Hard et al., 1992; Sahashi & Morita, 2022), não sendo ainda conhecida a magnitude de eventuais perdas de diversidade em espécies ameaçadas de peixes dulciaquícolas sem interesse comercial.

A equipa MARE-ISPA tem vindo a efectuar trabalhos na área da conservação de espécies de peixes dulciaquícolas desde 2001 e após as monitorizações de Primavera de 2005 (que revelaram números muito reduzidos dos efectivos de algumas espécies) e das

previsões de um ano de seca severa em 2006, pelo então Instituto Português do Meteorologia, tornou-se evidente a necessidade de se tomarem medidas imediatas para a salvaguarda de algumas das populações mais ameaçadas. Assim, com a colaboração do Aquário Vasco da Gama (AVG), e com autorização do Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas, em 2006, foram transportados indivíduos adultos da espécie mais afectada (o Ruivaco-do-Oeste, *Achondrostoma occidentale*) para tanques no AVG onde seriam mantidos até as condições no habitat se restabelecessem, nomeadamente a conectividade hídrica. Estes indivíduos responderam bem às condições de cativeiro e, no período em que aí foram mantidos, ocorreu um evento reprodutivo espontâneo. Desta acção de salvaguarda surgiu a ideia de se utilizar a reprodução *ex situ* como uma ferramenta adicional nas acções de conservação direccionadas às espécies de peixes dulciaquícolas ameaçadas. Decorrente do trabalho efectuado pela equipa MARE-ISPA, foi então estabelecido, em 2008, um protocolo para a implementação do “Projecto de Conservação *Ex situ* de Organismos Fluviais”. Este protocolo estabeleceu uma parceria entre o ISPA-Instituto Universitário, a ONG Quercus, o Aquário Vasco da Gama e a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, com vista à recuperação dos efectivos de populações selvagens de espécies de peixes de água doce nativas, entre elas, *Iberochondrostoma lusitanicum*. Este Projecto tinha como principal objectivo criar uma “reserva de efectivos” *ex situ* de populações de espécies de peixes de água doce nativas ameaçadas enquanto os seus habitats de origem não recuperassem as condições adequadas à sua sobrevivência. Assim, a par da recolha dos efectivos para a reprodução *ex situ*, os habitats também seriam intervencionados de modo a promover a manutenção da qualidade e conectividade hídrica.

Tendo em consideração todas as questões enunciadas anteriormente, e no caso das populações intervencionadas pela equipa MARE-ISPA, foi desenvolvida uma abordagem naturalista inovadora, distinta dos protocolos convencionais de aquacultura de espécies piscícolas, assente em quatro princípios fundamentais (Sousa-Santos, Gil et al., 2014): 1) ocorrência natural das posturas, sem fertilização artificial nem indução hormonal; 2) disponibilização de refúgios para larvas e juvenis; 3) condições naturais de luz e temperatura (tanques ao ar livre); e 4) mínima intervenção humana. A abordagem naturalista adoptada tem várias vantagens que constituem estímulos importantes no desenvolvimento das gónadas e na desova: exposição ao fotoperíodo natural e ao conseqüente aumento das horas de luz, exposição às oscilações naturais de temperatura e

à precipitação (com as oscilações de pH que lhe estão associadas e às quais os peixes estão adaptados) e produção natural de fito e zooplâncton que serve de alimento, especialmente, às fases iniciais de vida dos peixes (Gil, Sousa-Santos, et al., 2010; Sousa-Santos, Gil et al., 2014). Esta abordagem não é, no entanto, isenta de riscos, uma vez que todo o processo de reprodução decorre de forma natural, ou seja, pode nem ocorrer de todo. No entanto, os indivíduos mantêm os comportamentos naturais da espécie, o que é fundamental para a sua posterior libertação.

Apesar da metodologia deste programa de reprodução *ex situ* e os primeiros resultados terem sido já descritos em Sousa-Santos, Gil et al. (2014), os resultados dos restantes 10 anos de atividade não foram ainda apresentados. É, por isso, relevante descrevê-los também aqui no âmbito desta tese.

Material e Métodos

O *Programa de Conservação Ex situ de Organismos Fluviais* teve como objectivo a reprodução em cativeiro, com a mínima intervenção humana possível, de seis espécies de peixes de água doce nativas de Portugal, com as categorias de ameaça Criticamente em Perigo- CR e Em Perigo – EN (Rogado et al., 2005), entre as quais *Iberochondrostoma lusitanicum* (CR). De acordo com a literatura disponível para esta espécie, existe uma diferença genética clara entre as várias populações ao longo da área de distribuição conhecida (Alves & Coelho, 1994; Coelho et al., 1997; Mesquita et al., 2001; Robalo, Almada et al., 2007, 2008; Sousa et al., 2008) o que confirmou a necessidade de se tratar cada uma como uma unidade evolutiva diferente (Sousa-Santos, Gante, et al., 2014).

Seguindo o protocolo descrito em (Gil, Sousa-Santos, et al., 2010), foram capturados 30 indivíduos adultos (sempre que possível) para fundar o *stock* de reprodutores em cativeiro (Tabela 2.1) para cada uma das espécies/populações alvo. A partir de 2013, aos indivíduos capturados juntou-se também um conjunto de indivíduos do *stock* de reprodução em cativeiro anterior.

Tabela 2.1

Número de indivíduos fundadores dos stocks de reprodução ex situ de Iberochondrostoma lusitanicum entre 2009 e 2019.

Ano início lote	N.º Inicial de indivíduos	Rio
2009	53W	Samarra
2009	10W	Sado
2010	30W	Lage
2013	30W+ 30ES	Sado
2013	30W+ 30ES	Lage
2016	30W+ 30ES	Sado
2019	19W+30ES	Sado

W- Indivíduos selvagens capturados em cada bacia

ES- indivíduos reproduzidos em cativeiro na geração anterior e que permaneceram em cativeiro para contribuir para o *stock* de reprodução seguinte.

Estes indivíduos foram mantidos em tanques separados e sem comunicação entre si, e reproduziram-se de forma natural por três gerações consecutivas. Estas capturas foram realizadas com recurso à técnica de pesca elétrica, já descrita no capítulo anterior. Após três épocas de reprodução e antes do início da época seguinte, foram capturados novos *stocks* de reprodutores e libertados os reprodutores originais e toda a sua descendência. Considera-se importante salientar que todos os indivíduos foram libertados nos rios onde os reprodutores foram capturados (e sempre que possível nos locais exactos), no sentido de reforçar o efectivo da população e minimizar o seu risco de extinção. A utilização dos peixes criados em cativeiro para repovoar outros rios seria, não só eticamente reprovável, como, na prática, uma translocação de populações, com um impacto ecológico e genético nas populações de destino (Arthington, 1991). As populações alvo foram seleccionadas de entre as que apresentavam as piores condições de habitat e reduzidos valores de diversidade genética (Sousa-Santos et al., 2016). Os locais onde decorreram estas acções de repovoamento foram, na sua maioria, alvo de acções de reabilitação de habitats recorrendo a técnicas de engenharia natural, embora nem sempre se tenha conseguido garantir a melhoria da qualidade da água, apesar dos esforços encetados com os proprietários dos terrenos e entidades responsáveis.

O transporte foi realizado em tanques com arejamento constante e volume de água adequado à densidade (seguindo a regra de albergar um peixe em cada dois litros de água,

para exemplares com cerca de 10cm), para minimizar o *stress* e possíveis danos corporais. Ao chegarem às instalações do AVG, os peixes foram transferidos para os tanques de reprodução (3000L; 500 x 195 x 32 cm) (Figura 2.1). Estes tanques de cimento encontram-se ao ar livre, são revestidos a resina epóxi, possuem arejamento e circulação de água constantes e um sistema de filtros sucessivos que impede a libertação acidental de ovos e larvas para o sistema natural. Por estarem ao ar livre, de modo a reproduzir ao máximo as condições naturais de luz e temperatura, não foram utilizados termostatos para manutenção de temperatura, nem um regime de luz artificial. Nestes tanques foram, também, colocados tijolos e plantas aquáticas para fornecer abrigo e esconderijo aos indivíduos, especialmente para os indivíduos adultos.



Figura 2.1- Tanque de reprodução de *Iberochondrostoma lusitanicum* (população do Sado).

Foi fornecida alimentação diariamente, composta por mexilhão, camarão e ervilhas picados. Ocasionalmente foi dada comida comercial em flocos, artémia viva e larva de mosquito vermelho (Gil, Sousa-Santos et al., 2010; Sousa-Santos, Gil et al., 2014). As larvas e juvenis alimentaram-se, na sua fase inicial, de zoo e fitoplâncton que ocorre naturalmente nos tanques, sem necessidade de serem alimentados com microalgas

ou rotíferos, como descrito noutros protocolos de reprodução em cativeiro (Sousa-Santos, Gil, et al., 2014). De acordo com o descrito em Sousa-Santos, Gil et al. (2014) a alimentação foi oferecida sempre em pontos diferentes do tanque para evitar a habituação e a criação de dependência no que concerne à obtenção de alimento, uma vez que o objectivo final é a devolução dos reprodutores e dos seus descendentes aos trechos de rio de origem sem que estes tenham adquirido comportamentos decorrentes de domesticação.

Antes da época de reprodução (Fevereiro ou Março), os tanques destinados à reprodução das espécies-alvo foram totalmente esvaziados para limpeza e os peixes (assim como todos os materiais de enriquecimento ambiental: tijolos e plantas aquáticas) foram transferidos para novos tanques, previamente preparados. Por ocasião destas limpezas anuais, efectuaram-se também os censos anuais dos peixes existentes em cada tanque de reprodução, sendo a única altura do ano em que estes são manipulados. Aproveitando a transferência para um novo tanque, os peixes foram contados, inspeccionado o seu estado geral de saúde (detecção de eventuais feridas ou parasitas) e um subgrupo de 50 indivíduos escolhidos aleatoriamente foi pesado e medido (comprimento à furca) para obtenção de dados de rotina e integração na base de dados de seguimento dos tanques mantida pelo AVG. A contagem efectuada permitiu ainda avaliar o sucesso da época de reprodução anterior, numa altura em que os juvenis já atingiram um comprimento que possibilita a sua manipulação sem riscos.

No início da época de reprodução, foram colocadas várias meadas de lã em cada tanque para que, a par da vegetação aquática, servissem de local de postura e permitissem uma rápida verificação da ocorrência de ovos, uma vez que estes têm a particularidade de possuírem uma casca aderente à textura tanto da vegetação aquática como das meadas de lã (que funcionam como “*spawning mops*”).

No geral, importa salientar que, de acordo com este método, a reprodução se processa da forma mais natural possível, não havendo manipulação dos indivíduos reprodutores, nem administração de hormonas para acelerar a maturação de gónadas e induzir a reprodução, nem mesmo a remoção dos ovos/larvas para tanques ou aquários distintos dos aquários dos adultos. Durante a época de reprodução os tanques foram verificados diariamente para registo do dia exacto das posturas e para, nessa altura, serem colocadas nos tanques as estruturas que serviriam de refúgio às larvas recém eclodidas (Figura 2.2). Após as posturas, as meadas de lã contendo ovos aderentes foram colocadas dentro destas estruturas para que as larvas, após a eclosão, não fossem predadas pelos

adultos (simulando o que ocorre nas populações selvagens, nas quais as larvas procuram refúgio nos interstícios existentes nas raízes e plantas aquáticas). As estruturas consistiram numa armação cúbica revestida com rede em 5 das suas faces e que impedia a entrada dos indivíduos adultos, minimizando a predação dos ovos e, mais tarde, das larvas. As larvas tinham, por isso, a possibilidade de permanecer no interior das estruturas ou de sair pelas malhas para a restante área do tanque, o que permitia evitar o relaxamento da seleção natural: as larvas com comportamento mais explorador que saíssem da estrutura (tal como acontece na natureza, quando saem dos seus refúgios nas raízes e plantas aquáticas), estariam mais sujeitas à predação.



Figura 2.2- Maternidade usada para manter uma sub-amostra da postura da população de *Iberochondrostoma lusitanicum*, em 2021 (ver Cap. III).

Antes de cada evento de libertação, foi retirada uma pequena porção da barbatana dorsal aos indivíduos reprodutores e aos seus descendentes, para marcação (Katano & Uchida, 2006; Thompson et al., 2005) e, também, para armazenamento no banco de tecidos para análises genéticas do ISPA (Wasko et al., 2003). O corte da barbatana é utilizado como método de marcação pois esta, ao regenerar, preserva a cicatriz do corte

sob a forma de uma ténue linha horizontal que atravessa os raios, o que permite a distinção entre indivíduos marcados e não marcados. Optou-se por este método para marcar todos os indivíduos nascidos em cativeiro por ser de fácil execução na manhã do dia em que são retirados no tanque de reprodução e transportados para o local de libertação no meio natural, permitindo o processamento rápido de centenas de indivíduos. Após esse procedimento, os indivíduos foram transportados para o mesmo rio onde foram capturados e onde se implementaram medidas de recuperação do habitat e da qualidade da água. Nesta mesma altura, foi capturado, noutra(s) ponto(s) do mesmo rio, um novo conjunto de reprodutores selvagens para fundar um novo *stock* em cativeiro.

Os indivíduos reprodutores e seus descendentes permaneceram nos tanques de reprodução, no máximo, durante três épocas de reprodução consecutivas de modo a minimizar eventuais efeitos deletérios da reprodução em cativeiro (Ford, 2002; Håkansson, 2004; Woodworth et al., 2002), designadamente a perda de diversidade genética por efeitos de deriva e endogamia. Este princípio fundamental de libertação de todo o *stock* criado em cativeiro após três gerações consecutivas (e fundação de novos *stocks* com novos reprodutores selvagens), só não foi possível em anos em que os caudais dos rios apresentavam níveis incompatíveis com a manutenção de populações saudáveis, devido à reduzida precipitação dos Invernos anteriores e, também, em rios em que a qualidade da água ou do habitat ainda não apresentava melhorias significativas e, portanto, não ofereciam garantia de sobrevivência aos peixes a libertar.

Resultados

Ao longo dos 12 anos de reprodução aqui descritos, foram recolhidos indivíduos reprodutores de três populações ameaçadas de *I. lusitanicum*: Samarra (2009-2010), Lage (2014-2015) e Sado (2009-2023). Nem todas as populações foram mantidas em cativeiro durante o período em estudo (2009-2023) uma vez que apresentavam diferentes graus de ameaça (maior risco de extinção local por escassez de água no Sado e menor risco nas restantes populações). Os dados referentes à fundação de cada *stock* e às ações de repovoamento efectuadas são apresentados na Tabela 2.2. Como regra imposta pelo ICNF para uma espécie Criticamente em Perigo, o *stock* inicial de reprodutores selvagens deveria ter, no máximo, 30 adultos, que também é o número mínimo aconselhado para minimizar os efeitos genéticos negativos. No entanto, em 2009, só foi possível capturar 10 indivíduos da população do Sado (sub-bacia de Grândola), pois o efectivo

populacional era extremamente reduzido nos locais prospectados. Para obviar este problema, que poderia repetir-se, e para que o *stock* inicial fosse maior (mitigando eventuais efeitos de deriva, teoricamente bastante mais pronunciados em populações pequenas), foi decidido implementar uma alteração ao protocolo inicial: ao grupo de 30 reprodutores selvagens juntou-se um grupo de 30 peixes nascidos em cativeiro a partir do *stock* anterior, que ao invés dos restantes, permaneceram no tanque e não foram libertados no rio de origem nessa ação de libertação. Assim, os *stocks* passaram a ser fundados com um total de 60 indivíduos: 30 selvagens (W - wild) e 30 nascidos em cativeiro (ES- reproduzidos *ex situ*), excepto em 2019, quando foi possível capturar somente 19 indivíduos selvagens.

Tabela 2.2

Populações de Iberochondrostoma lusitanicum em reprodução no Aquário Vasco da Gama em cada ano do programa.

Ano início lote	N.º Inicial de indivíduos	Data libertação	Rio	Total indivíduos libertados
2009	53W	2011	Samarra	83
2009	10W	2013	Sado	290
2010	30W	2013	Lage	453
2013	30W+ 30ES	2016	Sado	1146
2013	30W+ 30ES	2016	Lage	390
2016	30W+ 30ES	2019	Sado	282
2019	19W+30ES	2023	Sado	544

Nota:

W- Indivíduos selvagens capturados em cada bacia

ES- indivíduos reproduzidos em cativeiro na geração anterior e que permaneceram em cativeiro para contribuir para o *stock* de reprodução seguinte.

Entre 2009 e 2023, foram libertados nos rios de origem dos *stocks* mantidos em cativeiro 3188 indivíduos: 83 na ribeira da Samarra, 843 na ribeira da Lage e 2262 no rio Sado (Tabela 2.2). Das três populações de *I. lusitanicum* mantidas em cativeiro, apenas a do Sado e a da Lage foram refundadas, por manutenção das pressões que podiam levar à sua extinção no meio natural. O *stock* de reprodutores selvagens da Samarra fundado em 2009, foi libertado dois anos depois, em conjunto com os seus 53 descendentes (Tabela 2.2). O primeiro *stock* de reprodutores selvagens da ribeira da Lage foi fundado em 2010

e libertado três anos depois, na primeira ação de repovoamento realizada neste local, com a libertação de um total de 453 indivíduos (Tabela 2.2). Por continuar a ser necessário salvaguardar esta população, foi fundado um segundo *stock* em cativeiro, composto por 30 peixes nascidos no ano anterior no AVG (e que não foram libertados na natureza como aconteceu aos restantes) aos quais se juntou um grupo de 30 peixes selvagens capturados na ribeira da Lage. Este segundo *stock* e os seus descendentes (N=390) foi libertado três anos depois (Tabela 2.2), não se justificando a fundação de um terceiro *stock* por manifesta melhoria das condições ambientais no meio natural. Finalmente, no que diz respeito, à população do rio Sado (ribeira de Grândola), o primeiro *stock* foi fundado em 2009 e, depois desse, houve necessidade de refundar o *stock* em cativeiro por três vezes (em 2013, 2016 e 2019), tendo sido efectuadas quatro ações de repovoamento desta população com um total de 2262 indivíduos (Tabela 2.2).

Os números de indivíduos nascidos em cativeiro ao longo do período em estudo estão representados na Figura 2.3, onde se apresentam todas as populações e *stocks* de reprodução. Estes números representam apenas os indivíduos nascidos em cativeiro, tendo sido subtraído o número de reprodutores de cada *stock* ao número total de indivíduos presente no tanque antes da sua libertação na natureza. Pode constatar-se que a população da Samarra, tendo somente um *stock* de reprodução entre 2009 e 2011 (duas épocas de reprodução), produziu num número reduzido de descendentes (30 indivíduos). A população da Lage teve dois *stocks* de reprodução (2010-2013 e 2013-2016) com um total de 453 e 330 indivíduos reproduzidos, respectivamente. Para a população do Sado, com quatro *stocks* de reprodução, o *stock* com maior número de descendentes foi o segundo (1116 indivíduos), seguido do último *stock* (525 indivíduos). O primeiro e terceiro *stocks* foram, comparativamente, menos produtivos, mas, ainda assim, com um total de 310 e 252 indivíduos, respectivamente.

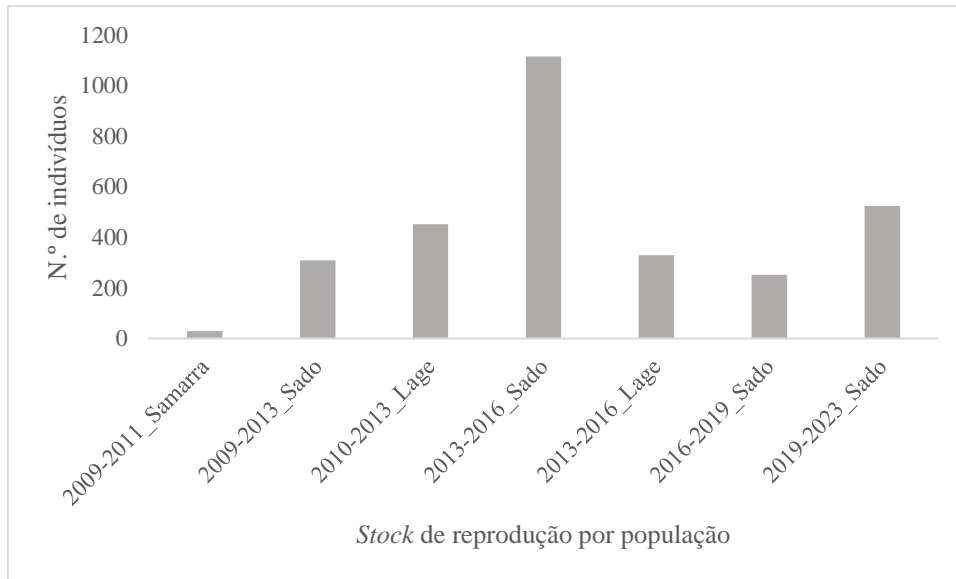


Figura 2.3- Número de indivíduos de *Iberochondrostoma lusitanicum* nascidos em cativeiro, por *stock* de reprodução e população.

As contagens efectuadas aquando das limpezas dos tanques (censos anuais) permitem aferir o recrutamento nas sucessivas épocas de reprodução de cada *stock*, sobretudo para as populações-alvo cujos *stocks* foram refundados em cativeiro (quatro *stocks* para a população do Sado - Figura 2.4 - e dois *stocks* para a população da Lage), uma vez que para estas foram obtidos dados de várias gerações consecutivas. Na Figura 2.4 podem observar-se os números de indivíduos contabilizados em cada censo anual efectuado para os quatro *stocks* fundados com indivíduos da população do Sado. O número de indivíduos apresentado na primeira coluna de cada gráfico representa somente o total de reprodutores selvagens capturado para fundar o respectivo *stock* em cativeiro (ano 0). Nas colunas seguintes, são apresentados os valores das contagens de indivíduos presentes no tanque de reprodução (censos anuais: ano 1 a 4, dependendo do número de gerações nascidas a partir do *stock* considerado). De um modo geral, pode observar-se uma estabilização do número de indivíduos a partir da terceira geração nascida em cativeiro, com as primeiras gerações com números mais baixos do que as últimas.

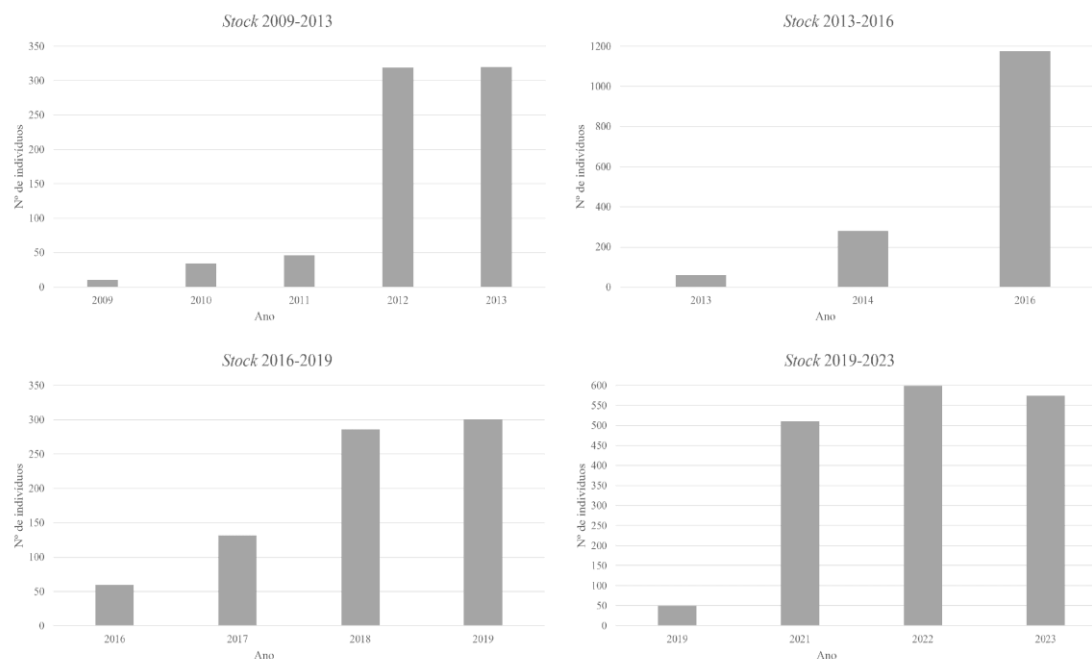


Figura 2.4- Censos anuais realizados para os quatro *stocks* da população de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Sado mantidos em cativeiro no AVG (2009-2013, 2013-2016, 2016-2019 e 2019-2023). O primeiro ano de cada *stock* corresponde ao número inicial de reprodutores e os restantes referem-se ao número total de indivíduos presentes no tanque no ano em questão (reprodutores e seus descendentes).

Mais especificamente, considerando somente os valores dos incrementos de uma geração para a seguinte, para a população do Sado (Figura 2.5), pode observar-se que o número de indivíduos nascidos na primeira geração não é muito elevado em três dos quatro *stocks* (incrementos de 24, 219 e 72 indivíduos), mas o *stock* 2019-2023 teve o incremento mais elevado na primeira geração (462 indivíduos). No *stock* 2009-2013, a geração com maior incremento foi a terceira (273 indivíduos), enquanto nos *stocks* 2013-2016 e 2016-2019 foi a segunda geração (incrementos de 897 e 154 indivíduos, respectivamente). O *stock* 2019-2023 apresentou uma tendência inversa aos anteriores, apresentando na primeira geração o maior incremento (462 indivíduos) e decrescendo nas duas gerações seguintes (incremento de 88 indivíduos, na segunda geração, e decréscimo de 25 indivíduos na terceira). Em três dos quatro *stocks*, a terceira geração foi a que produziu menos descendência.

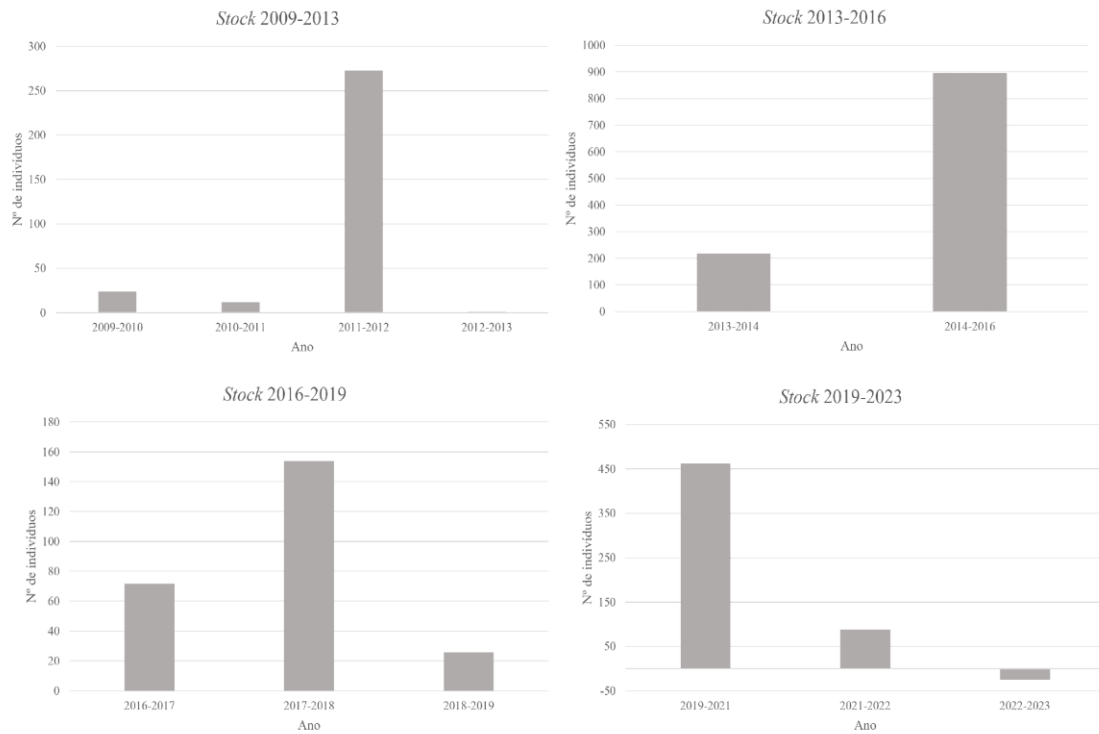


Figura 2.5- Valores incrementais para a população de *Iberochondrostoma lusitanicum* do Sado, entre gerações consecutivas, para os vários *stocks* de reprodução estabelecidos em cativeiro.

No caso da população da Ribeira da Lage, o *stock* 2010-2013 só teve um censo, sendo que, em três gerações (2010 a 2013), passou de 30 indivíduos (reprodutores) para 483 (reprodutores e descendência). Para o *stock* 2009-2013 (Figura 2.6), a evolução foi semelhante à observada para o *stock* 2019-2023 da população do Sado, tendo acontecido o maior incremento na primeira geração e reduzido nas gerações seguintes (incrementos de 239, 38 e 53 indivíduos, respectivamente).

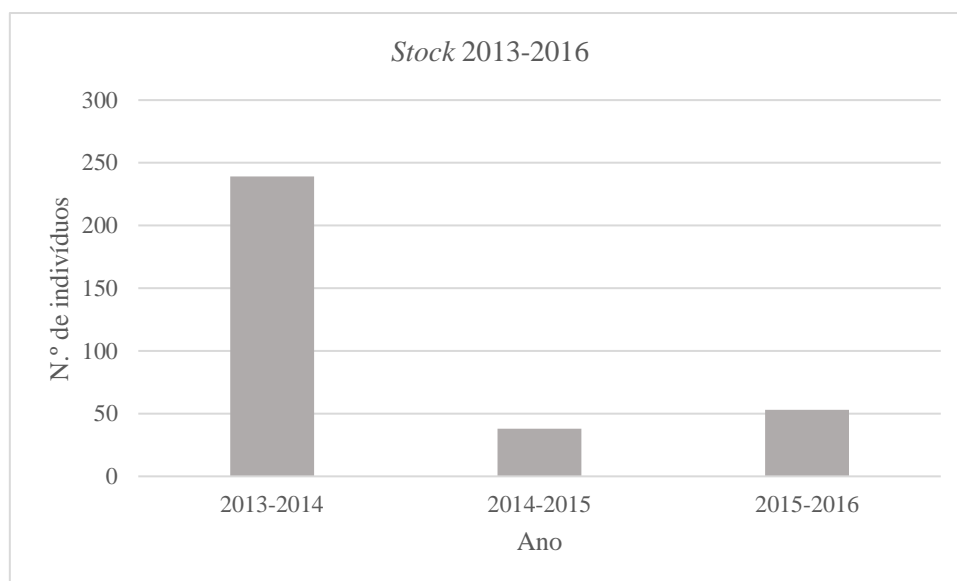


Figura 2.6- Valores incrementais para a população de *Iberochondrostoma lusitanicum* em cativeiro da ribeira da Lage, para o segundo *stock* de reprodução, 2013-2016.

Principais conclusões

Os dados apresentados neste capítulo vêm complementar os publicados por (Sousa-Santos, Gil, et al., 2014).

A boga-portuguesa parece responder bem ao ambiente artificial do cativeiro e apresenta elevados números de descendentes. No entanto, registou-se uma tendência de estabilização dos números de indivíduos nascidos em cativeiro por volta da terceira geração.

Em relação à população de *I. lusitanicum* do Sado que tem vindo a ser reproduzida no programa, os números de indivíduos nos tanques, ao longo dos anos de reprodução de cada *stock*, parecem indicar um aumento gradual. No entanto, se observarmos a mesma informação, mas representada pelos incrementos entre anos, percebemos que nem todos os *stocks* se comportam da mesma forma. Existem anos em que em que o valor do incremento registado entre duas gerações consecutivas vai aumentando com as gerações em cativeiro (raramente ultrapassando as três gerações como explicado anteriormente) e no *stock* 2019-2023 acontece o inverso: o maior incremento aconteceu nos primeiros dois anos de reprodução em cativeiro, embora não se saiba se no primeiro ano ou no segundo, uma vez que o censo foi realizado somente no segundo ano. Um padrão semelhante foi

observado na população da Lage, *stock* 2013-2014. Esta diferença pode estar relacionada com a estrutura populacional do grupo inicial de reprodutores, designadamente, com um desequilíbrio do *ratio* entre fêmeas e machos. Esta questão foi, algumas vezes, impossível de contornar uma vez que a captura de reprodutores selvagens ocorreu antes da época de reprodução (para minimizar a perturbação das populações selvagens), quando os indivíduos não exibem caracteres sexuais secundários que permitam a identificação do sexo. Por exemplo, para o *stock* 2009-2013 do Sado, o primeiro ano de reprodução apresentou números relativamente baixos o que pode ter a ver com o número muito reduzido de reprodutores que foi possível capturar, especialmente, o número de fêmeas que, neste caso, foi possível identificar (em dez indivíduos, três eram fêmeas e sete eram machos). Em 2011, o número reduzido de indivíduos no tanque, pode ter sido devido a predação dos adultos e também de uma enguia que foi posteriormente encontrada neste tanque. É expectável que, depois dos primeiros eventos de reprodução, com o aumento do número de indivíduos, os *sex ratios* tenham tendência a equilibrar-se, com a contribuição dos descendentes que atingem a idade adulta. Com o aumento da densidade no tanque, ainda que abaixo da densidade máxima aceitável para o tamanho dos tanques, aumenta a probabilidade de ocorrência de predação dos ovos e larvas pelos indivíduos adultos, por ser um recurso alimentar de fácil obtenção, mesmo tendo sido colocados no tanque refúgios para larvas e juvenis onde os adultos não conseguem entrar. Neste aspecto em particular, este método semi-naturalista de reprodução *ex situ* permite a mimetização do repertório comportamental dos indivíduos selvagens no que respeita à predação, comportamento de fuga e procura de refúgio, com as decorrentes consequências em termos de seleção natural dos menos aptos, o que é um aspecto extremamente positivo para os objectivos de um Projecto que visa reforçar os efectivos populacionais selvagens com peixes não domesticados e capazes de sobreviver no meio natural.

A reprodução em *ex situ* pode trazer algumas desvantagens a nível comportamental, genético e morfológico (Blanchet et al., 2008). Em relação às alterações comportamentais, por exemplo, nos seus habitats, a boga é sujeita a períodos com um caudal muito turbulento e volumoso em períodos de chuvas intensas. Em cativeiro não existe este constrangimento e podem estar a ser seleccionados indivíduos que não têm no seu repertório os comportamentos relacionados com a capacidade de sobreviver neste contexto. Outra alteração desvantajosa é o desenvolvimento de comportamentos agressivos em espécies que no meio natural não o apresentam (Blanchet et al., 2008).

Uma vez que os indivíduos não precisam de gastar tempo e energia na procura activa de alimento, podem passar a empregar esse tempo em comportamentos competitivos com os outros indivíduos. Também é possível que os indivíduos nascidos em cativeiro não sejam capazes de reconhecer os predadores e também os tipos de alimento naturais (Blanchet et al., 2008; McPhee, 2004). Em relação à capacidade de os indivíduos reconhecerem o seu alimento natural, no caso do programa de reprodução de *I. lusitanicum*, os indivíduos nas primeiras fases de desenvolvimento alimentam-se de fito e zooplâncton que ocorre naturalmente nos tanques de reprodução, embora o mesmo não aconteça para os juvenis/adultos. Uma solução para este problema seria a produção em aquário de espécies de invertebrados/zooplâncton, existentes nos habitats desta espécie, para que fossem fornecidos como alimento vivo aos indivíduos durante o seu tempo em cativeiro. Deste modo os adultos manteriam o seu comportamento natural de alimentação e os juvenis poderiam continuar a alimentação de espécies vivas que faziam desde o estado larvar.

Existem também desvantagens a nível genético como são os efeitos da consanguinidade, perda de diversidade genética, alterações das frequências alélicas ou introdução de alelos deletérios nas populações selvagens resultante de adaptação genética ao cativeiro (Blanchet et al., 2008; Woodworth et al., 2002). No que diz respeito às alterações genéticas, são utilizadas algumas medidas de salvaguarda como, por exemplo, confirmação se os indivíduos adultos capturados para constituírem o *stock* inicial de reprodutores selvagens não são garantidamente peixes nascidos em cativeiro libertados anteriormente no local. Sendo que todos os indivíduos mantidos em cativeiro são marcados com o corte total da barbatana dorsal antes de serem libertados, há uma forma de garantir que nas próximas capturas de reprodutores, não se apanham os mesmos indivíduos pois esse corte deixa uma pequena cicatriz quando a barbatana regenera. Assim, é possível controlar que não se está a usar o mesmo *pool* genético dos anos anteriores e minimizar um dos tipos de efeitos negativos da reprodução em cativeiro. Em cada *stock* de reprodução são também introduzidos indivíduos selvagens juntamente com um lote de indivíduos reproduzidos em cativeiro do *stock* anterior e que está de acordo com o que foi proposto por Woodworth et al. (2002). A estas medidas juntam-se ainda as condições naturalistas dos tanques, que tentam minimizar os efeitos de adaptação genética ao cativeiro, mantendo as condições o mais próximas possível do habitat natural (Woodworth et al., 2002). Uma medida adicional que se pode implementar para tentar mitigar os efeitos negativos é, por exemplo, a libertação dos indivíduos reproduzidos em

cativeiro logo em fases iniciais do desenvolvimento, i.e., no primeiro ano, para limitar a exposição deste indivíduos às pressões seletivas do cativeiro (Kraaijeveld-Smit et al., 2006; Salonen & Peuhkuri, 2006). No entanto, como já foi referido, nem sempre o habitat apresenta as condições necessárias para que os indivíduos capturados, e os seus descendentes, possam ser libertados.

Em relação às alterações morfológicas, existem estudos que evidenciam alterações em alguns caracteres morfológicos de peixes criados em cativeiro, nomeadamente na dimensão da cabeça e das barbatanas peitorais (Blanchet et al., 2008), no entanto, no presente trabalho não foram registadas características morfológicas que permitissem a comparação entre indivíduos selvagens e de cativeiro. Este pode ser um procedimento a implementar para que se possa perceber se existem alterações significativas desses caracteres neste programa de reprodução *ex situ*.

A estes dados é importante acrescentar estudos sobre a diversidade genética dos indivíduos nascidos em cativeiro. Dados genómicos preliminares obtidos para três gerações consecutivas de *Achondrostoma occidentale*, indicam que existe uma perda de diversidade bastante reduzida (Com. Pessoal Sousa-Santos). Outro tipo de estudos importantes são estudos comportamentais para aferir se o ambiente artificial, embora o mais naturalista possível, altera o que seria o comportamento habitual desta espécie.

A articulação estabelecida entre a academia, as autarquias locais e a sociedade civil, deu uma visibilidade bastante maior ao problema da perda de Biodiversidade associada à degradação dos ecossistemas fluviais e, sobretudo, permitiu estabelecer uma rede de contactos para sinalização de situações anómalas (como mortalidade inesperada de grandes números de peixes ou descargas poluentes) e agilização de medidas para as solucionar. No entanto, é ainda muito difícil que se consigam implementar medidas adequadas a longo prazo.

Capítulo III – Desenvolvimento embrionário e larvar

Enquadramento

As fases iniciais de desenvolvimento dos peixes constituem indicadores sensíveis de perturbações do ambiente e o seu conhecimento é fundamental para uma gestão adequada das populações (Legendre & Teugels, 1991).

O desenvolvimento embrionário dos peixes tem sido amplamente estudado no peixe-zebra *Danio rerio* Hamilton, 1822 devido à facilidade da sua reprodução em cativeiro, elevado número de ovos por postura, transparência dos ovos e rápido desenvolvimento (Gilbert & Barresi, 2016). No geral, após a fertilização, os ovos dos peixes apresentam dois polos, um com uma grande acumulação de vitelo (polo vegetativo) e o polo oposto com menor quantidade de vitelo (polo animal), onde está localizado o núcleo da célula. É neste último que ocorre a divisão celular, através de uma clivagem meroblástica discoidal, isto é, a divisão celular ocorre apenas numa pequena porção do citoplasma (no polo animal) (Gilbert & Barresi, 2016). Parte destas divisões pode ser observada através da membrana externa do ovo e podem identificar-se os períodos iniciais de desenvolvimento descritos por Kimmel et al. (1995), cuja nomenclatura constitui uma das referências mais comumente utilizadas para descrever a fase embrionária e cujas definições serviram de base, neste trabalho, para a descrição desta fase do desenvolvimento em *Iberochondrostoma lusitanicum*.

A descrição do desenvolvimento embrionário e das fases larvares foca-se em algumas características-chave ou estádios que marcam as diferentes etapas. Existem diferentes abordagens consoante os autores (Balon, 1975; Kimmel et al., 1995; Parichy et al., 2009), não sendo consensuais as características e designações utilizadas. No entanto, é possível conciliar abordagens complementares para melhor se descreverem as observações.

No que diz respeito ao desenvolvimento pós-embrionário, também designado por desenvolvimento larvar, Parichy et al. (2009) apresentam uma relação entre as alterações de diferentes características com o comprimento do embrião livre e da larva, por oposição a outros autores que consideram, principalmente, os dias após a eclosão. Aqueles autores recomendam duas formas de se estabelecerem os estádios, uma a que dão o nome de *composite staging* (faseamento composto) onde se atribui um comprimento padrão (CS)

e um marco de desenvolvimento a cada indivíduo num ponto no tempo. A outra, denominada como *standardized standard length staging*, também se baseia no comprimento padrão, mas comparativamente a medidas pré-estabelecidas.

As abordagens mais úteis para descrever o desenvolvimento embrionário e larvar de espécies ameaçadas são as que se baseiam na observação de caracteres externos e de fácil detecção e que não implicam o sacrifício dos indivíduos. Deste modo, estabelece-se um procedimento fácil de reproduzir para diferentes espécies, que requer manipulações pouco invasivas e com o menor risco de mortalidade possível. Para essas espécies, é fundamental conhecer o seu normal desenvolvimento embrionário e larvar, de modo a estabelecer-se uma linha basal de comparação para estudos futuros. Além disso, os estudos ontogenéticos permitem observar um conjunto de características que, por vezes, estão ausentes nos indivíduos adultos, contribuindo para um aperfeiçoamento da filogenia das espécies (Legendre & Teugels, 1991). Outra vantagem do conhecimento das fases larvares, no caso das espécies ameaçadas ou espécies raras, é o facto de permitir a identificação das larvas no campo, mesmo quando não se encontram os indivíduos adultos (Carrapato & Ribeiro, 2012).

Relativamente à cronologia do desenvolvimento, esta deve ser contextualizada com a temperatura uma vez que existe vasta bibliografia que demonstra a sua influência no comportamento reprodutor e na desova sendo, por isso, expectável que a cronologia do desenvolvimento, ou a duração dos estádios, seja igualmente passível de ser afetada por este parâmetro (Fraser et al., 2019; Pankhurst & King, 2010; Pankhurst & Munday, 2011; Wang et al., 2010). A literatura disponível sobre desenvolvimento embrionário e/ou larvar de peixes tem por base, maioritariamente, estudos que envolvem interferência humana directa na reprodução dos peixes (quer seja na manipulação da temperatura, do fotoperíodo ou na utilização de indução hormonal) e nas decorrentes alterações observadas nos embriões/larvas resultantes (e.g. Carrapato & Ribeiro, 2012; Osse & Van Den Boogaart, 1995; Puvaneswari et al., 2009). No presente estudo, pelo contrário, pretendeu-se seguir e descrever as fases iniciais do desenvolvimento da boga-portuguesa num contexto de mínima intervenção humana possível, enquadrado no projecto de conservação *ex situ* desta espécie (ver Cap. II para mais detalhes). Existiam já descrições de algumas das etapas do desenvolvimento embrionário e larvar da boga-portuguesa (Carvalho, 2001), mas em condições bastante diferentes da abordagem naturalista

adoptada pelo referido projecto (i.e., nenhum tipo de interferência na reprodução, sem controlo de temperatura, luz ou indução hormonal; ver Capítulo II).

Material e Métodos

Com o objectivo de se descrever as fases iniciais de vida de *I. lusitanicum*, foram utilizados indivíduos da população do Sado que tem vindo a ser reproduzida em cativeiro, no Aquário Vasco da Gama, de acordo com o protocolo seguido pelo Projecto de Conservação *Ex Situ* de Organismos Fluviais (descrito no Capítulo II). Foram recolhidos ovos de duas posturas que ocorreram nos dias 19 e 31 de Março de 2021.

O tanque foi monitorizado diariamente desde o final de Fevereiro para registo do dia exacto de cada postura, tendo sido colocadas meadas de lã (Figura 3.1) para deposição dos ovos, uma vez que estas mimetizam as abundantes raízes aquáticas que constituem o substrato preferencial de postura da espécie (Collares- Pereira et al., 2021).



Figura 3.1- Ovos de *Iberochondrostoma lusitanicum* numa das meadas de lã colocadas no tanque.

Após a detecção de ovos nas meadas de lã, uma parte das posturas foi transferida para uma maternidade, constituída por uma armação de metal (de dimensões aproximadas

36x25x20 cm), revestida por uma rede de malha muito fina e macia, que impedia a passagem mesmo das larvas mais pequenas e evitava eventuais lesões por atrito (Figura 3.2). A colocação dos ovos nestas estruturas garantiu que todos os indivíduos observados pertenciam à mesma postura e, por isso, apresentariam fases de desenvolvimento aproximadas. A colocação das maternidades no tanque de reprodução teve ainda as seguintes vantagens: a) permitir um acesso facilitado e rápido aos ovos e, posteriormente, às larvas; b) evitar a colocação dos ovos num ambiente com parâmetros físico-químicos distintos; e c) garantir a estabilidade da qualidade da água ao longo de todo o processo (mais difícil de manter caso se tivesse optado por colocar as posturas em aquários com volume muito mais reduzido do que os tanques de reprodução).



Figura 3.2- Vista do tanque de reprodução de *Iberochondrostoma lusitanicum* no Aquário Vasco da Gama (esquerda), onde é possível ver a estrutura circular que contém a maternidade (detalhe à direita).

Durante o desenvolvimento embrionário, as observações foram feitas diariamente e, a par disso, foram também registadas a temperatura da água (com um termómetro VWR *traceable waterproof*, referência 620-2099) e a hora da recolha dos ovos. Os ovos foram

recolhidos com o auxílio de uma pipeta e um copo e levados para o laboratório. Na fase de observação das larvas, a metodologia de recolha manteve-se idêntica, com excepção da utilização da pipeta: em vez desta, foi utilizado um copo para recolha dos indivíduos de forma a causar o mínimo de perturbação e dano aos mesmos. Para a observação dos embriões a partir do 4º dia AP (dia após a postura) e das larvas foi necessário utilizar um anestésico (50-100 µl de 2- Phenoxyethanol Sigma-Aldrich- referência 77699) diluído em etanol (0,3ml/ml) - concentração para anestesia: 1ml/L (Faria et al., 2010; Priborsky & Velisek, 2018). Ovos e larvas foram observados diariamente com um estereomicroscópio Nikon (SMZ-2T), através do qual se realizaram várias medições ao 0,1 mm mais próximo. O registo fotográfico foi realizado com uma câmara Motic acoplada ao estereomicroscópio (Moticam 5+, 5.0 MP, USB 3.0). Foram utilizadas várias ampliações (1x, 2x, 3x e 4x) para observar e registar as diferentes características e estruturas o mais detalhadamente possível. Toda a informação acerca das ampliações usadas foi registada.

Ovos

Apesar de translúcidos, as características do córion dos ovos desta espécie impossibilitam a clara visualização de todas as características internas à transparência. Ainda assim, é possível distinguir algumas delas, bem como a existência ou não de movimento, incluindo o batimento cardíaco.

Devido ao número reduzido de ovos nas duas posturas, optou-se por observar os ovos à transparência até ao dia 4. Após este dia, com a observação de movimento no interior do ovo, decidiu-se sacrificar quatro exemplares nos dias seguintes (um por dia), de modo a observar algumas características impossíveis de visualizar através da membrana do ovo. Para isso utilizou-se o anestésico descrito acima, na mesma concentração, mas com a administração de maior volume ao longo de alguns minutos, até à paragem do batimento cardíaco. Após a observação, estes indivíduos foram fixados em formaldeído a 4% e, posteriormente, lavados e preservados em etanol a 70%. Estes exemplares encontram-se depositados nas colecções do Aquário Vasco da Gama.

Para cada ovo foram efectuadas as seguintes medições (directamente, recorrendo à objectiva calibrada do estereomicroscópio; ou, indirectamente, utilizando o programa Motic Images Plus 3.0 ML e imagens calibradas): diâmetro do ovo, diâmetro do saco

vitelino e dimensão do embrião. Devido à dificuldade de observação através da membrana externa do ovo, não foi possível atribuir todos os estádios, como descrito em Kimmel et al. (1995), seguindo-se, complementarmente, o trabalho de Faria et al. (2010) como base para a descrição dos eventos considerados relevantes para o desenvolvimento. Deste modo, apenas se considerou o aparecimento das características que se apresentam na Tabela 3.1 e o aspecto externo do ovo (forma, cor, tamanho).

Tabela 3.1

*Características e eventos ontogenéticos considerados de interesse na observação do desenvolvimento embrionário de *Iberochondrostoma lusitanicum*, adaptados de Faria et al. (2010) e Kimmel et al. (1995).*

<i>Ovo: Cor/forma</i>
<i>Blastodisco</i>
<i>Embrião reconhecível</i>
<i>Olhos: Pupila visível?</i>
<i>Diferenciação da notocorda</i>
<i>Vesícula auditiva: Visível/nº. otólitos</i>
<i>Cérebro</i>
<i>Sómitos (ou miótomos)</i>
<i>Movimentos do embrião</i>
<i>Ponta da cauda separada do vitelo</i>
<i>Prega média</i>
<i>Coração</i>
<i>Sangue</i>
<i>Pigmentos</i>
<i>Barbatana peitoral</i>
<i>Eclosão</i>

Larvas

Sendo que as posturas não resultaram no nascimento de um grande número de indivíduos, e considerando o estatuto de conservação desta espécie, optou-se por recolher uma só larva por dia e pela sua devolução à maternidade após as observações.

Após a eclosão, as larvas foram observadas diariamente durante as primeiras semanas (quatro semanas para os indivíduos da primeira postura e duas semanas para os

da segunda postura), mas, uma vez que se começou a observar um abrandamento no desenvolvimento, decidiu-se espaçar os dias de observação para não sujeitar os indivíduos a manipulações diárias causando, assim, perturbações desnecessárias. A periodicidade das observações realizadas para as duas posturas analisadas é apresentada na Tabela 3.2. No total, o acompanhamento da fase larvar (desde a eclosão até ao desaparecimento completo da prega média e aparecimento de escamas) estendeu-se ao longo de 3 meses.

Tabela 3.2

*Periodicidade das observações do desenvolvimento larvar das duas posturas de *Iberochondrostoma lusitanicum* analisadas. As contagens são feitas em dias após a eclosão (DAE).*

Observação diária	1. ^a Postura	2. ^a Postura
	1.º-26.º DAE (4 semanas)	1.º-14.º DAE (2 semanas)
Obs. 2 em 2 dias	26.º-59.º DAE (4 semanas)	14.º- 47.º DAE (4 semanas)
Obs. 3 em 3 dias	59.º-74.º DAE (2 semanas)	47.º- 62.º DAE (2 semanas)
Obs. 4 em 4 dias	74.º- 92.º DAE (3 semanas)	62.º- 80.º DAE (3 semanas)

As larvas levadas para o laboratório para observação foram anestesiadas (ver procedimento descrito acima) por forma a reduzirem os movimentos e poderem ser devidamente fotografadas, com inclusão de escala. Recorrendo às fotografias calibradas, foram efectuadas várias medições utilizando as ferramentas do *software* Motic Images Plus 3.0 ML. As observações foram efectuadas com uma combinação de luz incidente e transmitida que permitiu visualizar características externas (pigmentação, escamas, etc.) e internas (otólitos, miómeros, órgãos internos, diversas estruturas ósseas, etc.). Após o registo fotográfico e as medições, as larvas foram colocadas num recipiente com água limpa de modo a recuperarem totalmente da anestesia antes da sua devolução à maternidade no tanque.

Aquando da observação das larvas foram registadas as seguintes medidas: comprimento total, comprimento *standard* (CS- ponta do rostro até ao pedúnculo caudal), comprimento pré anal (da ponta do rostro até ao ânus), comprimento da cabeça, altura da cabeça, altura do tronco na zona do ânus, diâmetro do olho, dimensão da bexiga natatória e número de secções, dimensão do vitelo (Parichy et al., 2009).

Além dos registos morfométricos foram observadas outras características consideradas de interesse por Parichy et al. (2009), designadamente caracteres/estruturas cuja evolução é clara e passível de observação ao longo do período larvar (Tabela 3.3). Das abordagens apresentadas em Parichy et al. (2009), a seguida no presente trabalho é a primeira, faseamento composto. Escolheu-se esta abordagem, pois atribui uma descrição da fase associada a informação relacionada com o tamanho e que é única do indivíduo observado. Isto é particularmente útil quando se observam diferenças no aparecimento de caracteres e no crescimento (CS) entre indivíduos da mesma postura.

Tabela 3.3

Características consideradas de interesse para a descrição da fase larvar de Iberochondrostoma lusitanicum baseadas em Parichy et al. (2009).

<i>Forma da cabeça</i>
<i>Flexão urostilar</i>
<i>Bexiga natatória: enchimento/nº. Secções</i>
<i>Barbatanas médias: caudal, anal e dorsal</i>
<i>Barbatanas pélvicas</i>
<i>Prega média</i>
<i>Formação de escamas</i>
<i>Padrão de pigmentação: corpo e barbatanas</i>

Além das indicadas na Tabela 3.3, considerou-se importante observar algumas características adicionais, como a forma e cor do saco vitelino, a evolução dos olhos, o número de otólitos na vesícula auditiva e a presença de alimento no intestino.

Resultados

Foram analisados dois conjuntos de ovos resultantes, respectivamente, de uma primeira postura ocorrida a 19 de Março e de uma segunda postura ocorrida a 31 de Março de 2021.

Os valores relativos à temperatura da água do tanque no momento da colheita diária do ovo/larva para observação variaram, para a primeira postura, entre 13,4°C e

15,8°C ao longo do período experimental, com uma temperatura média de 14,86°C (Figura 3.3).

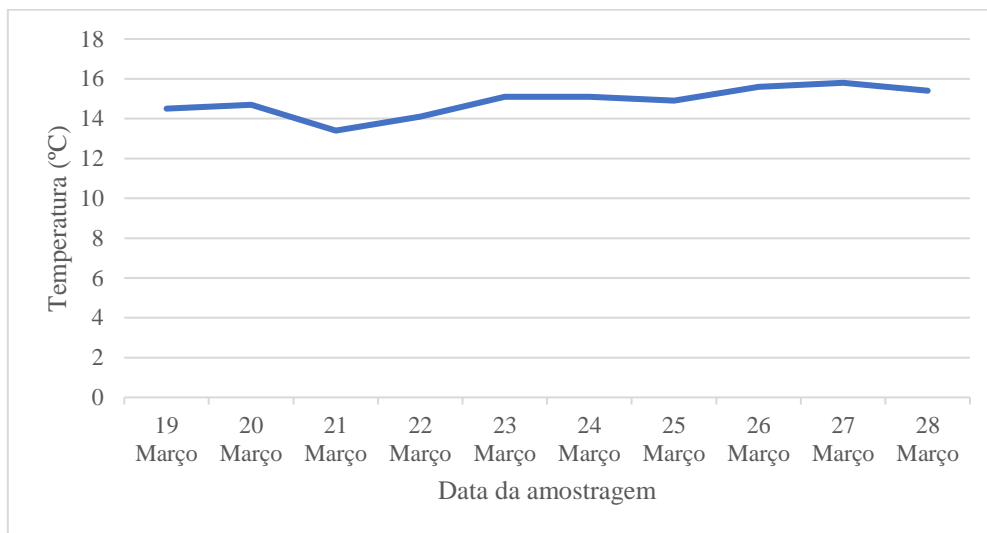


Figura 3.3 – Variação da temperatura da água durante a fase embrionária para a primeira postura de *Iberochondrostoma lusitanicum*.

Relativamente à segunda postura, as temperaturas registadas no momento da colheita diária do ovo/larva para observação variaram entre 15,7°C e 17,2°C, com uma temperatura média de 16,38°C (Figura 3.4).

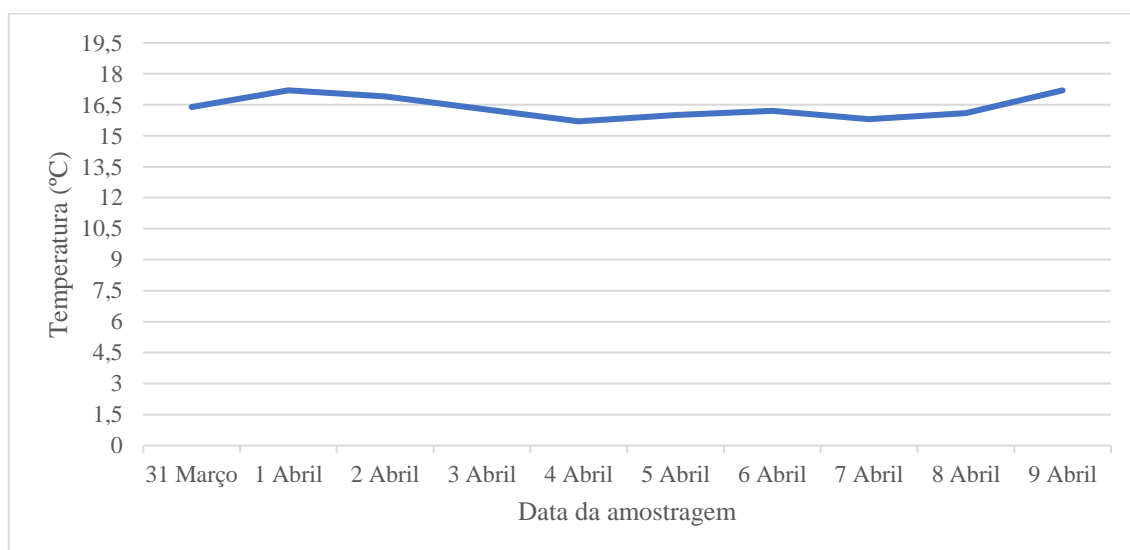


Figura 3.4 - Variação da temperatura durante a fase embrionária para a segunda postura de *Iberochondrostoma lusitanicum*.

A propriedade adesiva dos ovos (adaptação fundamental para evitar o arrastamento pela corrente nos habitats naturais) descrita para várias espécies de peixes estritamente dulciaquícolas (e.g. Carrapato & Ribeiro, 2012; Carvalho et al., 2003; Gil, Sousa-Santos et al., 2010) foi comprovada pela observação de posturas completamente aderentes às meadas de lã colocadas nos tanques (Figura 3.1). O mesmo aconteceu nas raízes da vegetação aquática também existente nos tanques. Esta característica adaptativa também foi observada nas maternidades, onde os ovos aderiram uns aos outros, bem como a detritos orgânicos e microalgas existentes no tanque.

Em termos macroscópicos, os ovos apresentavam, nas fases iniciais do desenvolvimento, uma coloração amarela (conferida pelo saco vitelino) e alguma transparência que permitia visualizar os contornos do saco vitelino e embrião, mas não o suficiente para que se observassem todas as fases iniciais. Ao longo do tempo foram atenuando a tonalidade da cor, ficando mais claros (Tabela 3.4).

Tabela 3.4

Descrição dos ovos de Iberochondrostoma lusitanicum analisados: cor, transparência e forma ao longo dos primeiros nove dias após postura.

Dia após postura	Cor do ovo		Transparência		Forma	
	1ª postura	2ª postura	1ª postura	2ª postura	1ª postura	2ª postura
0	amarelo	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica
1	amarelo	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica
2	amarelo	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica
3	amarelo	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica /elipsóide
4	amarelo-claro	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica
5	amarelo-claro	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica
6	amarelo-claro	amarelo	translúcido	translúcido	esférica	esférica/elipsóide
7	amarelo-claro	amarelo-claro	translúcido	translúcido	esférica	esférica/elipsóide
8	amarelo-claro	amarelo-claro	translúcido	translúcido	elipsóide	elipsóide
9*	amarelo-claro	-	translúcido	-	elipsóide	-

* neste dia, na segunda postura, a larva eclodiu no momento da observação pelo que não foi possível descrever estas características.

Ao aproximar-se a data da eclosão (nove dias após a postura para ambas as posturas) os ovos revelavam uma alteração do saco vitelino, de uma forma esférica para

alongada (Tabela 3.5), e maior transparência, o que facilitou a observação nesta fase. Em relação às dimensões do saco vitelino, não se pôde registrar um aumento ou diminuição, pois foi observado um ovo diferente em cada dia. Em todo o caso, os diâmetros variaram entre 0,92 mm e 1,20 mm, na primeira postura e 0,55 mm e 2,12 mm, na segunda postura (Tabela 3.5).

Tabela 3.5

*Dimensões e forma do saco vitelino durante a fase embrionária dos ovos da primeira e segunda posturas de *Iberochondrostoma lusitanicum*, com a indicação dos dias decorridos após a postura (DAP).*

DAP	1ª Postura		2ª Postura	
	Dimensão (mm)	Forma	Dimensão (mm)	Forma
0	1,14	Esférico	1,98	Esférica
1	0,95	Esférico	1,95	Esférica
2	1,23	Esférico	1,90	Esférica
3	1,20	Alongado	2,12	Esférica
4	1,15	Alongado	1,95	Alongada
5	1,00	Alongado	1,18/1,06	Alongada
6	1,02	Alongado	0,99/1,07	Alongada
7	0,92	Alongado	0,84/2,02	Alongada
8	0,87/1,13	Alongado	0,80/2,31	Alongada
9*	0,60/1,15	Alongado	0,55/2,81	Alongada

*dia da eclosão: dia 0 para a larva.

Por não ser possível a sua visualização detalhada, para alguns ovos em que o saco vitelino tem uma dimensão alongada só se apresenta uma medida, o diâmetro da parte esférica. A dimensão do saco vitelino variou entre 0,9 e 1,1 mm nos ovos da primeira postura e entre 1,9 e 2,8 mm na segunda postura (Tabela 3.5).

Na Tabela 3.6 apresentam-se os momentos em que ocorreram os principais eventos observáveis da fase embrionária, para as duas posturas. Entre estas duas houve uma diferença nos dias de ocorrência de cada evento: no caso da primeira postura, o embrião apresentava movimento ao segundo dia enquanto, na segunda postura, o mesmo se registou apenas ao quarto dia. A diferenciação do olho é aparente no primeiro dia para a primeira postura e, na segunda, somente ao quarto dia. No caso da diferenciação da notocorda, era aparente no primeiro dia para a primeira postura e ao terceiro dia na segunda.

Tabela 3.6

*Eventos da fase embrionária de *Iberochondrostoma lusitanicum* com o dia após a postura (DAP) em que foram observados pela primeira vez (dia 0 a dia 9).*

	1.^a postura (DAP)	2.^a postura (DAP)
Blastodisco	0	0
Embrião reconhecível	2	2
Olhos	1	4
Lente ocular/pupila	3	4
Cérebro	3	3
Diferenciação da notocorda	1	3
Vesículas auditivas	5	6
Otólitos (nº)	5 (2)	6 (2)
Início olho pigmentado	4	4
Sómitos (ou miótomos)	5	4
Movimentos embrião	2	4
Ponta cauda separada do vitelo	2	3
Prega média	2	4
Coração	5	5
Sangue	5	5
Pigmentos	7	8
Barbatana peitoral	7	7
Eclosão	9	9

Na Figura 3.5 está representada a evolução do ovo/embrião na segunda postura, onde se podem observar, alterações como o aparecimento dos olhos ou a existência da ponta da cauda separada do vitelo. Na fila de baixo, nos embriões pode observar-se a alteração no tamanho e forma do vitelo. Estão apresentadas duas imagens referentes ao dia 5 após a postura, pois nesse dia, após a observação do ovo, decidiu-se abri-lo para se observar o embrião no interior, uma vez que já apresentava movimentos.

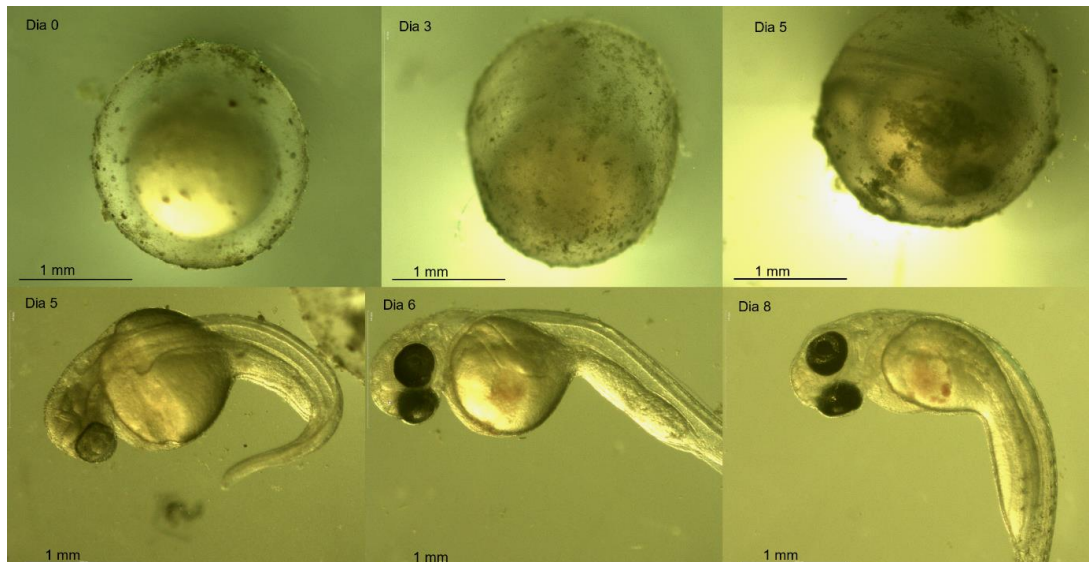


Figura 3.5 – Evolução ovo/embrião de *Iberochondrostoma lusitanicum* na segunda postura (objectiva 2x, ampliação 20x) nos dias 0, 3, 5, 6 e 8 após a postura.

Fase larvar

As larvas eclodiram ao nono dia após a postura, para ambos os conjuntos de ovos analisados. Durante a observação da fase larvar, a temperatura dentro de cada maternidade foi medida no momento da recolha da larva para observação: verificou-se que a temperatura média registada foi de 17,6°C (min. 15,4°C; max. 21,8°C) para a primeira postura (Figura 3.6) e de 17,9°C (min. 15,4°C; max. 21,8°C) para a segunda postura (Figura 3.7).

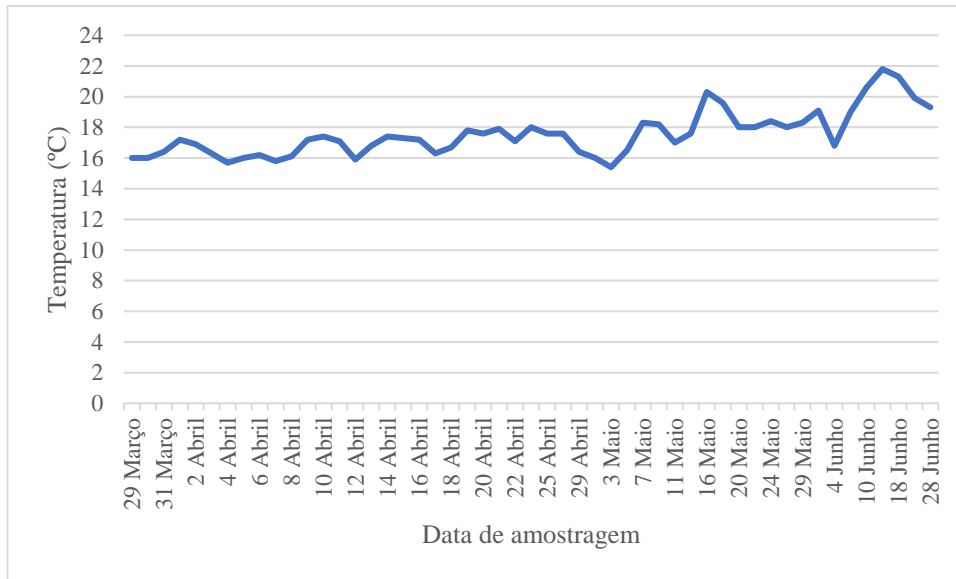


Figura 3.6 – Variação da temperatura da água do tanque ao longo da amostragem durante a fase larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*, para a primeira postura.

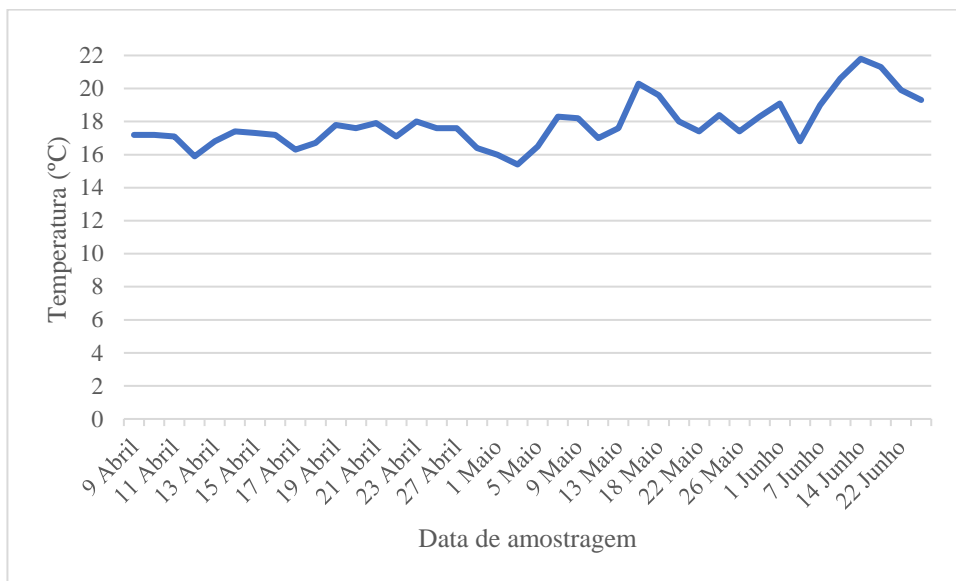


Figura 3.7 - Variação da temperatura da água do tanque ao longo da amostragem durante a fase larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*, para a segunda postura.

Larva recém eclodida

Ao eclodirem, as larvas apresentavam já um padrão inicial de pigmentação, apesar de ter um corpo translúcido, e cerca de 6,4 mm de CS (Figura 3.8). Nesta fase, a cabeça das larvas apresentava uma forma arredondada e a zona da boca encontrava-se na parte inferior da cabeça, junto ao saco vitelino.

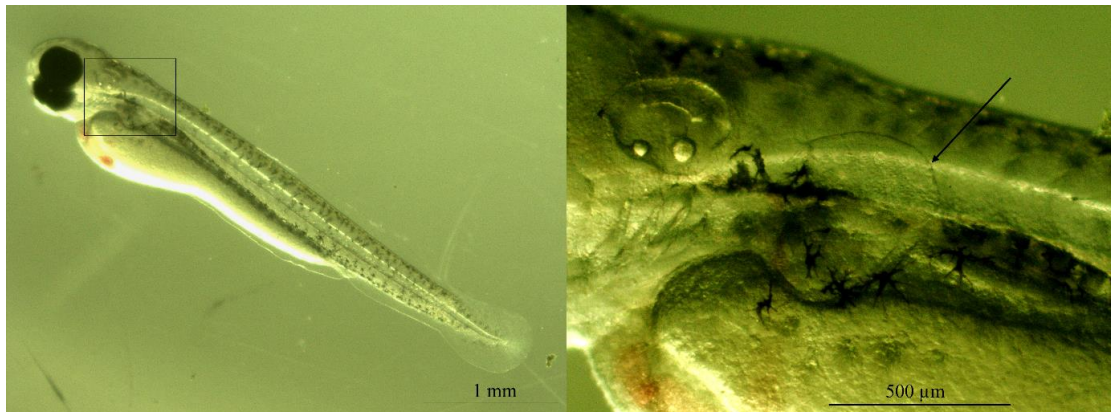


Figura 3.8 - Larva de *Iberochondrostoma lusitanicum* recém eclodida (esquerda) e detalhe da zona da barbatana peitoral já em formação (direita). É possível observar a forma da cabeça, o padrão de pigmentação inicial e a posição, forma e extensão do saco vitelino (CS= 6,4 mm; objectiva 2x- 20x ampliação na foto da larva e objectiva 4.8x- 48x ampliação no detalhe da barbatana peitoral).

O saco vitelino já não apresentava uma forma esférica, como acontecia na fase embrionária, sendo agora alongado desde a cabeça até à zona pré anal (Figura 3.8). Nesta fase, foi detectada a presença de uma estrutura, a prega média, que rodeava a larva desde a zona dorsal até ao saco vitelino, e um esboço das barbatanas peitorais: uma pequena estrutura arredondada na zona posterior da vesícula auditiva (Figura 3.8). Foi igualmente possível observar-se a circulação de sangue e o batimento cardíaco. Os olhos estavam já pigmentados e apresentavam uma clara diferenciação da pupila. As larvas recém eclodidas aparentavam ter a boca aberta, ainda que pouco desenvolvida e numa posição ínfera, perto do saco vitelino, e movimento respiratório (abrir e fechar da boca). Ainda não apresentavam o canal alimentar totalmente formado e o ânus encontrava-se fechado. Nesta fase, é visível pigmentação na zona da cabeça, ao longo do corpo na região dorsal e desde a zona da vesícula auditiva até à ponta da notocorda, ao longo da região ventral.

Os melanóforos responsáveis pela pigmentação observada apresentavam dois tipos de formas: pontos arredondados e estrelados.

Desenvolvimento de estruturas de interesse

As duas posturas apresentaram algumas diferenças nos CS e na cronologia dos diferentes marcos de desenvolvimento observados (Tabelas 3.7 e 3.8).

Para a primeira postura (Tabela 3.7) o enchimento da secção posterior da bexiga natatória ocorreu por volta dos 6,7 mm CS e o enchimento da secção anterior aos 10,0 mm CS. As barbatanas peitorais estavam presentes logo na eclosão e as últimas barbatanas a formar-se foram as barbatanas pélvicas (12,1 mm CS). O aparecimento das escamas ocorreu por volta dos 13,8 mm CS e o padrão em losango, que termina o período de observação, surgiu por volta dos 21,5 mm CS.

Tabela 3.7

Marcos do desenvolvimento larvar da primeira postura de Iberochondrostoma lusitanicum seguindo a designação de Parichy et al. (2009) para a descrição das fases (Faseamento Composto) com indicação dos comprimentos standard (CS) e dos dias após a eclosão (DAE) correspondentes.

Descrição	CS (mm)	DAE	Faseamento Composto
Início das barbatanas peitorais	6,4	0	Pt: 6,4 mm CS
Enchimento bexiga natatória posterior	6,7	2	BNP: 6,7 mm CS
Condensação de células na zona da flexão urostilar	6,7	4	CFL: 6,7 mm CS
Início da flexão urostilar	7,2	13	FLi: 7,2 mm CS
Aparecimento de raios na barbatana caudal	6,6	10	RC: 6,6 mm CS
Aparecimento de raios nas barbatanas peitorais	7,9	18	RPt: 7,9 mm CS
Condensação de células na zona da barbatana anal	7,2	13	CA: 7,2 mm CS
Condensação de células na zona da barbatana dorsal	6,8	7	CD: 6,8 mm CS
Enchimento bexiga natatória anterior	10,0	28	BNA: 10,0 mm CS
Aparecimento de raios na barbatana anal	10,0	28	RA: 10,0 mm CS
Aparecimento de raios na barbatana dorsal	9,6	36	RD: 9,6 mm CS
Fim da flexão urostilar (ang. 45°)	9,6	36	FLf: 9,6 mm CS
Início das barbatanas pélvicas	10,9	42	P: 10,9 mm CS
Aparecimento de raios nas barbatanas pélvicas	12,1	44	RP: 12,1 mm CS
Aparecimento de escamas na zona posterior	13,8	46	EP: 13,8 mm CS
Padrão de pigmentação em losango nas escamas	21,5	86	PE: 21,5 mm CS

Apesar dessas diferenças, os comprimentos apresentavam valores da mesma ordem de grandeza.

Nas duas posturas o aparecimento dos diferentes caracteres ocorre a CS muito semelhantes, sendo a principal diferença a impossibilidade de, na segunda postura (Tabela 3.8), se observar a formação das escamas, pois nenhum dos indivíduos sobreviveu até essa fase, tendo sido só possível observar até ao aparecimento de raios nas barbatanas pélvicas, por volta dos 12,2 mm CS.

Tabela 3.8

Marcos do desenvolvimento larvar da segunda postura de Iberochondrostoma lusitanicum seguindo a designação de Parichy et al. (2009) para a descrição das fases (Faseamento Composto) com indicação dos comprimentos standard (CS) e dos dias após a eclosão (DAE) correspondentes.

Descrição	CS (mm)	DAE	Faseamento Composto
Início das barbatanas peitorais	6,1	0	Pt: 6,1 mm CS
Enchimento bexiga natatória posterior	6,2	1	BNP: 6,2 mm CS
Condensação de células na zona da flexão urostilar	6,7	4	CFL: 6,7 mm CS
Início da flexão urostilar	7,3	14	FLi: 7,3 mm CS
Aparecimento de raios na barbatana caudal	6,9	7	RC; 6,9 mm CS
Aparecimento de raios nas barbatanas peitorais	6,6	12	RPT: 6,6 mm CS
Condensação de células na zona da barbatana anal	7,8	18	CA: 7,8 mm CS
Condensação de células na zona da barbatana dorsal	7,3	14	CD: 7,3 mm CS
Enchimento bexiga natatória anterior	8,8	28	BNA: 8,8 mm CS
Aparecimento de raios na barbatana anal	10,0	32	RA: 10,0 mm CS
Aparecimento de raios na barbatana dorsal	8,8	28	RD: 8,8 mm CS
Fim da flexão urostilar (ang. 45°)	11,5	34	FLf: 11,5 mm CS
Início das barbatanas pélvicas	11,5	34	P: 11,5 mm CS
Aparecimento de raios nas barbatanas pélvicas	12,2	43	RP: 12,2 mm CS
Aparecimento de escamas na zona posterior	*	*	*
Padrão de pigmentação em losango nas escamas	*	*	*

* estes caracteres não foram observados porque a segunda postura era muito pequena e houve mortalidade, sendo que a última larva foi observada no dia 14 de junho (66 DAE).

Alimentação/sistema digestivo

As larvas eclodiram com um saco vitelino alongado, localizado longitudinalmente ao longo do corpo, diferente do saco vitelino do embrião antes de eclodir, mas que indica que a alimentação da larva ainda é endógena. Podia observar-se a boca aberta, mas ainda parecia ter o ânus fechado e não apresentar comida no sistema digestivo. Posteriormente, o saco vitelino foi alterando a sua forma, apresentando uma secção mais alongada e uma secção esférica cada vez mais reduzida, fenómeno que foi observado em ambas as posturas. Esta redução do saco vitelino foi gradual, até desaparecer totalmente quando a larva atingiu um CS de 6,7-6,9 mm (Figura 3.9). O desaparecimento do saco vitelino indicia o início da alimentação exógena das larvas, sendo que estas, com um CS de 6,6-7,2 mm, apresentavam já excreções.

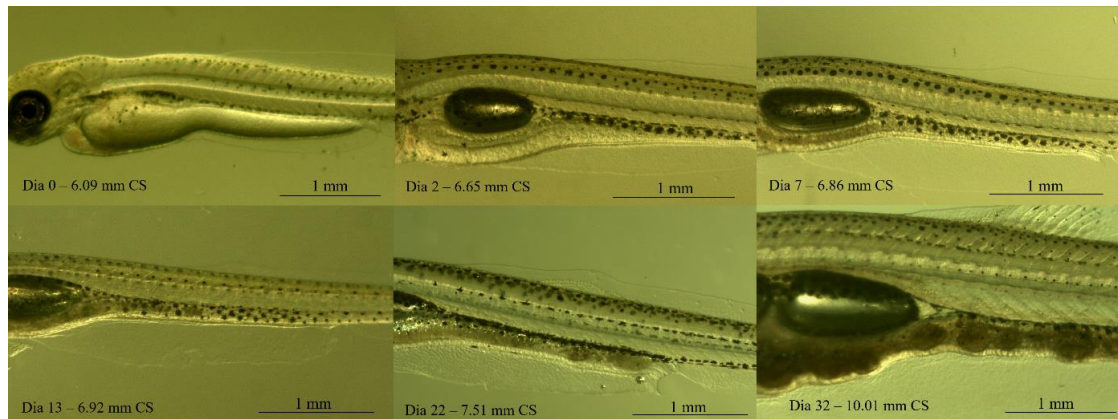


Figura 3.9 – Evolução do sistema digestivo das larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum*, desde a fase de redução do saco vitelino até ao surgimento de estômago e intestino funcionais (de cima para baixo e da esquerda para a direita). Todas as fotografias são tiradas com objectiva 2x (ampliação 20x) com exceção da foto do dia 0 que foi tirada com objectiva 1x (ampliação 10x).

Olhos

As vesículas oculares começaram a ser visíveis ainda na fase embrionária, um a quatro dias após a postura. Durante esse período ainda não apresentavam pigmentação, apesar de já ser possível ver um esboço da zona da pupila. Ao eclodir, a larva apresentava já os olhos bem formados, pigmentados e com a pupila bem individualizada. O tamanho dos olhos evoluiu proporcionalmente ao tamanho da larva, variando entre 6,73% e 11,02% do CS das larvas ao longo do seu desenvolvimento.



Figura 3.10 – Evolução dos olhos durante o desenvolvimento embrionário (ovo dia 1, 3 e 5 AP) e larvar (larva dia 0 AE- 6,09 mm CS, dia 13 AE- 6,9 mm CS, dia 28 AE- 10 mm CS e dia 44 AE- 12,1 mm CS) de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Todas as fotografias foram registadas com a objectiva 2x (ampliação 20x) com exceção da do dia 44 que foi registada com objectiva 1x (ampliação 10x).

Forma da cabeça

As larvas recém eclodidas apresentavam uma cabeça arredondada, com a boca numa posição ínfera e junto ao saco vitelino. Ao longo do desenvolvimento, a forma da cabeça alterou-se, passando a apresentar um aspeto mais fusiforme, e o posicionamento da boca passou de ínfero a terminal (Figura 3.11).

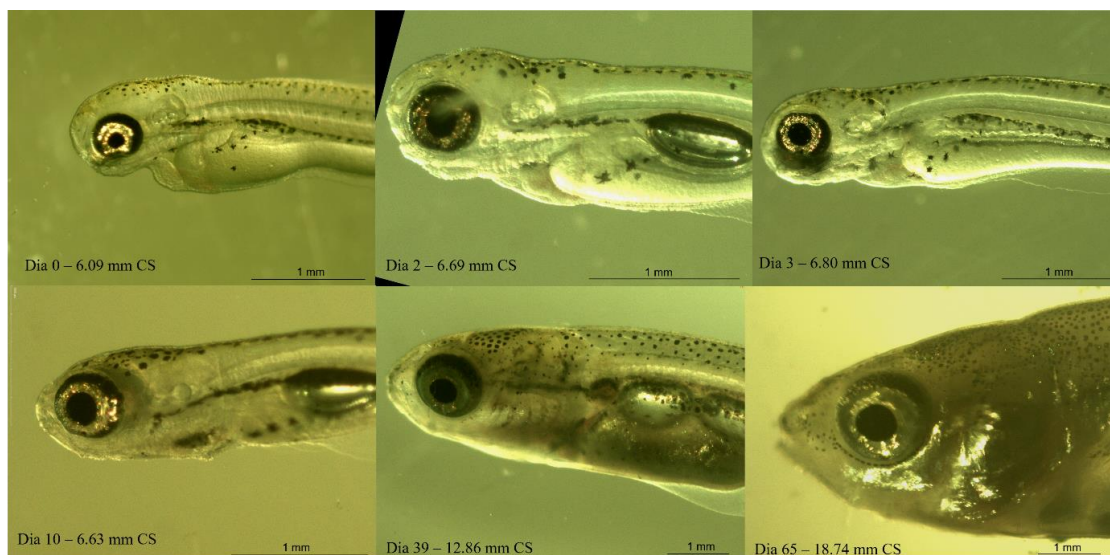


Figura 3.11 – Evolução da forma da cabeça das larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Dias 0, 2, 3 e 10 AE, com objectiva 2x (ampliação 20x) e nos dias 39 e 65 AE com objectiva 1x (ampliação 10x).

Vesículas auditivas

Os pares de otólitos que se conseguiram observar (Figura 3.12) foram os de maiores dimensões, *lapillus* e *sagitta*, não tendo sido possível observar os mais pequenos, *asteriscus*.

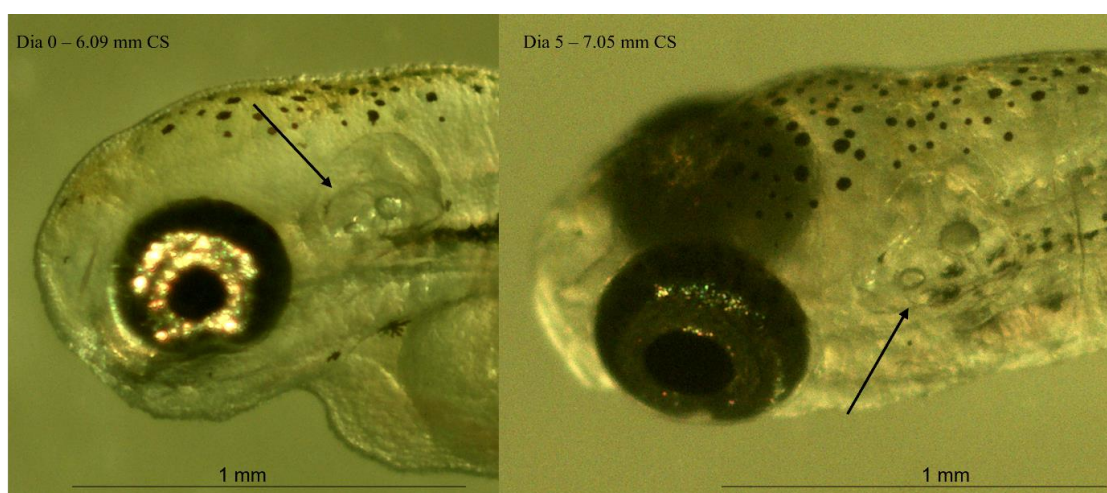


Figura 3.12 – Localização dos otólitos nas vesículas auditivas no momento da eclosão das larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum* com CS 6,09 mm (esquerda) e cinco dias após a eclosão, larva com CS 7,05 mm. Fotografias com objectiva 2x, ampliação 20x.

Bexiga natatória

Esta estrutura apresentou dois momentos fundamentais de alteração, um aquando do enchimento da primeira secção e o segundo com o aparecimento da segunda secção, numa posição anterior à primeira. O enchimento observou-se nos primeiros dias após a eclosão, por volta dos 6,2-6,7 mm CS (BNP: 6,7 mm CS para a primeira postura e BNP: 6,2 mm CS para a segunda) e o aparecimento da segunda secção ocorreu aos 8,8-10,0 mm CS, já numa fase mais avançada do desenvolvimento larvar (BNA: 10,0 mm CS na primeira postura e BNA: 8,8 mm CS na segunda postura) (Figura 3.13).

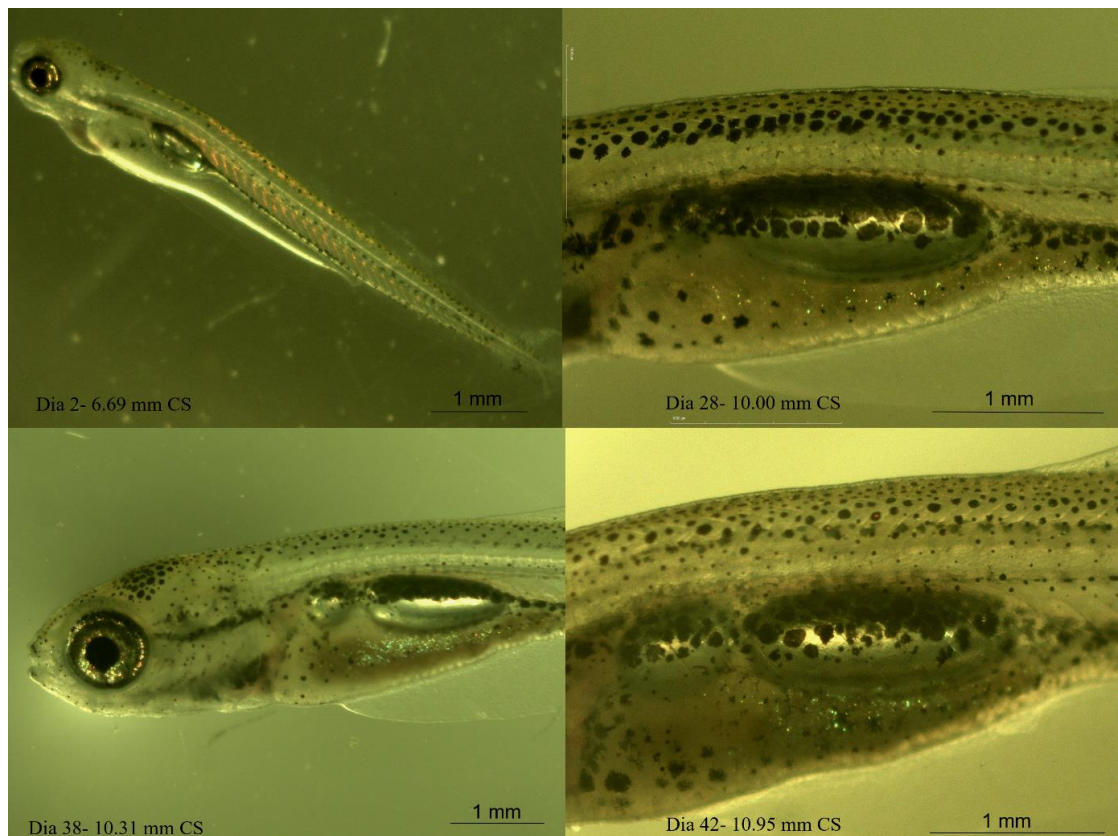


Figura 3.13- Evolução da bexiga natatória ao longo do desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*, com alteração de uma secção para duas. Fotografias da esquerda com objectiva 1x, ampliação 10x; fotografias da direita com objectiva 2x, ampliação 20x.

Prega média (*Larval median fin fold*)

Ao eclodir, a larva de *I. lusitanicum* apresentava uma estrutura composta por duas camadas de epiderme em redor de grande parte do seu corpo, designada por prega média (van den Boogaart et al., 2012). Esta estendia-se desde a região dorsal, na zona anterior ao local onde iria aparecer a barbatana dorsal até à região posterior do ânus e desde o saco vitelino até à zona anterior do ânus, na parte ventral (Figura 3.14).



Figura 3.14 – Larva de *Iberochondrostoma lusitanicum* recém eclodida com a prega média visível.

Com o desenvolvimento da larva, a prega média foi sendo absorvida a ritmos diferentes consoante a zona do corpo. Os últimos locais onde se observou esta estrutura foram junto à barbatana caudal e na zona das barbatanas pélvicas, estando totalmente absorvida nas larvas com mais de 16 mm de CS.

Flexão urostilar

A zona terminal da notocorda sofreu uma flexão para a zona dorsal (Figura 3.15) por volta dos 7,2-7,3 mm CS (FLi: 7,2 mm CS para a primeira postura e FLi: 7,3 mm CS para a segunda postura), após ter sido observada uma acumulação de células nessa zona, tanto na região dorsal como na ventral. O período de flexão terminou quando a notocorda atingiu os 45°, altura em que as larvas apresentavam entre 9,6 e 11,5 mm CS (primeira e segunda posturas, respectivamente).

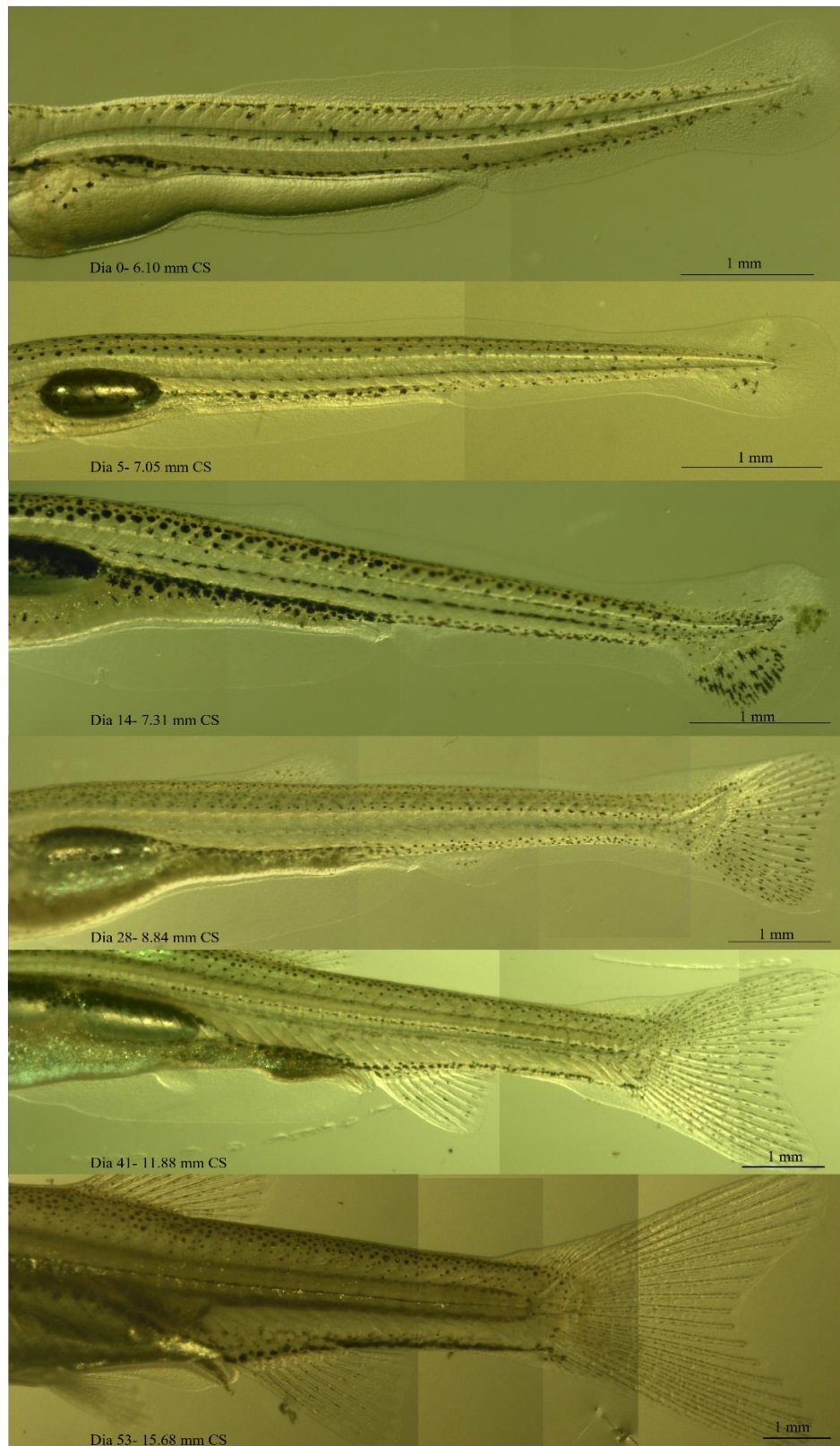


Figura 3.15- Alterações na prega média, flexão urostilar e evolução das barbatanas caudal e anal em larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum* com CS entre 6,10 mm (0 DAE) e 15,68 mm (53 DAE). De cima para baixo, CS 6,1 mm, 7,05mm, 7,31 mm, 8,84 mm, 11,88 mm e 15,68 mm (objectiva 1x, ampliação 10x).

Barbatanas

As barbatanas peitorais formaram-se ainda durante a fase embrionária e a larva, ao eclodir, apresentava já umas pequenas protuberâncias arredondadas na região anterior do saco vitelino. No primeiro dia após a eclosão estas tinham já a forma de barbatanas funcionais, apesar de ainda não se visualizarem estruturas ósseas (Figura 3.16).



Figura 3.16 – Barbatanas peitorais numa larva de *Iberochondrostoma lusitanicum* com 6,20 mm CS, no primeiro dia após a eclosão (vista ventral), com objectiva 2x e ampliação 20x.

A barbatana caudal começou a formar-se com a primeira condensação de células à volta da zona urostilar (CFL: 6,7 mm CS), seguida da flexão urostilar (FLi: 7,2 mm CS para a primeira postura e FLi: 7,3 mm CS para a segunda postura) (Figura 3.15).

De seguida, surgiram os primeiros indícios da barbatana dorsal (Figura 3.17), com a primeira acumulação de células mesenquimatosas aos 6,8-7,3 mm CS (CD: 6,8 mm CS para a primeira postura e CD: 7,3 mm CS para a segunda).

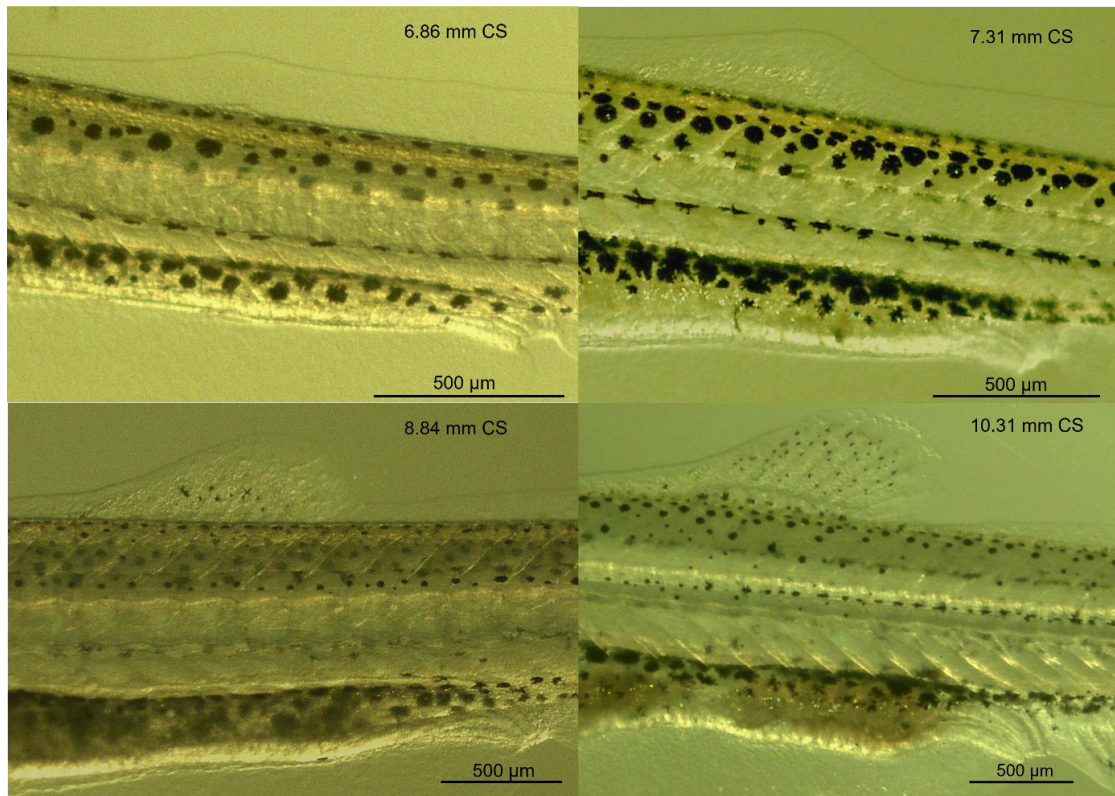


Figura 3.17 – Surgimento da barbatana dorsal nas larvas de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Fotografias de cima e de baixo, à esquerda tiradas com objectiva 2x- ampliação 20x; foto de baixo, à direita tirada com objectiva 1x, ampliação 10x.

Os primeiros indícios da barbatana anal (Figura 3.15) surgiram por volta dos 7,2-7,8 mm CS (CA: 7,2 mm CS para a primeira postura e CA: 7,8 mm CS para a segunda).

As barbatanas pélvicas foram as últimas a surgir (P: 10,9 mm CS na primeira postura e P: 11,5 mm CS na segunda) e puderam ser observadas ainda na zona pélvica da prega média (Figura 3.18).

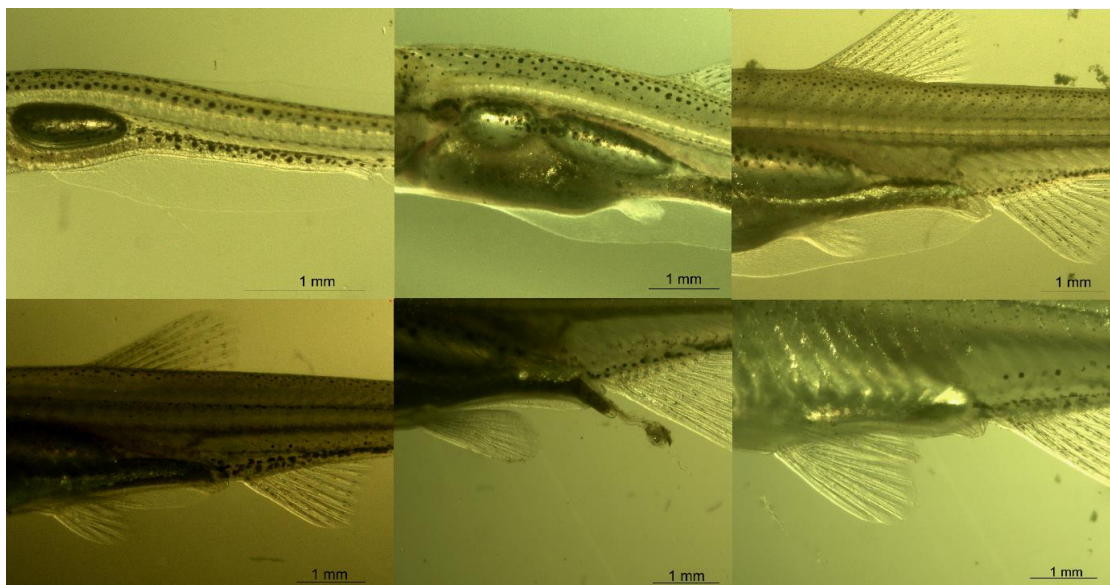


Figura 3.18 – Evolução das barbatanas pélvicas de *Iberochondrostoma lusitanicum*. De cima para baixo e da esquerda para a direita: 6,87 mm CS; 12,86 mm CS; 13,78 mm CS; 14,12 mm CS; 16,63 mm CS e 19,78 mm CS.

Raios das barbatanas

No caso do aparecimento dos raios das barbatanas (Figura 3.15), a ordem pela qual surgiram foi diferente para as duas posturas analisadas. Na primeira postura a ordem, segundo os CS, foi: barbatana caudal (RC: 6,6 mm CS), barbatanas peitorais (RPt: 7,9 mm CS), barbatana dorsal (RD: 9,6 mm CS), barbatana anal (RA: 10,0 mm CS) e barbatanas pélvicas (RP: 12,1 mm CS). Na segunda postura a ordem foi ligeiramente diferente: barbatanas peitorais (RPt: 6,6 mm CS), barbatana caudal (RC: 6,9 mm CS), barbatana dorsal (RD: 8,8 mm CS), barbatana anal (RA: 10,0 mm CS) e barbatanas pélvicas (RP: 12,2 mm CS).

Formação de escamas

A formação das escamas começou por ser perceptível após a absorção da zona dorsal da prega média. Nessa zona, posterior à barbatana dorsal, começaram a surgir irregularidades na silhueta da larva que se tornaram mais evidentes com o aumento do CS, culminando com a formação da escama e a alteração do padrão de pigmentação, que passa a ser em losango, ao longo dos bordos de cada escama (Figura 3.19). No início da sua formação, as larvas apresentavam ainda a porção da prega média da zona ventral,

entre o ânus e a zona abdominal, apesar de estarem já presentes as barbatanas pélvicas. Na fase em que as escamas estão mais visíveis, já com o seu padrão de pigmentação em losango, toda a prega média tinha sido absorvida.

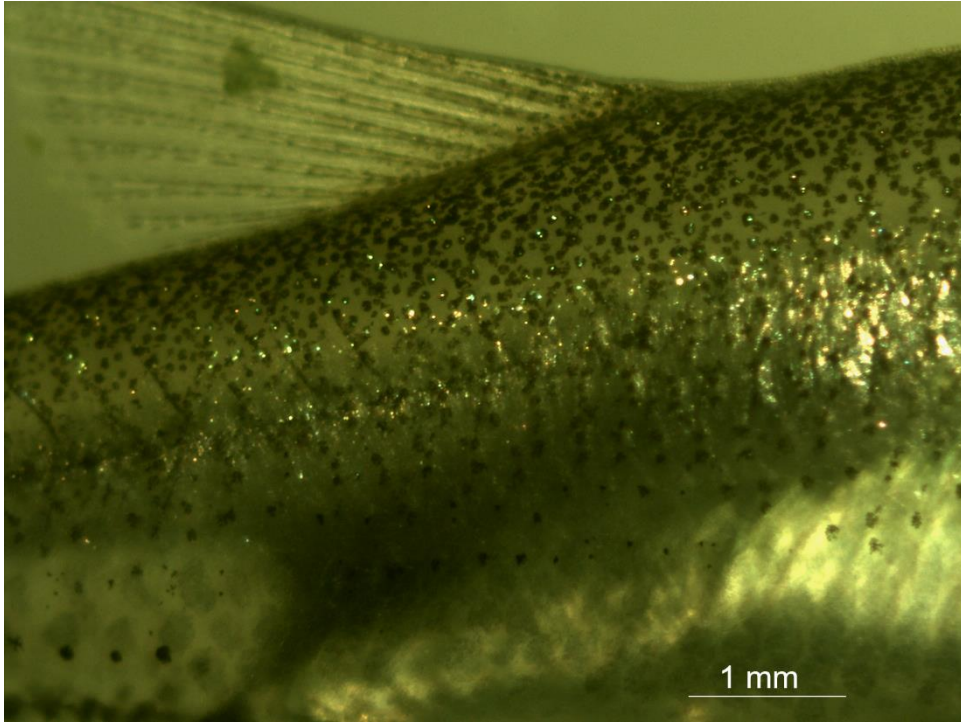


Figura 3.19 – Exemplo do padrão de pigmentação em losango observado nas escamas, no final do desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*. Larva com CS 23,0 mm e 92 dias após eclosão (objectiva 1x. ampliação 10x).

Esta fase foi de difícil visualização, mas iniciou-se em larvas com um CS entre 13 e 16 mm. Na segunda postura não foi possível observar estes caracteres devido ao número reduzido de ovos disponíveis e à mortalidade das larvas ao longo do período de observação.

Pigmentação

As larvas eclodiram já com um padrão, ainda que simples, de pigmentação. Apresentavam, maioritariamente, melanóforos com forma estrelada, presentes na cabeça, ao longo da zona dorsal, da notocorda e numa linha fina entre o saco vitelino e o corpo e que se estende ao longo da zona ventral. Este padrão sofreu alterações na forma,

quantidade e disposição dos melanóforos ao longo do desenvolvimento (Figura 3.20). Com a formação das barbatanas, foram surgindo melanóforos nas zonas onde se concentravam as células e, posteriormente, também nos raios das barbatanas, maioritariamente concentrados ao longo da zona dorsal. Também surgiram melanóforos circulares à volta dos lábios e dos olhos. Na fase final das observações, depois do aparecimento de escamas, os melanóforos passaram a estar dispostos em padrão losangular em cada escama, resultando num padrão geral com um elevado grau de complexidade.

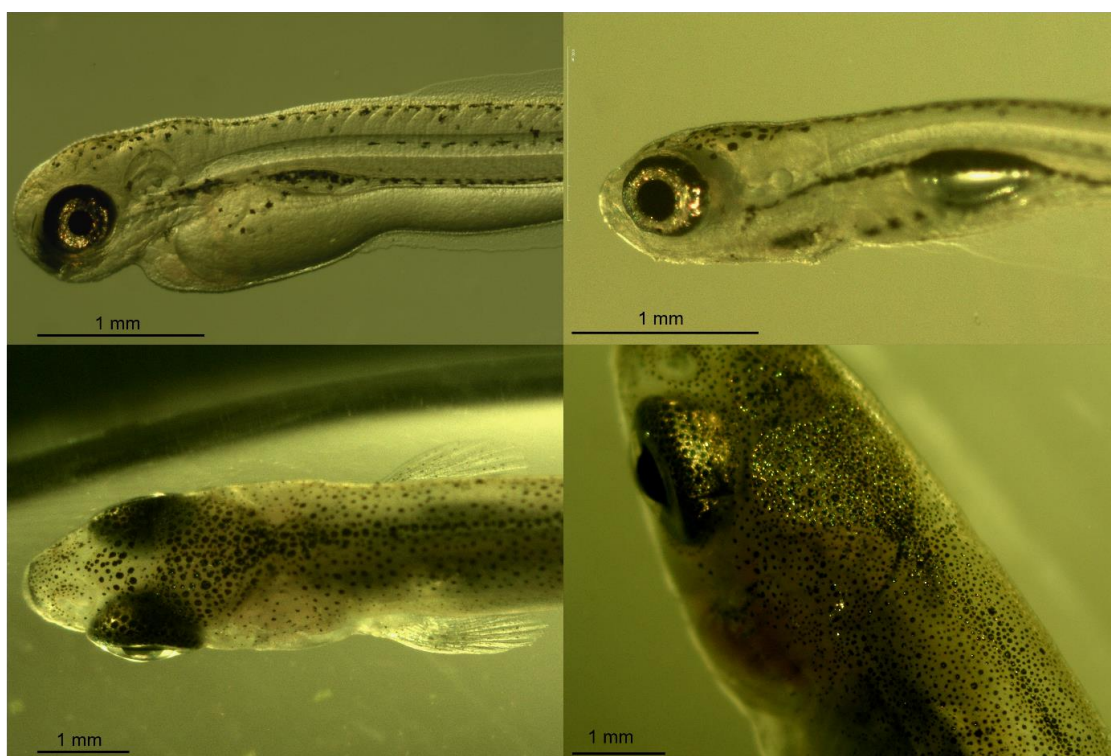


Figura 3.20 – Exemplo de alterações da pigmentação ao longo do desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum*. As duas fotografias de cima foram tiradas com objectiva 2x (ampliação 20x) e as duas fotografias de baixo com objectiva 1x (ampliação 10x).

Capacidade locomotora

É de referir que as larvas, desde a sua eclosão, apresentaram uma capacidade locomotora e de fuga bastante desenvolvida, que foi aumentando ao longo do desenvolvimento larvar. Este comportamento de fuga foi observado aquando da recolha das larvas para a observação, cuja dificuldade aumentou com o crescimento das larvas.

Principais conclusões

O desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento larvar de *Iberochondrostoma lusitanicum* foram seguidos em duas posturas e com resultados muito semelhantes. Apesar do desenvolvimento embrionário ter uma duração mais curta e ser mais fácil identificar o seu final, algumas das suas fases não puderam ser registadas, pois ocorreram muito rapidamente, com menos de um dia de intervalo. Além disso, as características da membrana do ovo, pouco transparente e adesiva, tornam difícil a visualização do seu conteúdo. No caso do desenvolvimento larvar, de maior duração, revelou-se difícil a identificação do final dessa fase e, apesar dos sinais do aparecimento de escamas terem sido observados de acordo com o descrito na literatura (Carvalho, 2001), considerou-se mais adequado assumir como final do processo o momento em que todas as características larvares tivessem desaparecido. Assim, a primeira postura, que ainda tinha indivíduos disponíveis para se realizarem as observações até essa altura, foi seguida até o 92º dia após a postura, quando a larva já apresentava escamas, todas as barbatanas desenvolvidas e toda a prega média absorvida.

Um dos principais resultados do presente trabalho revela que o desenvolvimento larvar é mais bem ilustrado quando se utiliza o comprimento dos indivíduos, uma vez que parece existir uma grande variabilidade entre indivíduos mesmo dentro de cada postura, sujeitos às mesmas condições de ambiente, alimentação, etc. Nem todas cresceram ao mesmo ritmo e, conseqüentemente, não apresentavam os mesmos caracteres na mesma data. Esta variabilidade dentro da mesma postura parece ser um fenómeno natural (Fuiman et al., 2005), mas que poderá ser potenciado por alguns factores como maior competência na procura de alimento, especialmente em ambientes com pouca disponibilidade (Lee et al., 2010; Pepin et al., 2014), larvas maiores crescem mais rápido porque têm maior facilidade na captura de alimento (Voesenek et al., 2018) e densidade de larvas no tanque (Hitzfelder et al., 2006). Ao contrário do normalmente considerado para os peixes, a temperatura não pareceu ter grande influência na grande variabilidade encontrada no desenvolvimento e crescimento larvar uma vez que a variabilidade foi elevada dentro da mesma postura. As temperaturas a que ambas as posturas estiveram expostas, durante a fase embrionária, tiveram uma variação pequena: 13,4-15,8 °C (média 14,86°C) na primeira postura e 15,7-17,2 °C (média 16,38°C) na segunda postura, o que se encontra dentro dos limites dados na bibliografia para a variação de temperatura a que os ovos se desenvolvem em espécies de peixes de zonas temperadas (Wood & McDonald,

1997). Na fase larvar, a variação foi um pouco mais elevada, 15,4-21,8°C em ambas as posturas (mas com médias diferentes, 17,55°C na primeira e 17,88°C, na segunda). No entanto, o aparecimento das diferentes estruturas parece estar mais sincronizado com o tamanho e não com quaisquer outros factores.

Em relação à formação das estruturas auditivas, estão visíveis dois otólitos logo desde a eclosão. É possível que, tal como acontece com outras espécies (Gao et al., 2021), os dois pares de maiores dimensões, *lapillus* e *sagitta*, estejam presentes ao eclodir e os mais pequenos, *asteriscus*, se formem após a eclosão, algures durante a fase larvar. Dado o seu tamanho reduzido, pode também ser difícil a sua visualização neste tipo de observações.

A existência da prega média, estrutura considerada por alguns autores (e.g. van den Boogaart et al., 2012) como tendo uma função importante na locomoção (entre outras funções), contribui para a alteração rápida da direção de natação da larva e explica, em parte, a sua capacidade locomotora logo após a eclosão (Voesenek et al., 2018). É ainda dentro desta estrutura que se formarão as barbatanas médias: caudal, dorsal e anal (Miyamoto et al., 2022). É expectável que, com o desenvolvimento da musculatura e das barbatanas, sendo que as barbatanas peitorais estão já presentes aquando da eclosão e contribuem para os movimentos natatórios fundamentais à captura de alimento (Voesenek et al., 2018), aumente a sua capacidade de fuga e de procura de alimento. Será expectável que larvas com crescimento mais rápido consigam ser mais competitivas na procura de alimento, e consequente manutenção desse ritmo de crescimento, enquanto outras, com crescimento mais lento, tenham mais dificuldade em alimentar-se. No desenvolvimento das barbatanas é interessante notar que a barbatana caudal se começa a desenvolver relativamente cedo, por volta dos 7 mm CS, pois também é uma estrutura importante na locomoção (Fuiman, 1983; Voesenek et al., 2018). Na formação dos raios das barbatanas, é possível que surjam mais cedo nas barbatanas peitorais, uma vez que são as primeiras a desenvolver-se, mas é muito difícil visualizar estas barbatanas, pois estão, frequentemente, encostadas aos flancos do corpo e a sua transparência impede a correta identificação das suas características.

Os dados deste capítulo são relevantes para a detecção e identificação de ovos/larvas no campo e nos programas de reprodução *ex situ*, embora seja expectável a existência de diferenças entre os tempos e desenvolvimento em cativeiro e na natureza. De forma precaucionária, esta marcada relação entre a dimensão dos indivíduos e o

surgimento de características, por oposição ao uso do número de dias depois da postura como um indicador, pode mesmo ser validada para outras espécies sujeitas a ações de conservação que impliquem reprodução em cativeiro com características mais naturalistas. Embora seja expectável que haja diferenças entre o desenvolvimento em cativeiro, ainda que em condições naturalistas, e o desenvolvimento no *habitat* natural das espécies, é difícil fazer essa comparação pelo facto de serem espécies com estatutos de conservação/ameaça mais sensíveis.

Como sugestão para trabalhos futuros, propõe-se um investimento maior nas fases iniciais do desenvolvimento, tanto embrionário como larvar, que, por serem bastante rápidas, não foi possível seguir com tanto detalhe. Além disso, idealmente, deveriam fazer-se observações de vários indivíduos no mesmo dia para se registarem as variações de cada um e como a postura evolui. Pode investir-se também numa descrição mais detalhada do padrão de pigmentação, que pode ser de particular utilidade em identificação no campo, em condições menos ideais de manipulação e observação dos exemplares. Outro aspecto a considerar, sobretudo por serem espécies nativas e com estatuto de conservação desfavorável, é que nas fases iniciais do desenvolvimento dos peixes, a taxa de mortalidade é mais elevada (Schiemer et al., 1991, 2001). Esta elevada mortalidade deve-se a factores como a inanição aquando da passagem para a alimentação exógena, disponibilidade de alimento, temperaturas inadequadas, predação das larvas (Schiemer et al., 1991, 2001, 2003) e estes estudos não são excepção. Neste caso, além da mortalidade de larvas no tanque, observou-se uma particular sensibilidade e suscetibilidade à manipulação no que respeita a anestesia, especialmente em fases mais avançadas do desenvolvimento. Foi mais difícil o ajuste do anestésico em larvas com CS superior 16 mm, a anestesia demorava mais tempo a fazer efeito ou a dose era insuficiente (por serem larvas com tamanho maior). Este tempo demorado de resposta ao anestésico podia levar a aumentos do *stress* a que os indivíduos estavam sujeitos e que teria consequências negativas (Huntingford et al., 2006; Iwama, 1998; Wendelaar Bonga, 1997).

Capítulo IV – Análise molecular comparativa

Enquadramento

A filogenia do género *Iberochondrostoma* tem sido alvo de diversos estudos que pretendem clarificar as relações de parentesco entre as espécies que o integram (Robalo, Doadrio, et al., 2007; Robalo et al., 2008): *Iberochondrostoma lemmingii*, *Iberochondrostoma almacai* e *Iberochondrostoma lusitanicum*.

Numa abordagem filogeográfica e concretamente no que respeita a *I. lusitanicum*, estes trabalhos identificam possíveis entidades taxonómicas distintas, com uma base geográfica, que necessitam de clarificação ao nível molecular (Robalo, Doadrio, et al., 2007). No caso de espécies com estatuto de ameaça elevado, definir correctamente as unidades de conservação é de extrema importância, uma vez que nem todas as populações se encontram expostas às mesmas pressões. Confirmando-se a existência de entidades taxonómicas distintas, correspondentes a diferentes unidades de conservação, podem avaliar-se com mais precisão as medidas de protecção adequadas.

Em Robalo, Doadrio, et al. (2007) são reconhecidos dois grupos diferentes de *I. lusitanicum*, um que inclui as populações da bacia do Rio Sado e o outro que inclui indivíduos das ribeiras da região Oeste de Portugal (Samarra, Lizandro, Colares) e de sub-bacias do Tejo inferior. A identificação destes dois grupos foi feita tendo por base uma abordagem molecular tipicamente utilizada no estudo de ciprinídeos e leuciscídeos, que inclui a sequenciação combinada do gene mitocondrial citocromo *b* (*cytb*) e do gene nuclear beta-actina (*bact*).

Para a confirmação da existência de duas unidades taxonómicas distintas no seio daquilo que se considera hoje *I. lusitanicum* foram considerados necessários mais estudos, tanto moleculares quanto morfológicos. A avaliação morfológica consta do Capítulo V. No que respeita à avaliação molecular, a abordagem tradicional realizada até à data pode ser complementada com novos dados genéticos de modo a complementar a informação existente.

Apresentam-se assim, neste capítulo, a metodologia, resultados e conclusões da análise da estrutura populacional e diversidade genética observada ao longo de toda a área de distribuição de *I. lusitanicum*, recorrendo à sequenciação combinada de genes mitocondriais e nucleares.

Material e Métodos

As amostras utilizadas nas análises deste capítulo provêm da colecção MARE-Ispa. Todos os indivíduos foram capturados com recurso a pesca eléctrica (ver descrição detalhada no Capítulo I) e uma pequena porção da barbatana dorsal foi conservada em álcool 96% para posterior processamento laboratorial.

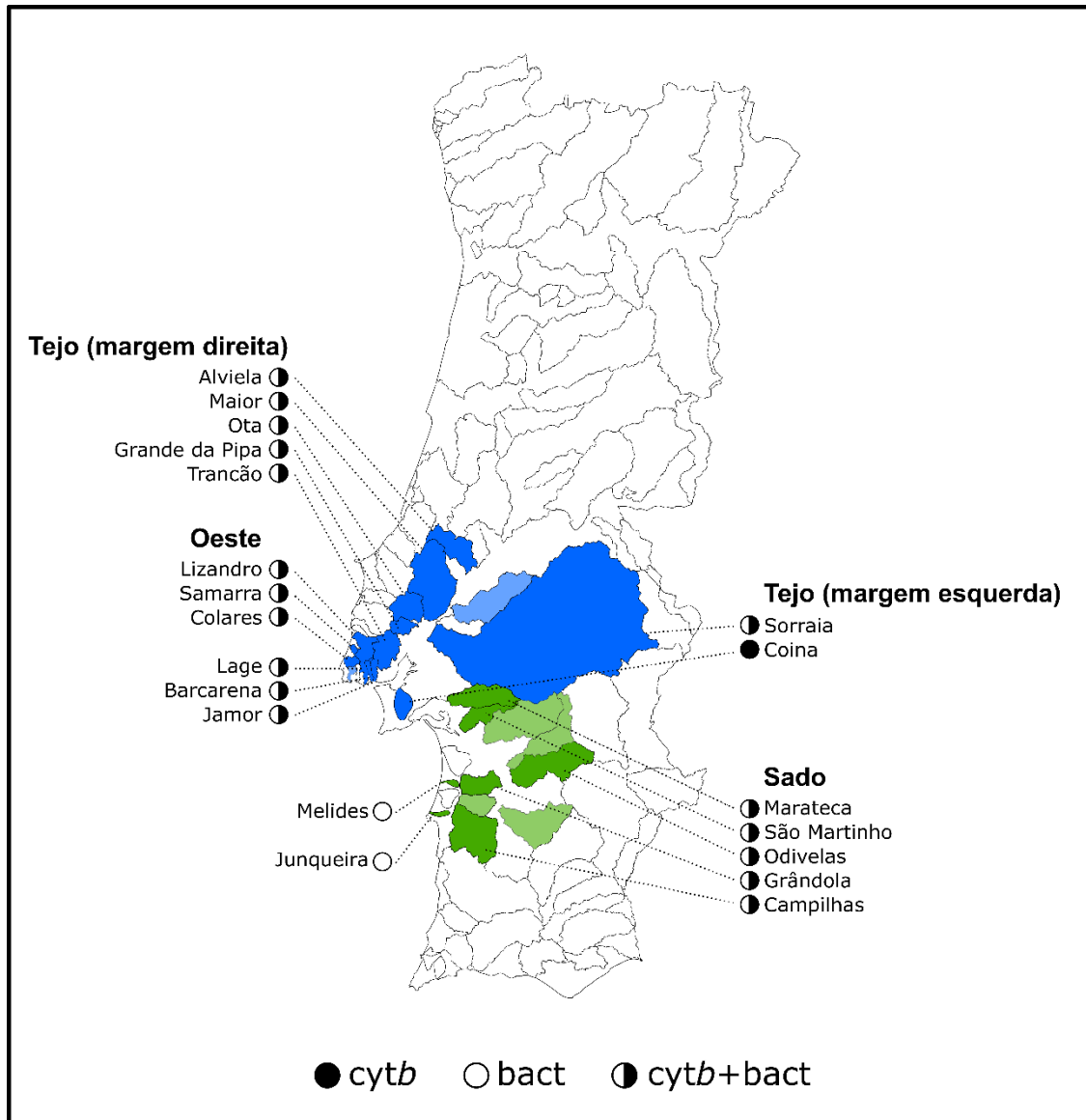


Figura 4.1 – Populações de *Iberochondrostoma lusitanicum* amostradas para a análise molecular (genes *cytb* e *bact*).

Extração e amplificação de ADN

A análise genética foi realizada com recurso à sequenciação *Sanger* do gene mitocondrial citocromo *b* (*cytb*) e do gene nuclear beta-actina (*bact*), foram utilizadas amostras de todas as populações conhecidas de *I. lusitanicum* (Tabela 4.1).

Tabela 4.1

Populações de Iberochondrostoma lusitanicum analisadas: bacia e sub-bacia amostradas e respectivo número de amostras (*N*) para as quais foram obtidas sequências dos genes citocromo *b* e beta-actina.

Bacia	Sub-bacia	N	
		<i>cytb</i>	<i>bact</i>
Ribeiras do Oeste	Samarra	19	11
Ribeiras do Oeste	Lizandro	26	15
Ribeiras do Oeste	Jamor	17	17
Ribeiras do Oeste	Colares	17	6
Ribeiras do Oeste	Barcarena	17	16
Ribeiras do Oeste	Lage	19	10
Tejo	Trancão	19	29
Tejo	Maior	50	45
Tejo	Ota	19	15
Tejo	Grande da Pipa	20	17
Tejo	Alviela	21	12
Tejo	Coina	16	-
Tejo	Sorraia	10	9
Sado	Odivelas	20	18
Sado	Grândola	27	20
Sado	Campilhas	5	7
Sado	Marateca	18	2
Sado	Corona	6	2
Melides	Melides	-	5
Junqueira	Junqueira	-	4
total		346	260

O ADN de pequenas amostras de tecido recolhido por amostragem não letal (corte da porção superior da barbatana dorsal) foi extraído e amplificado no Laboratório de

Genética Evolutiva (MARE-Ispa), utilizando o kit comercial REDEExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma-Aldrich/Merck) e seguindo as instruções do fabricante.

A amplificação dos genes *cytb* e *bact* foi realizada utilizando os *primers* e condições de PCR constantes da Tabela 4.2. De acordo com o referido anteriormente, estes genes foram seleccionados por serem amplamente utilizados em estudos filogenéticos e filogeográficos das diversas espécies de ciprinídeos e leuciscídeos ibéricos (e.g. (Perea et al., 2010; Robalo, Almada, et al., 2007; Robalo, Doadrio, et al., 2007; Sousa-Santos et al., 2007)

Tabela 4.2

Primers e condições de amplificação utilizados.

<i>Primers</i>	Condições de Amplificação
LCB1 new- ACTTGAAGAACCACCGTTG (adaptado do <i>primer</i> LCB1 descrito por Brito <i>et al.</i> 1997) HA-CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC (Schmidt & Gold 1993)	35x [94°C 1' + 50°C 1' + 72°C 1'30'']
BACTFOR_new- GGA TGA TGA AAT TGC CGC ACT GG BACTREV_new- AGG ATC TTC ATG AGG TAG TCT GT (adaptado dos <i>primers</i> descritos por Robalo <i>et al.</i> 2007a)	35x [94°C 1' + 58°C 1'30'' + 72°C 1'30'']

Os *primers* utilizados na reacção de sequenciação foram os mesmos (Tabela 4.2) e a purificação e sequenciação das amostras foi feita na StabVida- Portugal (<https://www.stabvida.com/pt>).

Análise de dados

As sequências mitocondriais e nucleares obtidas foram verificadas e editadas utilizando o programa CodonCode Aligner v. 10.0.2 (CodonCode Corp., USA), onde se retiraram as extremidades iniciais e finais, geralmente com menor qualidade de leitura, de modo a garantir uma uniformização do tamanho obtido (720 bp para o gene *cytb* e 900 bp para o gene *bact*).

No caso das sequências do gene *bact*, estas foram visualizadas detalhadamente antes do alinhamento das sequências, para detecção de indivíduos heterozigóticos. Nesses casos, foi aplicado o procedimento descrito em (Sousa-Santos et al., 2005) de modo a decifrar as sequências das duas cadeias parentais. Em caso de incerteza, foi utilizado o código universal de ambiguidades IUPAC nos *loci* para os quais não foi possível discernir a que cadeia parental pertenciam os nucleótidos presentes nesses locais do gene amplificado. O conjunto de haplótipos obtidos foi identificado recorrendo ao programa DNAColapser – FaBOX v1.61 (Villesen, 2007) e a construção das redes de haplótipos foi realizada através do programa POPART 1.7 (Leigh & Bryant, 2015), com base no algoritmo TDS e utilizando um intervalo de confiança de 95%, tendo em conta a frequência relativa de cada haplótipo e as populações nas quais foram amostrados. Na construção da rede de haplótipos foi seguido o método descrito em (Sousa-Santos, Gante et al., 2014) para evitar que se considerasse que os blocos de *gaps* contíguos no alinhamento das sequências tivessem tantas mutações quanto os números de bases que compunham esses blocos. Desse modo, esses haplótipos foram editados manualmente reduzindo o número de bases do *indel* a um *gap* e, cada um destes, foi codificado como uma transversão para que pudessem ser utilizados nas análises de distância e *likelihood*.

O programa ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) foi usado para calcular as diferenças emparelhadas corrigidas entre populações (*corrected pairwise differences*) e respectivas estatísticas F_{ST} ; para análise da variância molecular (AMOVA) entre a totalidade das populações agrupadas num grupo e em três grupos-teste; e para calcular os índices de diversidade molecular para cada população: h – diversidade genética; π – diversidade nucleotídica e k – número médio de diferenças emparelhadas).

Todas as sequências obtidas serão depositadas no banco público de dados moleculares GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando as ferramentas de submissão disponíveis online.

Resultados

Para o gene nuclear beta-actina (*bact*), obtiveram-se 520 sequências que se agrupam em oito haplótipos, distantes entre si por um e três passos mutacionais (Figura 4.2). Esses haplótipos encontram-se distribuídos em duas linhagens/grupos, uma

composta pelas populações do Sado (Campilhas, Corona, Grândola, Marateca e Odivelas), Melides e Junqueira e a outra composta pelas populações do Tejo/Oeste (Alviela, Grande da Pipa, Maior, Ota, Sorraia, Trancão, Samarra, Lizandro, Lage, Jamor, Colares e Barcarena).

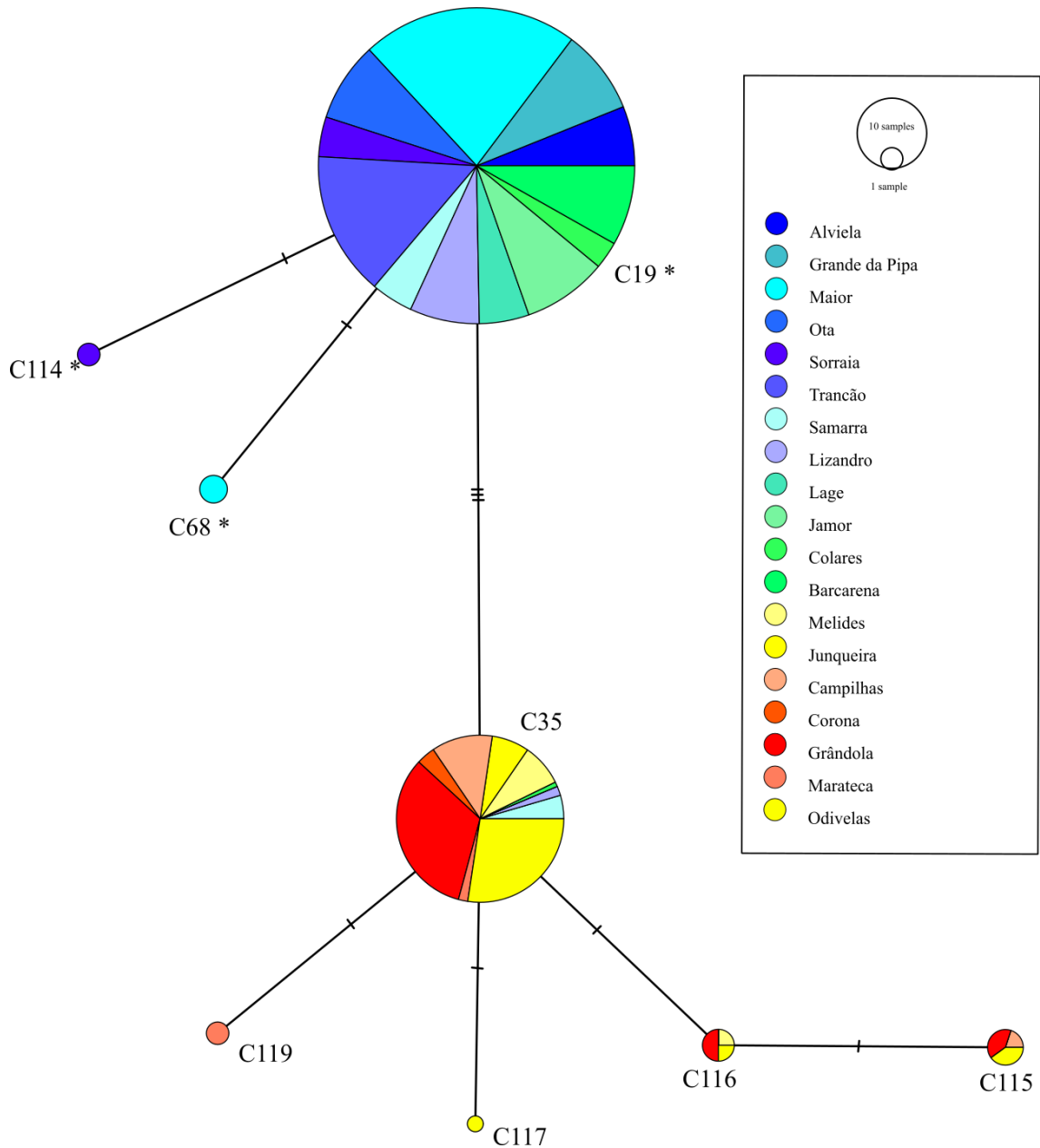


Figura 4.2- Rede de haplótipos do gene nuclear beta-actina obtida para *Iberochondrostoma lusitanicum*. Os haplótipos assinalados com * foram codificados seguindo o método descrito na secção “Material e Métodos”.

Dos oito haplótipos encontrados, quatro são exclusivos de uma determinada bacia/sub-bacia: dois ocorrem apenas nas sub-bacias Maior (C68) e Sorraia (C114), pertencentes à bacia do Tejo; e dois ocorrem apenas nas sub-bacias Odivelas e Marateca (C117 e C119, respectivamente), pertencentes à bacia do Sado (Figura 4.2). O haplótipo mais comum (C19) só está presente nas populações do Tejo/Oeste e o segundo mais comum (C35) está presente nas populações do Sado, Samarra, Lizandro e Colares. Existem ainda mais dois haplótipos presentes em populações do Sado: o C115 presente em Campilhas, Grândola e Odivelas; e o C116, presente em Melides, Grândola e Odivelas.

A análise de variância molecular (AMOVA) efectuada incluindo todas as populações num único grupo, revelou que a maior parte da variância é explicada por diferenças entre as populações (87,38%) e que existe estruturação entre elas ($F_{ST} = 0,87$; $p=0,00$). Com base na rede de haplótipos obtida (Figura 4.2) e dada a estruturação populacional revelada pela AMOVA, decidiu-se testar o agrupamento das populações em dois conjuntos pré-estabelecidos para uma segunda AMOVA: um com as populações do Tejo (N=6) e Oeste (N=6), e outro com as populações do Sado (N=5), Melides e Junqueira. Esta AMOVA mostrou existir uma diferença significativa entre estes dois grupos ($F_{ST}=0,94$; $p=0,00$), sendo a maior parte da variância molecular detectada (94,29%) explicada por diferenças entre eles.

Para o gene mitocondrial citocromo *b* (*cytb*), foram obtidas 346 sequências provenientes de seis populações da região Oeste (Lizandro, Samarra, Colares, Barcarena, Jamor e Lage), de cinco populações do Sado (Campilhas, Corona, Grândola, Marateca e Odivelas) e de sete populações do Tejo (Alviela, Coina, Grande da Pipa, Maior, Ota, Sorraia e Trancão). Estas sequências representam um total de 28 haplótipos, distanciados entre si por um máximo de 9 passos mutacionais (Figura 4.3).

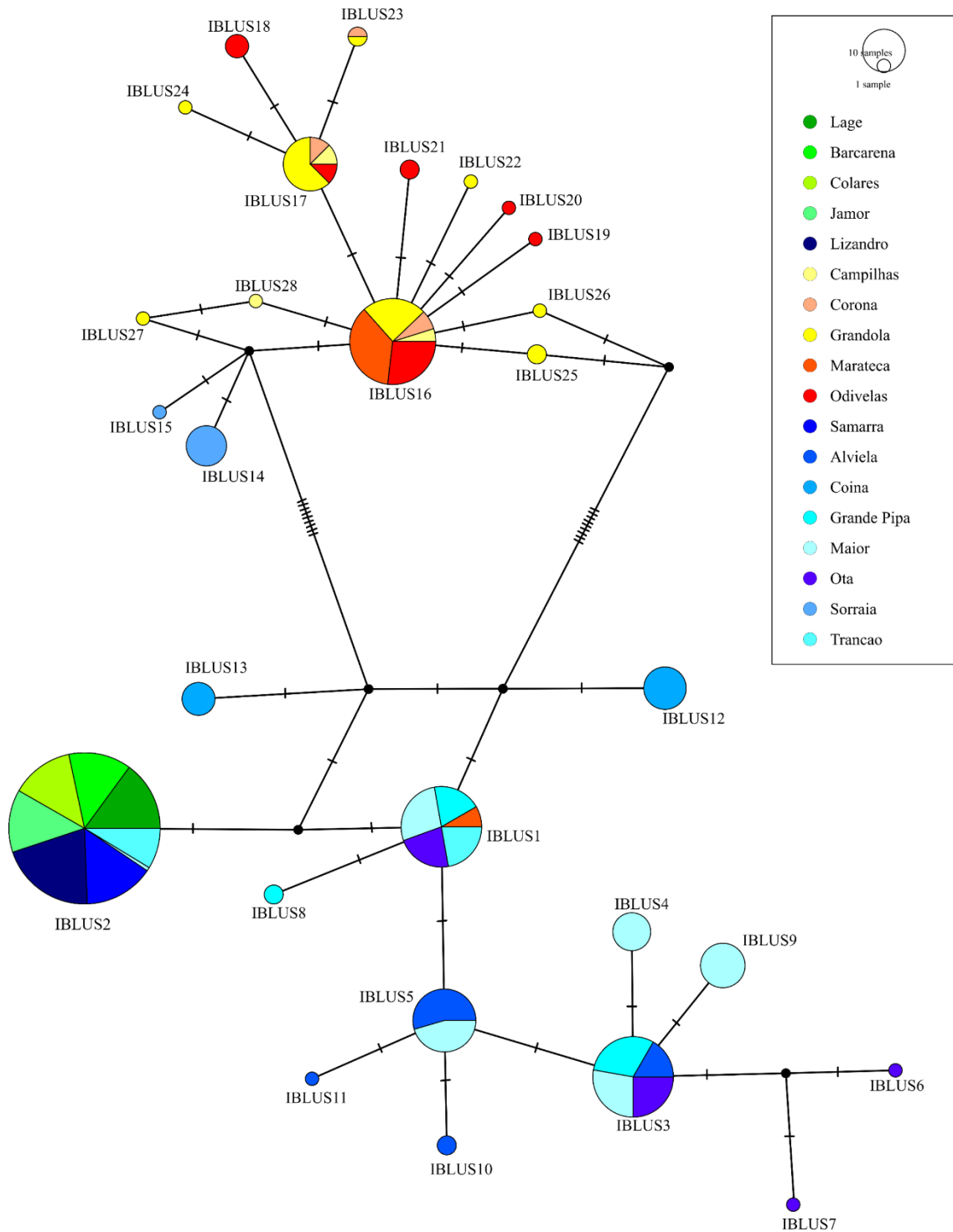


Figura 4.3 – Rede de haplótipos do gene mitocondrial *cytb* obtida para *Iberochondrostoma lusitanicum*.

Esta rede apresenta dois haplótipos mais frequentes, IBLUS2 e IBLUS16, e exibe uma configuração em estrela. O haplótipo mais frequente (IBLUS2), encontrado nas sub-bacias Lage, Barcarena, Colares, Jamor, Lizandro, Samarra, Maior e Trancão, tem 127

indivíduos, 36,6% do total, e o segundo mais frequente (IBLUS16) está presente nas sub-bacias de Campilhas, Corona, Grândola, Marateca e Odivelas e inclui 41 indivíduos, 11,8% do total. Existem 20 haplótipos únicos de sub-bacias e oito haplótipos partilhados entre sub-bacias. A sub-bacia que inclui mais haplótipos é Grândola, com oito haplótipos (IBLUS16, 17 e IBLUS22-27). Dos 20 haplótipos únicos de sub-bacias, cinco pertencem a Grândola (IBLUS22, 24, 25, 26 e 27), quatro a Odivelas (IBLUS18-21), dois a Ota (IBLUS6 e 7), dois a Alviela (IBLUS10 e 11), dois a Coina (IBLUS12 e 13), dois a Sorraia (IBLUS14 e 15) e um a cada uma das seguintes sub-bacias: Grande da Pipa (IBLUS8), Maior (IBLUS9) e Campilhas (IBLUS28). De entre os 28 haplótipos encontrados, existem quatro haplótipos privados no Tejo (IBLUS6, 7, 11 e 15) e sete haplótipos privados no Sado (IBLUS19, 20, 22, 24, 26, 27 e 28).

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada incluindo todas as populações num só grupo revelou que a maior parte da variância (86,66%) ocorre entre populações e que existe estruturação entre elas, ou seja, globalmente existem diferenças significativas entre populações ($F_{ST}=0,87$; $p=0,00$). Tendo como objectivo perceber mais detalhadamente a estruturação detectada, efectuou-se uma segunda AMOVA, desta vez com as populações agrupadas *a priori* em dois grupos (“Sado” e “Tejo e Oeste”). Esta análise revelou que a maioria da variância molecular (77,56%) ocorre entre os dois grupos, sendo que apenas 15,64% da variância é explicada pelas diferenças existentes entre as populações dentro dos grupos estabelecidos. Além disso, os resultados desta AMOVA corroboram os resultados obtidos durante a análise dos dados genómicos (Robalo et al., in press), demonstrando uma clara estruturação das populações: existem diferenças significativas entre os grupos “Sado” e “Tejo e Oeste” ($F_{ST}=0,78$; $p=0,00059$).

Em relação à divergência entre as populações, na Tabela 4.3 estão os valores encontrados dos F_{ST} que também indicam a existência de diferenciação genética entre as populações do “Tejo e Oeste” e as do “Sado”.

Tabela 4.3

F_{ST} para os pares de populações analisados.

	Lage	Barcarena	Colares	Jamor	Lizandro	Samarra	Alviela	Coina	Grande da Pipa	Maior	Ota	Sorraia	Trancão	Campilhas	Corona	Grândola	Marateca
Barcarena	0.00000	0.00000															
Colares	0.00000	0.00000	0.00000														
Jamor	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000													
Lizandro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000												
Samarra	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000											
Alviela	0.89234*	0.88696*	0.88696*	0.88696*	0.90768*	0.89234*	0.00000										
Coina	0.80872*	0.79859*	0.79859*	0.79859*	0.83724*	0.80872*	0.72139*	0.00000									
Grande da Pipa	0.80329*	0.79411*	0.79411*	0.79411*	0.82973*	0.80329*	0.20424*	0.62089*	0.00000								
Maior	0.71861*	0.71210*	0.71210*	0.71210*	0.73901*	0.71861*	0.11931*	0.62923*	0.05641	0.00000							
Ota	0.78646*	0.77640*	0.77640*	0.77640*	0.81537*	0.78646*	0.18475*	0.60798*	-0.03101	0.04793	0.00000						
Sorraia	0.99044*	0.98968*	0.98968*	0.98968*	0.99239*	0.99044*	0.95473*	0.92086*	0.92764*	0.90283*	0.91918*	0.00000					
Trancão	0.38889*	0.37304*	0.37304*	0.37304*	0.43739*	0.38889*	0.66710*	0.59631*	0.51993*	0.53012*	0.51157*	0.93814*	0.00000				
Campilhas	0.98734*	0.98609*	0.98609*	0.98609*	0.99037*	0.98734*	0.94597*	0.89990*	0.91403*	0.89630*	0.90345*	0.76773*	0.92561*	0.00000			
Corona	0.98597*	0.98465*	0.98465*	0.98465*	0.98921*	0.98597*	0.94655*	0.90569*	0.91608*	0.89800*	0.90608*	0.77372*	0.92717*	-0.11429	0.00000		
Grândola	0.95529*	0.95325*	0.95325*	0.95325*	0.96121*	0.95529*	0.93322*	0.91065*	0.91526*	0.90237*	0.91017*	0.67313*	0.92131*	-0.08801	-0.07736	0.00000	
Marateca	0.85660*	0.84908*	0.84908*	0.84908*	0.87785*	0.85660*	0.82318*	0.78163*	0.79209*	0.81818*	0.78362*	0.39985*	0.79834*	0.04509	0.08825	0.16252*	0.00000
Odivelas	0.96301*	0.96097*	0.96097*	0.96097*	0.96873*	0.96301*	0.93764*	0.91198*	0.91718*	0.90248*	0.91107*	0.68779*	0.92432*	-0.03004	0.01574	0.03747	0.12451

Em relação aos índices de diversidade, as populações que apresentaram índices de diversidade genética mais elevados são “Maior” ($h=0,822\pm 0,014$) e “Campilhas” ($h=0,8000\pm 0,1640$). Em relação aos índices de diversidade nucleotídica e de MNPD, as populações com valores mais elevados são “Marateca” ($\pi=0,0049\pm 0,0029$; $MNPD=3,53\pm 1,88$) e “Maior” ($\pi=0,002155\pm 0,001454$; $MNPD=1,551837\pm 0,943378$). Em contraste, as populações do “Oeste” (Lage, Barcarena, Colares, Jamor, Lizandro e Samarra) apresentaram valores nulos para os três índices ($h=0,0000\pm 0,0000$; $\pi=0,0000\pm 0,0000$; $MNPD=0,0000\pm 0,0000$) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4

Número de amostras sequenciadas para o gene cytb, número de haplótipos e sites polimórficos encontrados, diversidade genética e nucleotídica e número médio de diferenças emparelhadas (mean number of pairwise differences- MNPD) para cada população.

População	N	N.º haplótipos	N.º sites polimórficos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	MNPD
Lage	19	1	0	0,0000±0,0000	0,000000±0,000000	0,000000±0,000000
Barcarena	17	1	0	0,0000±0,0000	0,000000±0,000000	0,000000±0,000000
Colares	17	1	0	0,0000±0,0000	0,000000±0,000000	0,000000±0,000000
Jamor	17	1	0	0,0000±0,0000	0,000000±0,000000	0,000000±0,000000
Lizandro	26	1	0	0,0000±0,0000	0,000000±0,000000	0,000000±0,000000
Samarra	19	1	0	0,0000±0,0000	0,000000±0,000000	0,000000±0,000000
Alviela	21	4	3	0,6095±0,0865	0,000979±0,000857	0,704762±0,552685
Coina	16	2	3	0,5000±0,0741	0,002083±0,001483	1,500000±0,953049
Grande da Pipa	20	3	3	0,5947±0,0726	0,001711±0,001265	1,231579±0,815202
Maior	50	6	6	0,8220±0,0143	0,002155±0,001454	1,551837±0,943378
Ota	19	4	5	0,6257±0,0669	0,001998±0,001422	1,438596±0,915993
Sorraia	10	2	2	0,2000±0,1541	0,000556±0,000633	0,400000±0,402885
Trancão	19	2	2	0,5146±0,0517	0,001429±0,001115	1,029240±0,718563
Campilhas	5	3	2	0,8000±0,1640	0,001389±0,001293	1,000000±0,796333
Corona	6	3	2	0,7333±0,1552	0,001296±0,001183	0,933333±0,737865
Grândola	27	8	8	0,7407±0,0587	0,001527±0,001150	1,099715±0,743354
Marateca	18	2	12	0,2941±0,1193	0,004902±0,002925	3,529412±1,883384
Odivelas	20	6	5	0,6842±0,1028	0,001462±0,001130	1,052632±0,728451

Sendo que ambos os genes apresentam uma divisão clara entre os dois grupos, “Sado” e “Tejo e Oeste, podemos assumir que este grupo diferenciado do “Tejo e Oeste” constitui uma nova espécie do género *Iberochondrostoma*. Da observação das autapomorfias, características únicas e distintivas de um determinado *taxon*, conclui-se

que *I. lusitanicum* e *Iberochondrostoma* nov. sp. se distinguem por 7 autapomorfias (Tabela 4.5).

Tabela 4.5

Lista de autapomorfias em cada haplótipo de Iberochondrostoma lusitanicum e de Iberochondrostoma nov.sp.

Haplótipo	Posição							Espécie
	81	195	213	423	459	615	693	
IBLUS1	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS2	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS3	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS4	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS5	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS6	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS7	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS8	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS9	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS10	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS11	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS12	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS13	T	A	A	G	C	A	C	<i>Iberochondrostoma</i> nov.sp.
IBLUS14	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS15	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS16	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS17	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS18	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS19	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS20	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS21	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS22	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS23	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS24	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS25	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS26	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS27	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>
IBLUS28	C	G	G	A	A	G	A	<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>

Principais conclusões

A abordagem molecular confirmou a informação sugerida em trabalhos anteriores, validando a singularidade das populações de *I. lusitanicum* do Sado e ribeiras costeiras contíguas (Melides e Junqueira) e justificando o seu reconhecimento como uma unidade evolutiva independente das restantes populações que ocorrem a norte destas, no Tejo inferior e região Oeste.

Nesta abordagem filogeográfica tradicional das populações de *I. lusitanicum* importa referir que as populações com índices de diversidade genética mais elevados são “Maior” ($h=0,822\pm 0,014$) e “Campilhas” ($h=0,8000\pm 0,1640$). Em relação aos índices de diversidade nucleotídica e de MNPD, as populações com valores mais elevados são “Marateca” ($\pi=0,0049\pm 0,0029$; MNPD=3,53±1,88) e “Maior” ($\pi=0,002155\pm 0,001454$; MNPD=1,551837±0,943378). Em contraste, as populações do “Oeste” (Lage, Barcarena, Colares, Jamor, Lizandro e Samarra) apresentaram valores nulos para os três índices.

Se compararmos estes resultados filogeográficos com os resultados obtidos por (Robalo et al., in press), ambos confirmam estudos anteriores (Robalo, Doadrio, et al., 2007) e indicam uma separação em dois grandes grupos, por um lado as populações do Sado, por outro as do Tejo e Oeste, embora existam algumas sub-bacias geograficamente próximas (pertencentes às bacias hidrográficas do Tejo e do Sado) com indivíduos que apresentam genes de ambas as linhagens, *I. lusitanicum* e *Iberochondrostoma* nov. sp.

No estudo genómico efectuado por (Robalo et al., in press), a análise das populações de *I. lusitanicum* em toda a sua área de distribuição, revelou, além da existência destas duas entidades taxonómicas (Sado e Tejo+Oeste), uma introgressão localizada de genes de *I. lusitanicum* do grupo Tejo+Oeste no genoma dos indivíduos que ocorrem na ribeira da Marateca, o que pode ser resultado de uma introdução por mão humana de exemplares provenientes de uma sub-bacia da margem esquerda do Tejo ou, eventualmente, de uma colonização natural através do estuário do Tejo em época de regressão marinha. Estes resultados vêm fortalecer e confirmar o que já tinha sido descrito em (Robalo, Doadrio, et al., 2007; Robalo et al., 2008), baseado em análises moleculares de *cytb* e de *bact*, uma separação clara de *I. lusitanicum* em dois grupos, cada um com um conjunto característico de haplótipos: “Tejo+Oeste” e “Sado”.

Nos dados obtidos com o gene nuclear *bact*, existe também uma partilha de haplótipos entre todas as populações do Sado e algumas do Oeste (Samarra, Lizandro e

Colares). Esta partilha pode ser resultado de uma retenção de um polimorfismo ancestral que terá sido preservado, uma vez que o gene nuclear *bact* evolui muito mais lentamente e a diferenciação em duas espécies terá sido um evento recente.

As populações do Tejo apresentam também alguma diversidade genética, com vários haplótipos privados, no entanto, as populações do Oeste são muito semelhantes, apresentando todas o mesmo haplótipo.

Assim, confirma-se, a nível molecular, a existência de uma nova entidade taxonómica distinta de *I. lusitanicum*, propondo-se i) a inclusão das populações do Tejo e Oeste numa nova espécie a descrever, e ii) dadas as suas especificidades genéticas e biogeográficas, a definição de três unidades de conservação (ESU) distintas, englobando as populações do Sado, as do Tejo e as do Oeste.

O Capítulo V desta tese inclui os dados relevantes para a proposta de descrição formal desta nova entidade taxonómica. Uma vez que esta nova espécie representa uma população de uma espécie pré-existente, importa considerar a origem do holótipo de *I. lusitanicum*, depositado no Museu Bocage (M. B. c.1.1-C.1.12) (Collares-Pereira, 1980). Sendo este oriundo da bacia do Sado, a nova entidade taxonómica será atribuída às populações do Tejo/Oeste.

Capítulo V – Descrição de nova espécie

Enquadramento

Como já foi referido anteriormente, (Robalo, Doadrio, et al., 2007) identificaram duas unidades evolutivas distintas dentro da zona de distribuição de *I. lusitanicum*, uma com indivíduos pertencentes à população do Sado e a outra com indivíduos da Lagoa de Albufeira e das ribeiras da região Oeste de Lisboa.

O capítulo IV pretendeu confirmar estas unidades distintas, utilizando abordagens moleculares e uma maior área de amostragem. Considerando os resultados obtidos na análise dos marcadores *cytb* e *bact*, corroborados por dados genómicos entretanto obtidos (Robalo et al., in press) identificou-se a necessidade de realizar análises merísticas e morfométricas a espécimes de duas populações distintas dentro da sua área de distribuição para se perceber se aos dados moleculares correspondiam já, também, diferenças morfológicas.

O presente capítulo apresenta argumentos que mostram que as características das populações do Tejo inferior e Região Oeste justificam a sua inclusão numa nova espécie, para a qual se propõe o nome *Iberochondrostoma tagensis*. A confirmação da existência de uma nova entidade taxonómica pretende contribuir para a definição de unidades de conservação mais precisas e, conseqüentemente, para o estabelecimento de medidas de conservação adequadas.

Material e Métodos

Amostragem

Sendo que Collares-Pereira (1980) descreveu *I. lusitanicum* com base em exemplares da população do Sado (Ribeira de Xarrama), para a descrição de *Iberochondrostoma tagensis* nov. sp. foram recolhidos 20 indivíduos adultos da ribeira da Lage (Oeiras, 38°41'48.9''N 9°18'53.0''W) que constituem a série tipo a depositar no Museu Nacional de História Natural e da Ciência (MNHNC). Para efeitos comparativos foram também analisados 17 exemplares de *I. lusitanicum* da ribeira de Grândola, na bacia do Sado (Grândola, 38°10'09.9''N 8°33'55.7''W) (Figura 5.1). As referências de

cada indivíduo são as da coleção MARE-ISPA, mas serão corrigidas para referências do MNHNC quando da sua deposição nessa coleção.

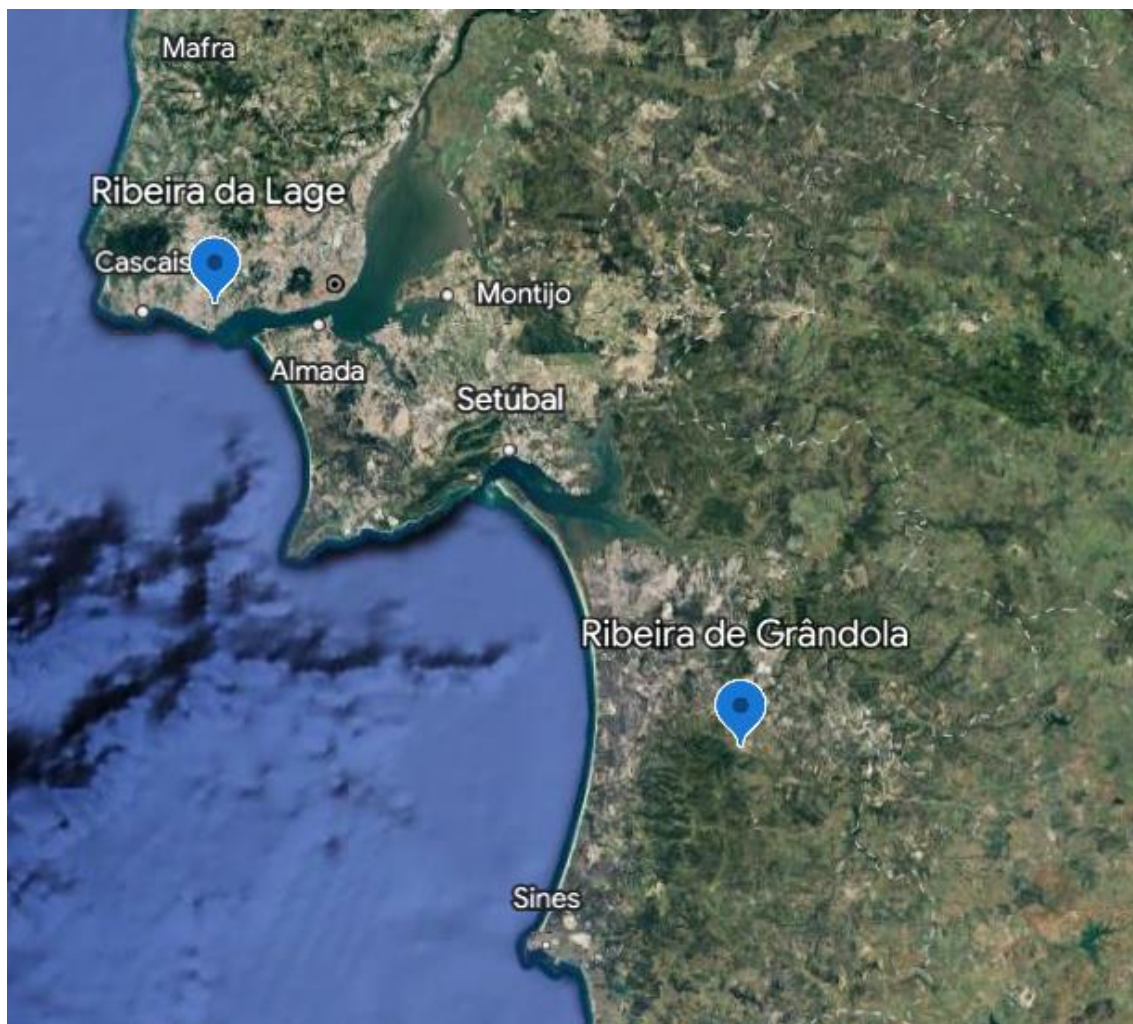


Figura 5.1- Localização dos pontos de captura da série tipo de *Iberochoondrostoma tagensis*, na ribeira da Lage, e do conjunto comparativo de *Iberochoondrostoma lusitanicum*, na ribeira de Grândola.

Estes indivíduos foram recolhidos com recurso a pesca elétrica, como descrito anteriormente, e occisados com uma sobredose de MS222 (*Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt analytical standard* – Merck), seguindo as recomendações de bem-estar animal em vigor. Foram levados para o laboratório onde foram conservados numa solução de formaldeído a 4% durante quatro dias, após os quais foram transferidos para tubos *falcon* com etanol a 70% para conservação a longo prazo.

Merística e Morfometria

Cada exemplar foi fotografado e foram recolhidas várias medidas para análises merísticas (sete caracteres) e morfométricas (onze caracteres) (Figura 5.2). As contagens dos caracteres merísticos foram efectuadas com o auxílio de um estereomicroscópio Zeiss Stemi 508 e as medições foram efectuadas utilizando o programa ImageJ v.1.54d (www.imagej.org) a partir de fotografias de cada exemplar, medidas ao 0,01mm mais próximo.

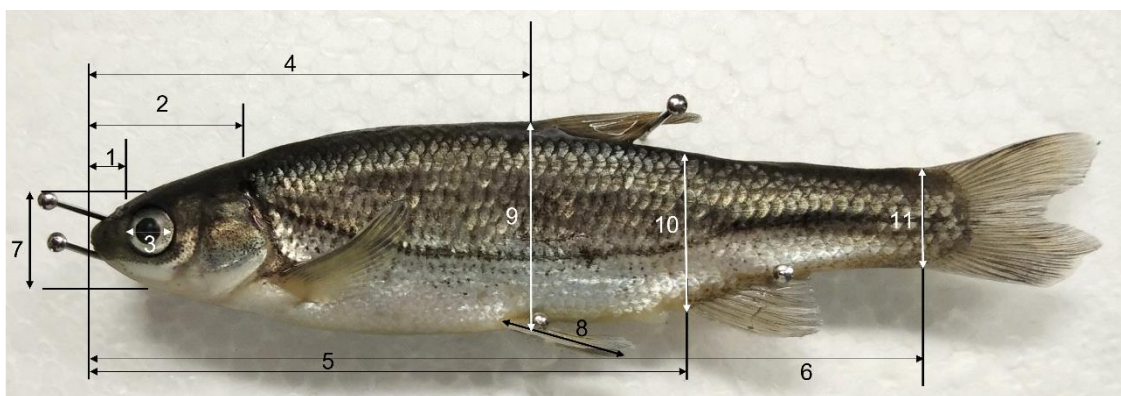


Figura 5.2- Representação dos detalhes morfométricos registados para *Iberochondrostoma tagensis* (nov. sp.). 1- Comprimento pré-orbital, 2- comprimento da cabeça, 3- diâmetro do olho, 4- comprimento pré-dorsal, 5- comprimento pré-anal, 6- comprimento *standard*, 7- altura da cabeça, 8- comprimento das barbatanas pélvicas, 9- altura pré-dorsal, 10- altura pré-anal, 11- altura do pedúnculo caudal.

Nas tabelas e no texto, foram usadas as seguintes abreviaturas para referenciar os caracteres merísticos e morfométricos: ELL, escamas linha lateral; ELLAc, escamas acima da linha lateral; ELLAb, escamas abaixo da linha lateral; RD, raios barbatana dorsal (RDe- raios espinhosos e RDr- raios ramificados); RA, raios barbatana anal (RAe- raios espinhosos e RAr- raios ramificados); CS, comprimento *standard*; CC, comprimento cabeça; AC, altura da cabeça; CprOr, comprimento pré-orbital; DO, diâmetro olho; CPrD, comprimento pré-dorsal; CPrA, comprimento pré-anal; APrD, altura pré-dorsal; APrA, altura pré-anal; APC, altura do pedúnculo caudal; CBP, comprimento das barbatanas pélvicas.

Análise estatística

De modo a comparar as duas espécies, no que diz respeito à forma e dimensões dos indivíduos de *I. lusitanicum* e *I. tagensis* nov. sp., foram realizados testes não-paramétricos de Mann-Whitney para as variáveis merísticas. Seguindo o método utilizado por Coelho et al. (2005), as variáveis morfométricas foram transformadas e foram realizados testes não-paramétricos de Mann-Whitney com o *ratio* entre as mesmas e o CS e a AC.

Foi realizada uma análise discriminante com as variáveis merísticas. No caso das variáveis morfométricas, estas foram transformadas utilizando o método utilizado por Robalo et al. (2005) e foram utilizados os resíduos de regressões log-log entre as variáveis morfométricas e o CS. Em ambos os casos foram utilizadas análises *stepwise*, permitindo seleccionar quais as variáveis mais importantes na discriminação das duas espécies. As análises estatísticas foram realizadas com o programa IBM SPSS Statistics v. 29.0.0.0 (241).

Resultados

Os resultados das análises merísticas e morfométricas de todos os indivíduos em estudo, *I. tagensis* sp. nov. (n=20) e *I. lusitanicum* (n=17), estão apresentados na Tabela 5.1, onde se podem observar quais as variáveis que apresentaram diferenças significativas.

Tabela 5.1

Valores médios, variação e desvio padrão das variáveis merísticas e morfométricas registados para *Iberochondrostoma tagensis* nov. sp. e *Iberochondrostoma lusitanicum* (Sado). As abreviaturas estão listadas na secção Material e Métodos. As medições apresentam-se em mm.

Variável	<i>I. tagensis</i>		<i>I. lusitanicum</i>	
	Amplitude	Média	Amplitude	Média
ELL*	40-55	46,8	44-52	47,8
ELLAc*	10-12	11,2	9-12	10,8
ELLAb	4-6	5,0	4-5	4,6
RDe	3-3	3	3-3	3
RDr*	7-8	7,6	7-8	7,7
RAe	3-3	3	3-3	3
RAr*	6-8	7,4	7-8	7,7
CS†	44,2-76,7	61,8	51,5-75,0	59,9
CC†‡	8,5-13,6	11,5	10,1-14,8	12,3
AC†‡	5,2-8,6	7,4	6,4-9,8	7,5
CPrOr†‡	1,5-3,4	2,5	2,2-4,0	2,9
DO†	2,8-4,8	3,9	3,1-5,3	3,9
CPrD†	24,4-39,5	33,7	28,3-41,0	33,1
CPrA†‡	32,5-52,8	44,4	38,2-55,6	44,4
APrD†	11,4-19,6	16,3	13,2-20,2	15,9
APrA†‡	8,6-15,9	12,7	9,8-14,7	11,8
APC†	5,4-9,4	7,9	5,9-9,6	7,4
CBP†‡	7,9-12,6	10,8	7,2-12,5	9,1

Nota: para as variáveis morfométricas, encontram-se assinaladas aquelas que apresentaram diferenças significativas na transformação em relação ao CS (‡) e em relação à AC (†).

Os resultados da análise discriminante *stepwise* dos dados merísticos estão apresentados na Tabela 5.2. Verifica-se que todas as variáveis incluídas, excepto a ELLAb, apresentam um poder discriminante significativo.

Tabela 5.2

Resultados da análise discriminante stepwise para os dados merísticos. As variáveis com poder discriminante estão assinaladas com *.

	Lambda de Wilks	F	Sig.
ELL*	0,845	6,398	0,016
ELLAc*	0,379	57,354	<,001
ELLAb	0,944	2,068	0,159
RDr*	0,874	5,063	0,031
RAr*	0,816	7,874	0,008

Segundo esta função 100% dos indivíduos de *I. tagensis* foram correctamente classificados, bem como 94,1% dos indivíduos de *I. lusitanicum*.

Considerando os dados morfométricos, verifica-se que os resíduos das regressões log-log entre as variáveis CPrO e CBP e o CS são as únicas variáveis que apresentam poder discriminante (Tabela 5.3).

Tabela 5.3

Resultados da análise discriminante realizada com os dados morfométricos. As variáveis com poder discriminante estão assinaladas com *.

	Lambda de Wilks	F	Sig.
Residuals CC	0,922	2,951	0,095
Residuals LC	0,983	0,603	0,442
Residuals CPrOr*	0,832	7,05	0,012
Residuals DO	0,998	0,078	0,782
Residuals CPrD	0,995	0,184	0,67
Residuals CPrA	1,000	0,001	0,973
Residuals LPC	0,943	2,111	0,155
Residuals CBP*	0,688	15,904	<0,001
Residuals APrD	0,991	0,335	0,566
Residuals APrA	0,934	2,485	0,124

Segundo esta função, todos os indivíduos de *I. lusitanicum* foram correctamente classificados, assim como 90% dos indivíduos pertencentes a *I. tagensis*.

Iberochondrostoma tagensis (nov. sp.)

Holótipo. CLL21, CS 61,9 mm, 2023, Ribeira da Lage, Oeiras/Lisboa (38°41'48.9"N 9°18'53.0"W), bacia do Tejo, centro-oeste de Portugal.



Figura 5.3- Holótipo de *Iberochondrostoma tagensis*, da Ribeira da Lage, bacia do Tejo inferior. Oeiras, Lisboa, Portugal. Referência CLL21. CS=61,9 mm.

Parátipos. 19 indivíduos, CLL8-10, CLL12-13, CLL15-20, CLL22-29, 2023, Ribeira da Lage, Oeiras/Lisboa (38°41'48.9"N 9°18'53.0"W), bacia do Tejo, centro-oeste de Portugal.

Diagnóstico. *Iberochondrostoma tagensis* nov. sp. é uma espécie do género *Iberochondrostoma* (Robalo, Almada, et al., 2007) e diferencia-se de *I. lusitanicum* segundo conjunto de características/caracteres apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4

Valores médios e amplitude dos caracteres distintivos entre *Iberochondrostoma tagensis* e *Iberochondrostoma lusitanicum*. As setas indicam se o valor encontrado para *I. tagensis* é superior ou inferior ao encontrado para *I. lusitanicum*.

Variável	<i>I. tagensis</i>		<i>I. lusitanicum</i>	
	Amplitude	Média	Amplitude	Média
ELL	40-55	46,8 ↓	44-52	47,8
ELLAc	10-12	11,2 ↑	9-12	10,8
RDr	7-8	7,6 ↓	7-8	7,7
RAr	6-8	7,4 ↓	7-8	7,7
CPrOr	1,5-3,4	2,5 ↓	2,2-4,0	2,9
CBP	7,9-12,6	10,8 ↑	7,2-12,5	9,1

Descrição

RD III $\bar{x} = 7,6 \pm 0,5$ (7-8), RA III $\bar{x} = 7,4 \pm 0,6$ (6-8), ELL $\bar{x} = 46,8 \pm 3,2$ (40-55), ELLAc $\bar{x} = 11,2 \pm 0,6$ (10-12), ELLAb $\bar{x} = 5,0 \pm 0,5$ (4-6).

Apesar de haver alguma sobreposição, as contagens das escamas apresentam valores significativamente diferentes excepto os abaixo da linha lateral (ELLAb). Embora tenha uma variação mais abrangente, *I. tagensis* apresenta um número médio de escamas da linha lateral inferior (46,8) a *I. lusitanicum* (47,8). Em relação às escamas acima da linha lateral e abaixo da mesma, os seus números médios são superiores (ELLAc= 11,2; ELLAb= 5,0) aos de *I. lusitanicum* (ELLAc= 10,8; ELLAb= 4,6). O CS médio de *I. tagensis* (61,8 mm) é maior do que o apresentado por *I. lusitanicum* (59,9mm). Em relação às dimensões da cabeça e comprimento pré-orbital, *I. tagensis* apresenta valores inferiores a *I. lusitanicum* apesar de manter valores semelhantes para o diâmetro do olho.

Padrão de pigmentação

A parte dorsal (acima da linha lateral) destes peixes é cinzento-escura ou acastanhada; a linha lateral está claramente demarcada com pontilhado negro e, abaixo dela, duas filas de escamas com padrão irregular de pontos dispersos; a parte ventral apresenta uma coloração prateada. Nas barbatanas, os raios apresentam uma coloração mais escura, são bem identificáveis; a cabeça apresenta também uma coloração mais escura podendo ser acinzentada ou acastanhada, com padrões pontilhados nos opérculos, à volta dos olhos e nos lábios.

Etimologia

A zona de ocorrência desta espécie localiza-se no Tejo inferior e o nome *tagensis* remete para a zona de ocorrência, a bacia do Tejo inferior.

Nome comum

Boga do Tejo inferior.

Distribuição

Esta nova espécie está presente na zona mais ocidental da bacia do Tejo e algumas ribeiras da zona oeste (Lage, Jamor, Barcarena, Samarra, Lizandro e Colares) (Figura 5.4).

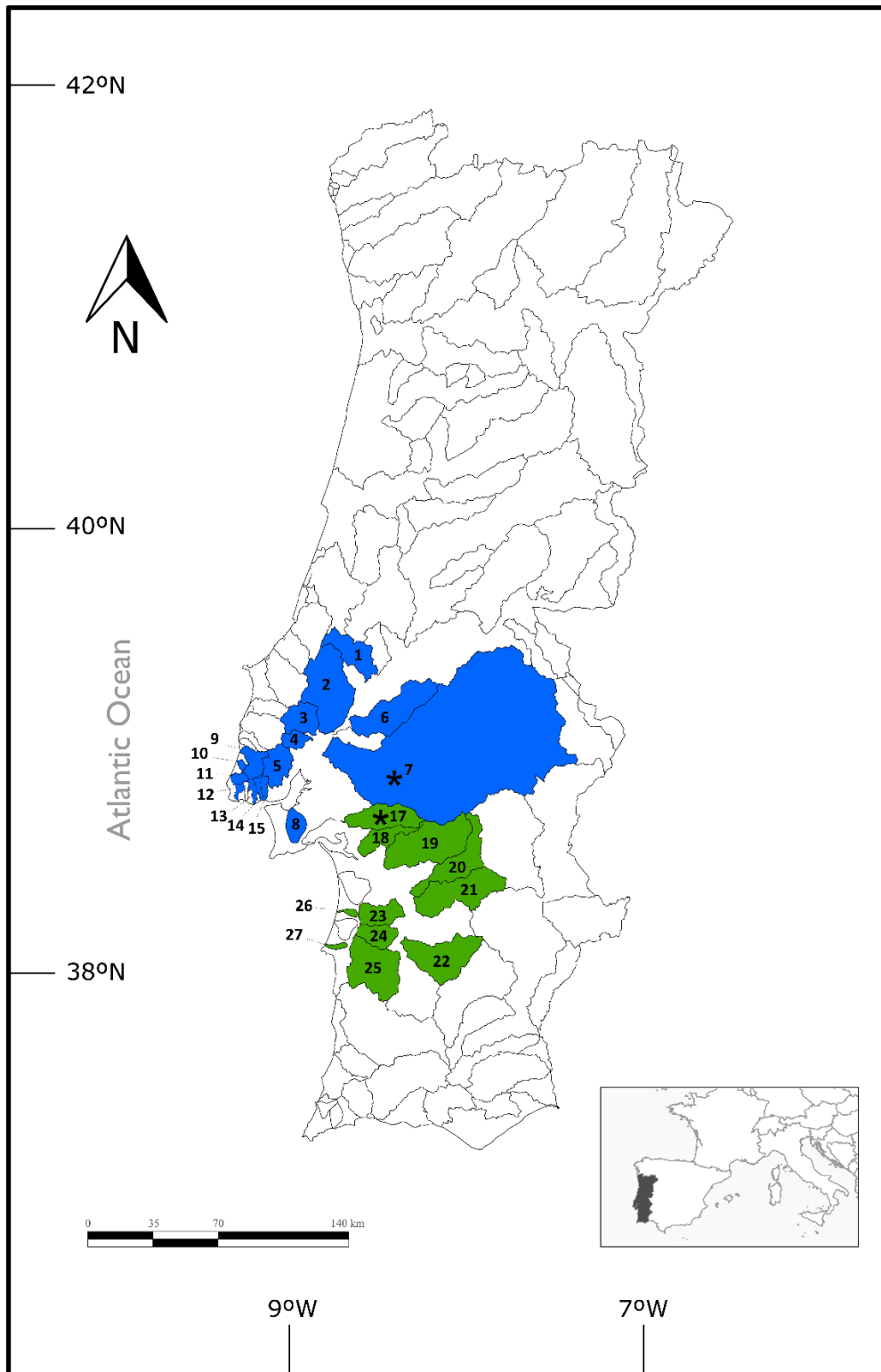


Figura 5.4 – Distribuição de *Iberochondrostoma tagensis* (azul) e *Iberochondrostoma lusitanicum* (verde). 1 - Tejo-Alviela; 2 - Tejo-Maior; 3 - Tejo-Ota; 4 - Tejo-Grande da Pipa; 5 - Tejo-Trancão; 6 - Tejo-Muge; 7 - Tejo-Sorraia; 8 - Tejo-Coina; 9 - Lizandro; 10 - Samarra; 11 - Colares; 12 - Caparide; 13 - Lage; 14 - Barcarena; 15 - Jamor; 17 - Sado-Marateca; 18 - Sado-São Martinho; 19 - Sado-Alcáçovas; 20 - Sado-Xarrama; 21 - Sado-Odivelas; 22 - Sado-Roxo; 23 - Sado-Grândola; 24 - Sado-Corona; 25 - Sado-Campilhas; 26 - Melides; 27 - Junqueira. (*) sub-bacias onde foram detectadas introgressões para o gene mitocondrial cytb.

Conservação

Esta nova espécie foi isolada de uma espécie com uma distribuição reduzida e com perturbações frequentes ao seu habitat. São mais comuns as ações de limpeza das margens que destroem totalmente a vegetação, perturbam o leito do rio e que potenciam os períodos de seca das ribeiras no Verão e cheias violentas no Inverno. Também existem com frequência episódios de poluição que, ainda que possam ser pontuais, contribuem para a degradação dos habitats e para a possível transmissão de doenças nos peixes. Esta é uma espécie muito ameaçada pela presença de espécies exóticas, degradação da galeria ripícola, poluição das linhas de água e extracção de água para rega de culturas agrícolas (Collares-Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2009). Dada a distribuição reduzida, o número relativamente reduzido de indivíduos, as ameaças aos habitats desta espécie e seguindo as diretrizes da IUCN (IUCN, 2012) no que respeita a classificação das espécies e populações em termos de níveis de ameaça, recomendamos que a esta nova espécie seja atribuída a mesma classificação que foi atribuída a *I. lusitanicum*, Criticamente em Perigo (A2ce+3ce+4ce).

Principais Conclusões

As análises apresentadas neste capítulo vêm confirmar os resultados obtidos nas análises moleculares e indiciados em trabalhos anteriores (Robalo, Doadrio, et al., 2007). Apesar desta confirmação, observou-se uma sobreposição dos valores das variáveis entre as duas espécies, embora, alguns com diferenças significativas.

Esta nova espécie distingue-se de *I. lusitanicum* no número de escamas da linha lateral, no número de escamas acima da linha lateral e no número de raios ramificados da barbatana dorsal e da barbatana anal. A nível morfométrico há também diferenças significativas nos comprimentos da cabeça, pré-orbital, pré-anal e das barbatanas pélvicas, bem como na altura da cabeça e na altura pré-anal.

Uma vez que esta nova espécie está a ser diferenciada de uma espécie com uma distribuição já reduzida e está sujeita ao mesmo tipo de ameaças, sugere-se que a sua classificação IUCN seja, pelo menos, semelhante à atribuída a *I. lusitanicum*, Criticamente em Perigo (A2ce+3ce+4ce). Na recente revisão do Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Migradores de Portugal (Magalhães et al., 2023) foi atribuída a categoria de ameaça “*Em Perigo*”.

Discussão

Esta tese teve como objectivo principal gerar conhecimento indispensável à conservação de *I. lusitanicum*, endemismo português de limitada distribuição geográfica. No cumprimento desse objectivo, a presente discussão integra os principais contributos nas várias áreas investigadas, apresentando os resultados do trabalho de monitorização e conservação que têm vindo a ser realizados sobre uma das espécies de peixes de água doce endémicas de Portugal e esclarecendo as relações genéticas entre as suas populações, já sugeridas em trabalhos anteriores. Os resultados obtidos nos capítulos IV e V confirmam a existência de uma entidade taxonómica distinta nos cursos de água do Tejo inferior e Região Oeste, cujas populações têm sido tradicionalmente atribuídas a *I. lusitanicum*. A validação desta nova espécie (*I. tagensis*, Capítulo V), recorrendo a dados morfológicos e moleculares é um dos principais contributos desta tese e tem um impacto considerável na interpretação dos vários resultados, nomeadamente no que respeita à identidade das populações estudadas (consideradas como pertencentes a *I. lusitanicum* antes da obtenção dos resultados que conduziram à necessidade inequívoca de dividir esta espécie em duas entidades taxonómicas distintas). Resumindo, após a separação da espécie *I. lusitanicum* em duas entidades distintas, esta espécie passa a ser restrita à Bacia do Sado, enquanto a nova espécie *I. tagensis* se encontra distribuída numa área que engloba as sub-bacias do Tejo inferior e bacias da Região Oeste. Como mencionado acima, a descrição de uma nova espécie teve igualmente repercussões na identidade das populações estudadas (anteriormente consideradas na sua globalidade como *I. lusitanicum*): no Capítulo I, onde se apresentam os resultados das monitorizações em ambiente urbano, as populações estudadas pertencem à bacia do Tejo inferior e Região Oeste, tratando-se, portanto, de *I. tagensis*; no Capítulo II, reportam-se os resultados do programa de reprodução *ex situ* que tem populações-alvo de ambas as espécies (*I. lusitanicum* do Sado e *I. tagensis* da Lage e Samarra); e, no Capítulo III, acompanhou-se o desenvolvimento embrionário e larvar de indivíduos da população da ribeira de Grândola (bacia do Sado) que estava a ser reproduzida nesse ano no Aquário Vasco da Gama (AVG), pertencentes à espécie *I. lusitanicum*. À luz do conhecimento actual, sabendo que existem duas entidades taxonómicas distintas, seria obviamente interessante implementar, no futuro, estudos idênticos aos efectuados no âmbito do plano de trabalhos desta tese, escolhendo populações-alvo de ambas as espécies para complementar os

resultados obtidos de forma parcial por falta de conhecimento inequívoco prévio sobre esta questão taxonómica. Mais concretamente, seria interessante implementar monitorizações do estado de conservação das populações de *I. lusitanicum* e estudar o desenvolvimento embrionário de *I. tagensis* (complementando os resultados obtidos, respectivamente, nos Capítulos I e III).

As principais conclusões dos resultados obtidos nos Capítulos I a IV foram já apresentadas nas respectivas secções. Neste capítulo final, os principais resultados e conclusões foram integrados e discutidos de forma a atingir o principal objectivo da presente tese: fornecer contributos sobre a ecologia, reprodução e genética para o conhecimento aprofundado de uma das espécies mais ameaçadas da ictiofauna nativa de Portugal, a boga-portuguesa *I. lusitanicum*. Assim, esta discussão será estruturada seguindo a ordem dos capítulos que a precedem.

A monitorização das populações de *I. tagensis* das ribeiras situadas na região de Lisboa (Capítulo I) (i.e. em ambiente urbano) permitiu analisar a estrutura das populações e assim fazer inferências sobre o sucesso das épocas de reprodução e sobre o seu estado geral de conservação. Por exemplo, em anos em que a maior parte dos indivíduos amostrados se encontra nas classes de tamanho mais baixas, podemos inferir que a época de reprodução anterior foi bem-sucedida, registando-se um elevado recrutamento da população. A ausência ou menor abundância relativa de indivíduos adultos, por seu turno, poderá decorrer de um evento extremo que tenha causado a sua morte (e.g. depleção de oxigénio, com mais impacto em peixes de maiores dimensões (Müller et al., 2023) ou deslocação para outros habitats (e.g. em resultado de arrastamento para jusante por caudais torrenciais e posterior incapacidade de voltar aos habitats ocupados pelos juvenis devido à existência de barreiras transversais intransponíveis). Alternativamente, o facto de se encontrarem poucos indivíduos de maiores dimensões pode indicar que os locais escolhidos para a monitorização são locais de refúgio de juvenis, podendo haver uma distribuição diferencial por classes de tamanho, sobretudo em período de escassez hídrica pós-estival. Sabe-se, para outras espécies, que os indivíduos adultos e juvenis se encontram em partes diferentes dos rios, com os juvenis a procurar zonas mais calmas, menos profundas e com refúgios conferidos, por exemplo, por abundante vegetação aquática (e.g. Wolter & Sukhodolov, 2008). De modo a confirmar esta hipótese teriam de ser prospectados outros locais a montante e jusante para se perceber se existe segregação espacial por classes dimensionais e, caso exista, se esta está correlacionada com

características do habitat como a profundidade, a presença de refúgios ou o teor de oxigénio dissolvido.

No que diz respeito à densidade média de indivíduos por unidade de volume (m^3), os resultados mostram aumentos e decréscimos sem que estes se traduzam num padrão identificável, possivelmente porque a série temporal analisada é relativamente curta. Uma monitorização consistente e de longo prazo, muito para além do âmbito desta tese, será essencial para a detecção de padrões temporais e espaciais. Estas séries temporais duradoras são fundamentais para a monitorização das alterações sofridas nestes habitats (antropogénicas e hidrológicas, por exemplo) e, conseqüentemente, para a avaliação dos impactos nos organismos que neles habitam. Estudos como estes complementam, a uma escala mais local, os dados recolhidos pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA) no âmbito das suas competências relacionadas com as obrigações europeias a que Portugal se encontra vinculado, nomeadamente a implementação nacional da Directiva Quadro da Água (Feio & Ferreira, 2019).

Em relação à avaliação do estado das galerias ripícolas, em alguns locais amostrados foi detectada uma diminuição da sua complexidade ao longo dos anos, apesar de apresentarem taxas de ensombramento elevadas. A qualidade da galeria ripícola tem uma importância fulcral na ecologia ribeirinha, pois, além de fornecer ensombramento e reduzir a temperatura e evaporação da água, permite a retenção de sedimentos e a redução da erosão dos solos, fornecendo um aporte de nutrientes e de fauna associada (invertebrados) tanto maior quanto mais diversificada for a vegetação, actuando esta como filtro para contaminantes no solo (Maceda-Veiga, 2013). Além disto, a vegetação ribeirinha, quer arbustiva quer lenhosa, pode fornecer retorno económico de vários tipos e actua como protecção contra cheias (Feio & Ferreira, 2019). Deste modo, pode perceber-se que a qualidade da galeria ripícola nos locais amostrados neste trabalho não é a melhor e todas as funções descritas acima estão comprometidas, sendo importante tomar medidas para a sua reabilitação. Para ilustrar esta afirmação pode considerar-se o exemplo do Rio Jamor, onde foi possível constatar *in loco* a destruição de toda a vegetação das margens numa acção de “limpeza” por parte da autarquia. Como resultado previsível desta acção, no Inverno, o nível e velocidade da água aumentaram consideravelmente, devido aos efeitos negativos combinados decorrentes da linearização do canal, do aplanamento dos bancos de areia e destruição dos núcleos de plantas aquáticas enraizadas (que actuavam como amortecedores e deflectores da corrente), e da

ausência de vegetação nas margens (cujas raízes minimizavam a erosão e risco de derrocada das margens). As consequências estenderam-se ao Verão seguinte, em que grande parte do troço secou por não existirem pegos (em resultado do aplanamento dos sedimentos do leito e da derrocada das margens, contribuindo com sedimentos para a diminuição da profundidade do canal), nem vegetação que conferisse ensombramento ao canal, o que potenciou a evaporação.

Outra das ameaças conhecidas nos cursos de água ibéricos diz respeito às espécies exóticas e invasoras (Decreto-Lei n.º 92/2019, 2019). No que respeita às espécies de peixes exóticas e invasoras, estas só foram capturadas num dos pontos no rio Lizandro e em números relativamente baixos. Pelo contrário, o crustáceo exótico e invasor lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii*) foi capturado em vários locais de amostragem, embora as capturas tenham globalmente apresentado uma tendência decrescente. Estas amostragens são realizadas em pontos isolados no tempo e espaço e a ausência de espécies exóticas num determinado evento de monitorização, não significa que as mesmas não estejam presentes noutros locais a montante ou jusante. A presença de espécies exóticas invasoras é de especial preocupação, uma vez que o seu impacto nas espécies locais pode ser bastante prejudicial se se permitir o seu estabelecimento no habitat. No caso das espécies encontradas, apesar de não serem predadores directos dos indivíduos adultos, podem causar perturbações às espécies nativas por competição trófica, desestabilização dos habitats, predação de ovos e larvas, interacções comportamentais ou transferência de doenças e/ou agentes patogénicos (Ilhéu et al., 2007; Maceda-Veiga, 2013; Scott & Crossman, 1973). Embora os números encontrados não sejam muito elevados é importante continuar a monitorizar a sua presença e as entidades competentes devem desenvolver e implementar procedimentos para o seu controlo ou erradicação.

Uma das questões que seria importante considerar para estudos futuros seria a prospecção mais exaustiva destes cursos de água. Por questões logísticas e de eficiência, o estudo foi conduzido em pontos previamente conhecidos (não aleatórios). Seria importante conhecer o estado das populações e a sua estrutura populacional em mais troços destas ribeiras. Sendo que o capítulo pretendia incidir sobre a ictiofauna das ribeiras urbanas, os dados ambientais foram registados como informação acessória. No futuro será importante incluir nas monitorizações a recolha destes dados como um dos objectivos e estabelecer zonas pré-definidas para a monitorização, com uma área fixa e onde se registem as espécies de peixe presentes e também todos os factores abióticos de

interesse. Só desta forma podemos ter uma série temporal comparável e onde se poderão manifestar padrões. Isto não invalida que, ao mesmo tempo, se faça uma monitorização focada nas espécies, onde se prospectem os locais em busca das espécies-alvo, mesmo que não se encontrem na área pré-definida.

Patente que está a importância deste tipo de trabalhos, importa também comentar algumas das dificuldades como a falta de dados consistentes disponíveis para as variáveis ambientais, dados que são da responsabilidade das agências ambientais estatais- SNIRH, APA, IPMA, etc. Importa referir que estas monitorizações devem ser acompanhadas de registos dos parâmetros físico-químicos o mais objectivos possíveis (e.g. recorrendo preferencialmente a sondas multiparamétricas e não a métodos colorimétricos), se possível sempre nas mesmas condições para assegurar a reprodutibilidade e comparação dos dados ao longo da série temporal (e.g. à mesma hora, exactamente no mesmo local dentro do ponto de amostragem). Sendo estes locais densamente urbanizados, seria de esperar que os valores de alguns dos parâmetros ilustrassem alguma pressão (Feio & Ferreira, 2019), mas os dados das análises físico-químicas não revelaram valores acima do normal para a maioria dos parâmetros, excepto para a amónia em dois pontos da Ribeira da Lage, para os fosfatos na Ribeira de Barcarena, Rio Jamor e Rio Lizandro, e para os nitritos num ponto da Ribeira da Lage e um ponto no Rio Lizandro. No entanto, estas análises foram realizadas em pontos isolados no tempo e apenas uma vez por ano, o que não permite uma extrapolação à escala da bacia nem à escala temporal de um ano hidrológico.

O Capítulo II incidiu sobre os principais resultados da reprodução *ex situ* de *I. lusitanicum* e *I. tagensis*, complementando com dados mais recentes o trabalho já publicado por (Sousa-Santos, Gil et al., 2014) sobre esta ferramenta de conservação. De uma forma geral, estas espécies parecem responder bem ao ambiente artificial do cativeiro, produzindo elevados números de descendentes sob a abordagem de aquacultura semi-naturalista adoptada. Apesar disso, parece observar-se uma tendência de estabilização dos números de indivíduos nascidos em cativeiro por volta da terceira geração consecutiva, o que pode estar relacionado com a elevada densidade do tanque e da consequente maior predação de ovos por parte dos adultos e de eventual maior competição por espaço e alimento.

Os números de indivíduos nascidos em cativeiro são bastante díspares (entre gerações de uma mesma população e entre *stocks* da mesma espécie) pois a metodologia

escolhida para este programa pretendeu ser o mais naturalista possível, sem intervenção humana. Não é uma aquacultura convencional cujo objectivo é a produção do maior número possível de indivíduos recorrendo a vários tipos de manipulação, quer ambiental, quer dos indivíduos. Neste tipo de abordagem, os indivíduos reproduzem-se espontaneamente e a evolução das gerações tem a influência da selecção natural, embora em ambiente de cativeiro. Algumas gerações são mais produtivas, mas factores como a densidade de indivíduos no tanque podem ter função reguladora, diminuindo a produção da geração seguinte.

No caso da população de *I. lusitanicum* do Sado que tem vindo a ser reproduzida em cativeiro no âmbito deste Projecto, percebe-se que nem todos os *stocks* se comportam da mesma maneira, isto é, nem sempre a primeira geração (F1) é a que apresenta maior recrutamento. Esta diferença apresentada pelos diferentes *stocks* no que diz respeito número de indivíduos nascidos em cada geração pode estar relacionada com a existência de proporções diferentes de machos e fêmeas no grupo inicial de reprodutores selvagens. Este factor nem sempre é possível de controlar pois, as capturas de novos reprodutores são efectuadas preferencialmente antes das épocas de reprodução e, nessa altura, os indivíduos ainda não apresentam os caracteres secundários que distinguem fêmeas e machos (visíveis somente durante esse período). Além disso, por se tratar de uma espécie localmente pouco abundante, nem sempre é possível encontrar com facilidade os 30 indivíduos adultos selvagens cuja captura é autorizada pelo ICNF, pelo que quando esse número máximo estipulado é alcançado o *stock* é considerado completo, independentemente de ter ou não uma *sex ratio* equilibrada. Um exemplo disso foi o *stock* 2009-2013 do Sado, em que só foi possível capturar um número reduzido de reprodutores (N=10) e, nesse caso, já apresentavam caracteres, sendo possível identificar três fêmeas e sete machos. Após a primeira geração, o número de juvenis produzido nas gerações subsequentes (F2 e F3) pode estabilizar, pois, com o aumento do número total de indivíduos no tanque em resultado da primeira geração, a proporção entre machos e fêmeas tenderá a equilibrar-se com os descendentes a atingirem a idade adulta. Além disso, com o aumento do número de indivíduos adultos no tanque de reprodução, aumenta também a probabilidade de predação da fase larvar por parte dos adultos, sendo esta mais comum em espécies que se alimentam, pelo menos em parte, de invertebrados e outros peixes (Pereira et al., 2017). Uma vez que a boga-portuguesa tem um regime alimentar omnívoro, não se pode descartar a possibilidade de predação das larvas. Este factor não é

totalmente negativo, uma vez que expõe os indivíduos numa fase precoce da vida a acções predatórias, mimetizando mais um comportamento natural e preparando os indivíduos para as condições a que estarão sujeitos depois de libertados nos rios de origem da população. Por outro lado, a predação de ovos é relativamente comum em espécies semelhantes (Katano, 1992; Pereira et al., 2017), o que também pode justificar o padrão observado. Apesar do eventual efeito directo no recrutamento, a predação de ovos fará parte do repertório comportamental da espécie que se pretende que permaneça inalterado para um maior sucesso individual após libertação na natureza, pelo que é desejável que se continue a optar por não retirar as posturas do tanque dos adultos, permitindo que a selecção natural actue como aconteceria no meio natural.

Um das desvantagens comportamentais que podem surgir em peixes criados em cativeiro poderá ser a incapacidade de resistir a fluxos turbulentos e aumentos do caudal do rio nos períodos de chuvas. Em cativeiro não é fácil simular estes contextos, pelo que a selecção de indivíduos sem este comportamento no seu repertório pode ser um dos problemas associados à reprodução *ex situ* com vista à conservação desta espécie. Mameri et al. (2020) avaliaram a capacidade de resposta de várias espécies de leuciscídeos, incluindo *I. lusitanicum*, a diferentes velocidades de corrente. Neste estudo utilizaram indivíduos adultos nascidos em cativeiro e os resultados mostraram que não conseguem suplantar as maiores velocidades que estão registadas para os habitats onde os progenitores foram capturados. De modo a identificar se este factor resulta do ambiente em cativeiro ou se é uma característica da espécie, seria interessante reproduzir este estudo com indivíduos adultos selvagens. No entanto, umas das formas que os indivíduos, especialmente os juvenis, têm de resistir a estes fluxos turbulentos são os refúgios promovidos pela existência de plantas aquáticas e detritos lenhosos, o que está assegurado neste Projecto com a colocação de plantas e estruturas nos tanques de reprodução, apesar de não se simularem alterações do fluxo. No desenho experimental de um projecto equivalente, no futuro, talvez possa ser uma alteração a implementar.

Outra desvantagem comportamental decorrente da reprodução e crescimento *ex situ* prende-se com o sucesso na identificação de alimento vivo no meio natural. No AVG, as larvas e juvenis alimentam-se de fito e zooplâncton que ocorrem naturalmente nos tanques, mas os adultos são alimentados com mexilhão, camarão e ervilhas picados e, ocasionalmente, comida comercial em flocos, artémia viva e larva de mosquito vermelho. Apesar de terem acesso a alimento vivo, um possível melhoramento dos procedimentos

adoptados no âmbito deste Projecto seria fornecer somente o alimento vivo e, para tal, produzir em aquário espécies de invertebrados existentes nos rios/ribeiras onde se capturam os reprodutores selvagens.

Em relação às desvantagens genéticas associadas à reprodução em cativeiro, o Projecto de conservação *ex situ* em estudo tem implementadas algumas medidas de salvaguarda. Uma delas é a suplementação do *stock* inicial de indivíduos selvagens com um número idêntico de indivíduos criados em cativeiro (Woodworth et al., 2002), o que oferece a vantagem de duplicar o número inicial de reprodutores, potenciando a diversidade genética e um maior equilíbrio das *sex ratios*. No entanto, a adopção desta medida só é possível para populações-alvo que completaram, pelo menos, um ciclo de três gerações consecutivas em cativeiro e para as quais é necessário refundar novos *stocks* após a libertação de todos os indivíduos nascidos nesse primeiro ciclo, para repovoamento da população selvagem da qual descendem. Uma segunda medida de salvaguarda consiste na marcação individual de todos os peixes criados *ex situ* e que permite garantir que, aquando das capturas de novos reprodutores selvagens, não são escolhidos indivíduos que nasceram em cativeiro e que já tenham sido libertados no rio. Para isso, a cada evento de libertação, progenitores e descendência são marcados com o corte do ápice da barbatana dorsal que, ao regenerar, deixa uma pequena cicatriz identificável em capturas posteriores. O pequeno pedaço de tecido retirado da barbatana é guardado para estudos moleculares futuros, nomeadamente, com vista a quantificar a perda de diversidade genética relativamente aos valores de diversidade obtidos para a população selvagem, por efeitos de deriva e consanguinidade. Está já em preparação para publicação um estudo genómico desta natureza, incidindo sobre a descendência obtida em cativeiro de uma outra espécie de leuciscídeo endémico de Portugal, *Achondrostoma occidentale*, que indica existir uma perda de diversidade genética bastante reduzida após três gerações consecutivas obtidas a partir do mesmo *stock* inicial de reprodutores selvagens (C. Sousa-Santos, dados não publicados). Este resultado confirma a utilidade das medidas de salvaguarda implementadas e reforça a necessidade da sua manutenção.

Relativamente ao comportamento reprodutor de *I. lusitanicum*/*I. tagensis*, embora este tenha sido descrito por Carvalho et al. (2003), continuam a faltar estudos comportamentais comparativos e em ambiente natural para aferir se o ambiente artificial, embora o mais naturalista possível, altera o comportamento desta espécie.

Considera-se ainda importante ressaltar que o Projecto de conservação *ex situ* resultou de um protocolo entre a academia, um Aquário pertencente ao Estado e uma ONG ambiental e permitiu aumentar a visibilidade do problema da perda de biodiversidade associada à degradação dos ecossistemas fluviais, tendo igualmente estabelecido uma importante rede de contactos que permite alertar para situações anómalas (como mortalidade inesperada de peixes ou descargas poluentes) e implementação rápida de medidas para as solucionar. Entre 2011 e 2022, este Projecto foi responsável pelo repovoamento de onze populações de sete espécies ameaçadas, com a libertação de 22.246 indivíduos nascidos em cativeiro a partir de *stocks* de peixes selvagens previamente capturados nas populações em risco (C. Sousa-Santos, dados não publicados).

No que respeita aos desenvolvimentos embrionário e larvar de *I. lusitanicum* (Capítulo III) estes demoraram em média, respectivamente, 9 dias e 92 dias. Em relação ao desenvolvimento larvar, a sua duração foi mais longo do que aquela descrita por Carvalho (2001). A principal razão para esta diferença prende-se com a escolha do momento em que se considera completo o desenvolvimento larvar e o início da fase juvenil. No presente estudo considerou-se mais adequado estabelecer como final do desenvolvimento embrionário o momento em que os indivíduos perdem todas as características de larva e apresentam os caracteres idênticos aos dos adultos, mas com um comprimento mais reduzido. Assim, quando toda a prega média desapareceu, todas as barbatanas estão formadas e as escamas apresentam o padrão losangular dos adultos, é o momento do final do desenvolvimento larvar.

Um dos principais resultados do presente trabalho revela que o desenvolvimento larvar é mais bem ilustrado quando se utiliza o comprimento dos indivíduos, uma vez que parece existir uma grande variabilidade entre indivíduos mesmo dentro de cada postura, sujeitos às mesmas condições de ambiente, alimentação, etc. Esta variabilidade aparenta ser comum em peixes (Fuiman et al., 2005), mas existem factores, como competência na procura de alimento, tamanho das larvas e sua densidade no tanque (Hitzfelder et al., 2006; Lee et al., 2010; Pepin et al., 2014; Voeselek et al., 2018), que aumentam a probabilidade de existir variação entre indivíduos.

Ao contrário do normalmente considerado para os peixes, e embora a temperatura seja de extrema importância na reprodução e desenvolvimento das espécies (Fraser et al., 2019; Wang et al., 2010), esta não parece ter tido influência directa na grande

variabilidade encontrada no desenvolvimento e crescimento larvar, uma vez que na mesma postura se encontraram indivíduos em estados de desenvolvimento diferentes, apesar de sujeitos às mesmas condições ambientais. As temperaturas não tiveram uma grande variação durante a fase embrionária, fase mais sensível a este factor ambiental, pois o embrião não tem ainda capacidade de compensar as diferenças de temperatura, o que acontece só pouco após a eclosão (Wood & McDonald, 1997). A maior variação ocorreu durante a fase larvar, mas dentro dos limites dados para outras espécies de peixes (Wood & McDonald, 1997). Para *I. lusitanicum* não existe informação sobre a temperatura óptima a que ocorre a reprodução, nem sobre as temperaturas limite que tolera. Sendo uma espécie com categoria de ameaça elevada, não é eticamente aconselhável realizar estudos desse género, por isso, esta informação tem de ser inferida com base em estudos com outras espécies. Embora não se tenha conseguido relacionar a influência da temperatura com o desenvolvimento dos diferentes caracteres, este factor abiótico terá uma importância cada vez maior, especialmente nos cenários de alterações climáticas existentes neste momento (Brian et al., 2011). Esta espécie habita locais onde as temperaturas têm uma variação considerável durante o ano, logo, será expectável que estejam mais bem preparadas para eventos de subidas de temperatura. No entanto, estas alterações são sazonais e não se conhecem os efeitos de uma exposição mais prolongada a temperaturas elevadas nesta espécie.

O comprimento dos indivíduos e o ritmo a que crescem estão dependentes de vários factores internos e externos a cada indivíduo. Estes factores podem ser o estado dos progenitores e a qualidade da postura (Fuiman et al., 2005), o tamanho do ovo e do saco vitelino (Osse & van den Boogaart 1995), capacidade de reconhecer e capturar alimento (Pepin et al., 2014), densidade de larvas no tanque, disponibilidade de alimento (Mills, 1982). O desenvolvimentos das diferentes estruturas nas larvas de *I. lusitanicum* segue a mesma ordem observada para outras espécies e todas apresentam a prega média (Osse & Van Den Boogaart, 1995; Van Den Boogaart et al., 2012), com a zona da cabeça e da cauda a desenvolverem-se em primeiro lugar. Osse & van den Boogart (1995) propõem que a ordem de aparecimento das estruturas e órgãos será um reflexo das necessidades e prioridades das larvas em termos de alimentação, respiração e locomoção (para fuga e captura de alimento). Embora não existam ainda dados sobre a mobilidade das larvas destas espécies nestas fases iniciais do desenvolvimento, como já foi referido acima, Mameri et al. (2020) estudaram o desempenho natatório de indivíduos adultos de

três espécies de leuciscídeos, incluindo *I. lusitanicum*. Nesse estudo concluíram que o tamanho dos indivíduos tem influência na velocidade crítica de natação, o que sugere que indivíduos maiores estão em vantagem, quer na procura de alimento, quer na capacidade de resistirem a eventos de aumento de caudal dos rios, ou mesmo, na fuga a predadores. Seria interessante reproduzir esse estudo utilizando as larvas dessas espécies e comparar com os resultados dos adultos.

Este acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larvar de *I. lusitanicum* permitiu perceber que, no seu conjunto, são fases relativamente longas em que os indivíduos estão mais susceptíveis a factores externos ao seu desenvolvimento. Alguns destes factores são impossíveis de controlar, como os períodos de aumento de caudal devido a chuvas ou descargas de infraestruturas hídricas, onde existam, mas outros podem ser mitigados. Uma das recomendações que se podem fazer prende-se com a manutenção e/ou plantação de espécies vegetais no leito e margens dos rios, o que vai fornecer zonas de abrigo para indivíduos juvenis e também ajudar a reduzir a velocidade da corrente durante períodos de fluxo torrencial. Outra recomendação importante para a conservação destas espécies tem a ver com a criação de uma espécie de “período de defeso” durante a época de reprodução e crescimento larvar, durante o qual são proibidas acções de limpeza ou quaisquer intervenções lesivas dos habitats fluviais por parte das autarquias ou outras entidades.

As conclusões relativas ao desenvolvimento embrionário e larvar de *I. lusitanicum* são também relevantes para a identificação de ovos/larvas no campo e nos projectos de conservação *ex situ*. Embora de forma precaucionária, esta marcada relação entre a dimensão dos indivíduos e o surgimento de características, por oposição ao uso do número de dias depois da postura como um indicador, pode mesmo ser validada para outras espécies sujeitas a acções de conservação que impliquem reprodução em cativeiro.

Para trabalhos futuros sugere-se uma observação mais frequente da fase embrionária, talvez com duas observações diárias, para que se consiga documentar com mais pormenor as alterações que se verificam durante este período, sendo que algumas delas pareceram ocorrer com uma diferença de horas e não dias. Também seria aconselhável aumentar o número de indivíduos por observação para que se pudesse ter uma melhor noção da variabilidade intraespecífica e se pudessem ter valores médios de comprimentos, o que pode ser mais útil na identificação de cada fase. Seria igualmente útil uma descrição mais detalhada do padrão de pigmentação, especialmente em termos

comparativos, para que se consigam identificar, no campo, indivíduos de espécies diferentes em fases iniciais do desenvolvimento. Um outro factor a considerar em estudos futuros é a susceptibilidade dos indivíduos à manipulação e à aplicação de anestésico, uma vez que a partir dos 16 mm de comprimento, as larvas apresentaram uma resistência ao anestésico que tornou difícil a sua eficaz aplicação. Este factor pode aumentar a mortalidade nestes estudos, o que é de particular preocupação por se tratar de espécies com estatuto de conservação desfavorável.

No que respeita à abordagem molecular seguida no Capítulo IV, os resultados confirmaram os resultados preliminares obtidos em trabalhos anteriores (Robalo, Doadrio et al., 2007; Robalo et al., 2008), validando a singularidade da população de *I. lusitanicum* do Sado e justificando o seu reconhecimento como uma unidade evolutiva independente. Estas conclusões reforçam os resultados anteriormente obtidos por Robalo et al. (2008), a existência de uma clara distinção entre as populações do “Tejo e Oeste” (i.e. *I. tagensis*) e do “Sado” (i.e. *I. lusitanicum*) para os dois marcadores moleculares analisados. Apesar de terem sido detectados dois grupos de haplótipos representativos das duas entidades taxonómicas, para ambos os genes analisados, algumas situações excepcionais merecem menção e discussão. Uma delas é a detecção de dois haplótipos de *I. lusitanicum* na população Tejo-Sorraia (onde se esperava apenas a ocorrência de haplótipos de *I. tagensis*). Uma possível explicação para a ocorrência de haplótipos mitocondriais das duas espécies no Rio Sorraia é a proximidade geográfica entre este e algumas sub-bacias da margem direita do Rio Sado (Marateca e São Martinho), que poderá ter permitido contactos entre as zonas de cabeceira de linhas de água contíguas e a consequente passagem de peixes do Sado para o Tejo, não se podendo, no entanto, excluir a hipótese alternativa de introdução de peixes por mão humana.

A segunda situação excepcional prende-se com a detecção de um haplótipo do gene nuclear *bact* partilhado por todas as populações do Sado (*I. lusitanicum*) e por alguns indivíduos provenientes da Região Oeste (populações da Samarra, Colares e Lizandro), onde se esperava encontrar apenas haplótipos de *I. tagensis*. Uma vez que o gene *bact* evolui muito mais lentamente do que o gene mitocondrial analisado, esta partilha do mesmo haplótipo por peixes pertencentes às duas espécies poderá resultar da retenção de um polimorfismo ancestral, ou seja, da preservação de um sinal genético de um ancestral comum anterior à separação das duas espécies (que terá sido recente, a julgar pela reduzida percentagem de divergência obtida para o gene *cytb*).

Considerando todas as populações analisadas para o gene mitocondrial *cytb*, é importante destacar que as populações com índices de diversidade mais elevados são as do Tejo-Maior, Sado-Campilhas e Sado-Marateca. Pelo contrário, as populações representativas da Região Oeste (Lage, Barcarena, Colares, Jamor, Lizandro e Samarra) apresentam os valores mais reduzidos para todos os índices de diversidade genética.

Recentemente foi realizada a revisão taxonómica no âmbito do Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Migradores de Portugal Continental utilizando dados genómicos (Robalo et al., in press) e os resultados obtidos são úteis na interpretação dos dados fornecidos pela abordagem molecular mais tradicional utilizada nesta tese, já mencionada acima. Os dados genómicos permitem aumentar muito consideravelmente o nível de informação, uma vez que estas técnicas analisam centenas ou milhares de polimorfismos ao longo de todo o genoma (Li & Durbin, 2011; Sousa & Hey, 2013), por oposição à análise de apenas alguns genes mitocondriais e/ou nucleares dos estudos convencionais realizados antes do aparecimento das técnicas de *Next Generation Sequencing*. Os dados genómicos representam ainda um procedimento mais informativo no caso de estudos populacionais (Rosenberg & Nordborg, 2002), como o presente. Esta abordagem tem ainda outra vantagem que se prende com o número de indivíduos necessários para proceder a análises populacionais. Idealmente são necessários cerca de 5 indivíduos por população, mas é possível obter resultados fiáveis com apenas um ou dois indivíduos (Li & Durbin, 2011; Pluzhnikov & Donnelly, 1996). Em espécies com este nível de ameaça e, em alguns casos, com populações de reduzidas dimensões, é vantajoso utilizar técnicas que não dependam de uma amostragem extensa. No estudo genómico efectuado por (Robalo et al., in press), além da separação entre as duas entidades taxonómicas acima descritas, foi detectada uma introgressão de genes de *I. tagensis* no genoma de indivíduos de *I. lusitanicum* provenientes da sub-bacia da Marateca (bacia do Sado), situação similar à acima descrita para os haplótipos mitocondriais partilhados entre indivíduos do Sado e do Tejo-Sorraia e que corrobora a eventual existência, no passado, de um contacto entre as duas bacias ou, alternativamente, de uma introdução de peixes mediada por mão humana.

Finalmente, importa referir que as análises deste capítulo contribuem para uma melhor definição das unidades com significado evolutivo a estabelecer, bem como as unidades operacionais de conservação. Segundo Waples (1991), ESUs (*Evolutionary Significant Units*) podem ser definidas como populações isoladas reprodutivamente de

outras populações conspecíficas e representativas da história evolutiva da espécie. Assim, tendo em conta que estas populações apresentam diferenças genéticas significativas e a sua perda implicaria a perda de uma parte importante do património genético do género *Iberochondrostoma*, resultantes de um processo evolutivo único e irrepetível, considera-se que o mais adequado será a definição de três ESUs: Sado, Tejo e Oeste. De realçar que as populações do Tejo e Oeste pertencerão agora uma espécie diferente, *I. tagensis*, mas os índices de diversidade das populações da Região Oeste e o seu isolamento relativamente às populações do Tejo inferior, com as quais não é possível estabelecer fluxo genético há vários milhares de anos, justificam a necessidade de ser considerada uma ESU independente. Estes resultados vêm actualizar os apresentados por Robalo, Doadrio et al. (2007), que sugeriram o estabelecimento do mesmo número de unidades evolutivas, mas com uma amostragem inferior (i.e., incluindo menos populações). Doadrio et al. (1996) definiram o conceito de OCUs (*operational conservation units*) como áreas limitadas por barreiras físicas onde habitam populações que partilham características genéticas únicas. Aplicando este conceito às espécies constantes do presente trabalho, cada população deverá ser considerada uma unidade de conservação independente, sendo que permanece isolada das restantes populações existentes nas bacias contíguas, sem existir fluxo genético. São assim propostas três OCUs: Sado, Tejo e Oeste, à semelhança das ESUs propostas. Estas unidades de conservação devem ser preservadas e devem ser-lhes aplicadas medidas de protecção adequadas a cada unidade, bem como, deve ser feito o seu acompanhamento em acções de monitorização frequentes consistentes no tempo.

O Capítulo V desta tese inclui os dados relevantes para a descrição formal de *I. tagensis*, previamente integrada em *I. lusitanicum*. Sendo que esta nova espécie representa uma população de uma espécie pré-existente importa considerar a origem do holótipo de *I. lusitanicum*, depositado no Museu Bocage (M. B. c.1.1-C.1.12) (Collares-Pereira, 1980). Sendo este oriundo da bacia do Sado, a nova entidade taxonómica será atribuída às populações do Tejo e Região Oeste. Consequentemente, a nova espécie, designada *I. tagensis*, tem a sua área de distribuição restringida às ribeiras do Oeste e bacia do Tejo inferior e pode ser distinguida de *I. lusitanicum*, restrita à bacia do Sado (e às pequenas ribeiras costeiras de Melides e Junqueira), pela combinação das seguintes características: número de escamas da linha lateral, número de escamas acima da linha

lateral, número de raios ramificados da barbatana dorsal, número de raios ramificados da barbatana anal, comprimento pré-orbital e comprimento das barbatanas pélvicas.

Esta espécie está sujeita ao mesmo tipo de ameaças que *I. lusitanicum*: presença de espécies exóticas, degradação da galeria ripícola, poluição das linhas de água e extracção de água para rega de culturas agrícolas (Collares- Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2009). Como consequência, considera-se importante rever a categoria de ameaça atribuída a *I. lusitanicum* - *Em Perigo* - no Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Diádrocos de Portugal Continental (Magalhães et al., 2023), dada a significativa redução da área de distribuição decorrente da descrição de uma nova espécie para a anterior zona superior da mesma, e sugere-se a atribuição da categoria de ameaça, segundo os critérios IUCN, CR-*Criticamente em Perigo* (A2ce+3ce+4ce) para *I. tagensis*.

Esta tese representa um contributo para o estudo das espécies dulciaquícolas endémicas de Portugal Continental. Muito está ainda por fazer, nomeadamente na recuperação e gestão dos cursos de água e monitorização contínua das populações de peixes que os habitam. O Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Diádrocos de Portugal Continental (Magalhães et al., 2023) está a ser publicado praticamente em simultâneo com este trabalho e, de acordo com o mesmo, 60% das espécies nativas estão classificadas numa das três categorias de ameaça da IUCN (RE – *Regionalmente Extinto*, CR – *Criticamente em Perigo* ou EN – *Em Perigo*).

Apesar de se terem feito já bastantes progressos na relação entre a academia e a sociedade, nomeadamente na relação entre investigadores e autarquias, ainda é muito difícil a implementação de medidas de proteção da biodiversidade. Isto deve-se, muitas vezes, à impopularidade das acções necessárias a longo prazo, que podem, por exemplo, limitar alguns tipos de actividades económicas. É necessário que, com a informação produzida pela academia, se assuma uma posição clara na proteção da biodiversidade com a adopção de medidas de conservação que sejam adequadas às espécies que delas necessitam, mas que tenham em conta as populações humanas que com elas coabitam, pois só com o seu apoio se consegue mudar o *status quo* e manter a proteção a longo prazo.

Referências bibliográficas

- Alves, M. J., & Coelho, M. M. (1994). Genetic variation and population subdivision of the endangered Iberian cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*. *Journal of Fish Biology*, *44*, 627–636.
- APA. (2021). *Critérios para a Classificação das Massas de Água*.
- Araki, H., Cooper, B., & Blouin, M. S. (2007). Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science*, *318*(5847), 100–103. <https://doi.org/10.1126/science.1145621>
- Arthington, A. H. (1991). Ecological and genetic impacts of introduced and translocated freshwater fishes in Australia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *48*(S1), 33–43. <https://doi.org/10.1139/f91-302>
- Balon, E. K. (1975). Terminology of intervals in fish development. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *32*, 1663–1670.
- Banarescu, P. (1973). Origin and affinities of the freshwater fish fauna of Europe. *Ichthyologia*, *5*, 1–8.
- Bănărescu, P., & Coad, B. W. (1991). Cyprinids of Eurasia. In I. J. Winfield & J. S. Nelson (Eds.), *Cyprinid Fishes: Systematics, biology, and exploitation* (pp. 127–155). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3092-9_5
- Beja, P. R. (1996). An analysis of otter *Lutra lutra* predation on introduced American crayfish *Procambarus clarkii* in Iberian streams. *Journal of Applied Ecology*, *33*(5), 1156–1170. <http://www.jstor.org/stable/2404695>
- Bentsen, H. B., & Olesen, I. (2002). Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. *Aquaculture*, *204*, 349–359. www.elsevier.com/locate/aqua-online
- Bernardi, G. (2013). Speciation in fishes. *Molecular Ecology*, *22*(22), 5487–5502. <https://doi.org/10.1111/mec.12494>
- Berra, T. M. (2007). *Freshwater Fish Distribution*. The University of Chicago Press.
- Blanchet, S., Páez, D. J., Bernatchez, L., & Dodson, J. J. (2008). An integrated comparison of captive-bred and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*): Implications for supportive

- breeding programs. *Biological Conservation*, 141(8), 1989–1999.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.05.014>
- Bianco, P. G. (1990). Potential role of the paleohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 1(2), 167–184.
<https://www.researchgate.net/publication/235221092>
- Bonada, N., & Resh, V. H. (2013). Mediterranean-climate streams and rivers: Geographically separated but ecologically comparable freshwater systems. *Hydrobiologia*, 719(1), 1–29.
<https://doi.org/10.1007/s10750-013-1634-2>
- Brian, J. V., Beresford, N., Margiotta-Casaluci, L., & Sumpter, J. P. (2011). Preliminary data on the influence of rearing temperature on the growth and reproductive status of fathead minnows *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology*, 79(1), 80–88.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.02993.x>
- Carrapato, C., & Ribeiro, F. (2012). Larval development of the Iberian cyprinid *Anaecypris hispanica*. *Limnetica*, 31, 119–128. <https://doi.org/10.23818/limn.31.11>
- Carrola, J., Santos, N., Rocha, M. J., Fontainhas-Fernandes, A., Pardal, M. A., Monteiro, R. A. F., & Rocha, E. (2014). Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro, and Ave estuaries-Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), 6057–6068.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-2537-0>
- Carvalho, V. (2001). *Padrões de actividade e distribuição espacial, reprodução e desenvolvimento embrionário e larvar em Chondrostoma lusitanicum Collares-Pereira, 1980*. Instituto Superior de Psicologia Aplicada.
- Carvalho, V., Robalo, J. I., & Almada, V. C. (2003). A description of the reproductive behaviour of the endangered Iberian cyprinid *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980 in captivity. *Etología*, 10, 23–25.
- Chen, W. J., & Mayden, R. L. (2009). Molecular systematics of the Cyprinoidea (Teleostei: Cypriniformes), the world's largest clade of freshwater fishes: Further evidence from six nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(2), 544–549.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.006>

- Coelho, M. M., Alves, M. J., & Rodrigues, E. (1997). Patterns of genetic divergence in *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira, in intermittent Portuguese rivers. *Fisheries Management and Ecology*, 4, 223–232.
- Coelho, M. M., Mesquita, N., & Collares-Pereira, M. J. (2005). *Chondrostoma almaçai*, a new cyprinid species from the southwest of Portugal, Iberian Peninsula. In *Folia Zool* (Vol. 54, Issue 2).
- Colin, Y., Berthe, T., Molbert, N., Guigon, E., Vivant, A.-L., Alliot, F., Collin, S., Goutte, & A., & Petit, F. (2021). Urbanization constrains skin bacterial phylogenetic diversity in wild fish populations and correlates with the proliferation of Aeromonads. *Microbial Ecology*, 82, 523–536. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01650-2>/Published
- Collares- Pereira, M. J. (coord), Alves, M. J., Ribeiro, F., Domingos, I., Almeida, P. R., da Costa, L., Gante, H., Filipe, A. F., Aboim, M. A., Rodrigues, P. M., & Magalhães, M. F. (2021). *Guia dos peixes de água doce e migradores de Portugal continental*. Edições Afrontamento.
- Collares-Pereira, M. J. (1980). Les'Chondrostoma à bouche arquée de la Péninsule Ibérique (avec la description de *Ch. lusitanicum* nov. sp.) (Poissons, Cyprinidaé). In *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* (Vol. 291). Gauthier-Villars Imprimeur.
- Collares-Pereira, M. J. (1983a). Cytotaxonomic studies in Iberian cyprinids. I. Karyology of *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira, 1980. *Cytologia*, 48, 753–760.
- Collares-Pereira, M. J. (1983b). *Estudo sistemático e citogenético dos pequenos ciprinídeos ibéricos pertencentes aos géneros Chondrostoma Agassiz 1835, Rutilus Rafinesque, 1820 e Anaecypris Collares-Pereira, 1893*. Universidade de Lisboa.
- Collen, B., Whitton, F., Dyer, E. E., Baillie, J. E. M., Cumberlidge, N., Darwall, W. R. T., Pollock, C., Richman, N. I., Soulsby, A. M., & Böhm, M. (2014). Global patterns of freshwater species diversity, threat, and endemism. *Global Ecology and Biogeography*, 23(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/geb.12096>
- Comissão Europeia. (2000). DIRECTIVA 2000/60/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 1–72.

- Costello, M. J. (2015). Biodiversity: The known, unknown, and rates of extinction. *Current Biology*, 25(9), R368–R371. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.051>
- Costello, M. J. (2022). Climate change is not the biggest threat to freshwater biodiversity. In *Imperiled: The Encyclopedia of Conservation: Volume 1-3* (Vols. 1–3, pp. 623–632). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821139-7.00245-2>
- Cunha, P. P., Martins, A. A., Daveau, S., & Friend, P. F. (2005). Tectonic control of the Tejo river fluvial incision during the late Cenozoic, in Ródão - Central Portugal (Atlantic Iberian border). *Geomorphology*, 64(3–4), 271–298. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2004.07.004>
- Cunha, P. P., Martins, A. A., Gomes, A., Stokes, M., Cabral, J., Lopes, F. C., Pereira, D., de Vicente, G., Buylaert, J. P., Murray, A. S., & Antón, L. (2019). Mechanisms and age estimates of continental-scale endorheic to exorheic drainage transition: Douro River, Western Iberia. *Global and Planetary Change*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2019.102985>
- Decreto-Lei n.º 92/2019, 3428 (2019). <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/92/2019/07/10/p/dre/pt/html>
- De Vicente, G., Cloetingh, S., Van Wees, J. D., & Cunha, P. P. (2011). Tectonic classification of Cenozoic Iberian foreland basins. In *Tectonophysics* (Vol. 502, Issues 1–2, pp. 38–61). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.02.007>
- Dias, J. M. A., Rodrigues, A., & Magalhães, F. (1997). Evolução da linha de costa, em Portugal, desde o último máximo glaciário até à actualidade: síntese dos conhecimentos. *Estudos Do Quaternário*, 1, 53–66.
- Doadrio, I., & Carmona, J. A. (2004). Phylogenetic relationships and biogeography of the genus *Chondrostoma* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(3), 802–815. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.008>
- Doadrio, I., Perdices, A., & Machordom, A. (1996). Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 45, 259–271.
- Doadrio, I., Perea, S., Garzón-Heydt, P., & González, J. L. (2011). *Ictiofauna continental Española. Bases para su seguimiento*. DG Medio Natural y Política Florestal.

- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status, and conservation challenges. In *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 81, Issue 2, pp. 163–182). <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564–567.
- Faria, C., Gil, F., Santos, R. S., & Almada, V. C. (2010). A comparison between the ontogeny of two related blenniid species *Parablennius gattorugine* and *Parablennius ruber* (Pisces: Blenniidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *90*(6), 1263–1268. <https://doi.org/10.1017/S002531540999138X>
- Feio, M., & Ferreira, V. (2019). *Rios de Portugal. Comunidades, processos e alterações*. Coimbra University Press. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-1624-7>
- Ford, M. J. (2002). Selection in captivity during supportive breeding may reduce fitness in the wild. *Conservation Biology*, *16*(3), 815–825. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00257.x>
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2010). *Introduction to Conservation Genetics* (Second). Cambridge University Press.
- Fraser, G. S., Bestgen, K. R., Winkelman, D. L., & Thompson, K. G. (2019). Temperature—not flow—predicts native fish reproduction with implications for climate change. *Transactions of the American Fisheries Society*, *148*(3), 509–527. <https://doi.org/10.1002/tafs.10151>
- Fuiman, L. A. (1983). Growth gradients in fish larvae. *Journal of Fish Biology*, *23*, 117–123.
- Fuiman, L. A., Cowan, J. H., Smith, M. E., & O’Neal, J. P. (2005). Behavior and recruitment success in fish larvae: Variation with growth rate and the batch effect. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *62*(6), 1337–1349. <https://doi.org/10.1139/f05-053>
- Gao, M. H., Wu, Z. Q., Huang, L. L., Tan, X. C., Liu, H., & Rad, S. (2021). Otolith shape analysis and growth characteristics in larval and juvenile *Squalidus argentatus*. *Environmental Biology of Fishes*, *104*(8), 937–945. <https://doi.org/10.1007/s10641-021-01125-4>

- Gherardi, F. (2007). Understanding the impact of invasive crayfish. In *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats* (pp. 507–542). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6029-8_28
- 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(S1).
- Gil, F., Sousa-Santos, C., & Almada, V. (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(4), 661–664. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00408.x>
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental Biology* (R. Meyers, Ed.; 11th ed.). Sinauer Associates, Inc. <http://labs.devbio.com>
- Gillespie, R. G., & Roderick, G. K. (2002). ARTHROPODS ON ISLANDS: Colonization, Speciation, and Conservation. *Annual Review of Entomology*, 47, 595–632. www.annualreviews.org
- Håkansson, J. (2004). *Genetic aspects of ex situ conservation*.
- Hard, J., Jones, R., Delarm, M., & Waples, R. (1992). *Pacific salmon and artificial propagation under the Endangered Species Act. National Oceanic and Atmospheric Administration technical memorandum*.
- Hitzfelder, G. M., Holt, G. J., Fox, J. M., & Mckee, D. A. (2006). The effect of rearing density on growth and survival of Cobia, *Rachycentron canadum*, larvae in a closed Recirculating aquaculture system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2), 204–209.
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe A N, P., & Turnbull, D. J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68, 332–372. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.01046.x>
- Ilhéu, M., Bernardo, J. M., & Fernandes, S. (2007). Predation of invasive crayfish on aquatic vertebrates: the effect of *Procambarus clarkii* on fish assemblages in Mediterranean temporary streams. In *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats* (p. 734). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6029-8>

- INAG, I. P. (2008a). *Manual para a avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segundo a Directiva Quadro da Água-Protocolo de amostragem e análise para a fauna piscícola.*
- INAG, I. P. (2008b). *Tipologia de Rios em Portugal Continental no âmbito da implementação da Directiva Quadro da Água. I-Characterização abiótica.*
- IUCN. (2012). *IUCN RED LIST CATEGORIES AND CRITERIA: Version 3.1 Second edition.* (2nd ed.). IUCN. www.iucn.org/publications
- Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 304–310. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x>
- Kasso, M., & Balakrishnan, M. (2013). Ex situ conservation of biodiversity with particular emphasis to Ethiopia. *ISRN Biodiversity*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/985037>
- Katano, O. (1992). Cannibalism on eggs by dark chub, *Zacco temmincki* (Temminck & Schlegel) (Cyprinidae). *Journal of Fish Biology*, 41(4), 655–661. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02692.x>
- Katano, O., & Uchida, K. (2006). Effect of partial fin clipping as a marking technique on the growth of four freshwater fish. *Aquaculture Science*, 54(4), 577–578.
- Kelley, J. L., Magurran, A. E., & Macías García, C. (2006). Captive breeding promotes aggression in an endangered Mexican fish. *Biological Conservation*, 133(2), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.06.002>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253–310.
- Kraaijeveld-Smit, F. J. L., Griffiths, R. A., Moore, R. D., & Beebee, T. J. C. (2006). Captive breeding and the fitness of reintroduced species: A test of the responses to predators in a threatened amphibian. *Journal of Applied Ecology*, 43(2), 360–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01137.x>
- Lee, W. S., Monaghan, P., & Metcalfe, N. B. (2010). The trade-off between growth rate and locomotor performance varies with perceived time until breeding. *Journal of Experimental Biology*, 213(19), 3289–3298. <https://doi.org/10.1242/jeb.043083>

- Legendre, M., & Teugels, G. G. (1991). Développement et tolérance à la température des oeufs de *Heterobranchus longifilis*, et comparaison des développements larvaires de *H. longifilis* et de *Clarias gariepinus* (Teleostei, Clariidae). *Aquatic Living Resources*, 4, 227–240.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Li, H., & Durbin, R. (2011). Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature*, 475(7357), 493–496. <https://doi.org/10.1038/nature10231>
- Lima, A. R. B., Torres, R. A., Jacobina, U. P., Pinheiro, M. A. A., & Adam, M. L. (2019). Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.037>
- Lima, C. S., Sousa-Santos, C., & Robalo, J. I. (2022). The endangered *Achondrostoma occidentale* (Robalo, Almada, Sousa Santos, Moreira and Doadrio 2005) freshwater fish—a Portuguese endemism at the brink of extinction. In *Imperiled: The Encyclopedia of Conservation: Volume 1-3* (Vols. 1–3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821139-7.00086-6>
- Maceda-Veiga, A. (2013). Towards the conservation of freshwater fish: Iberian Rivers as an example of threats and management practices. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (Vol. 23, Issue 1, pp. 1–22). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11160-012-9275-5>
- Magalhães, M., Amaral, S., Sousa, M., Alexandre, C., Almeida, P., Alves, M., Cortes, R., Farrobo, A., Filipe, A., Franco, A., Jesus, J., Oliveira, J., Pereira, J., Pires, D., Reis, M., Ribeiro, F., Robalo, J., Sá, F., Santos, C., ... Domingos, I. (2023). *Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Diádromos de Portugal Continental* (FCiências.ID & I. ICNF, Eds.).
- Magalhães, M. F., Schlosser, I. J., & Collares-Pereira, M. J. (2003). The role of life history in the relationship between population dynamics and environmental variability in two Mediterranean stream fishes. *Journal of Fish Biology*, 63(2), 300–317. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00148.x>

- Magoulick, D. D., & Kobza, R. M. (2003). The role of refugia for fishes during drought: A review and synthesis. *Freshwater Biology*, 48(7), 1186–1198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01089.x>
- Maitland, P., & Morgan, N. (2002). *Conservation management of freshwater habitats—Lakes, rivers, and wetlands*. Kluwer Academic Publishers.
- Mallin, M. A., & Cahoon, L. B. (2020). The hidden impacts of phosphorus pollution to streams and rivers. *BioScience*, 70(4), 315–329. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa001>
- Mameri, D., Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., Gil, F., & Faria, A. M. (2020). Swimming performance in early life stages of three threatened Iberian Leuciscidae. *Acta Ethologica*, 23(1), 23–29. <https://doi.org/10.1007/s10211-019-00331-9>
- Maynard, D. J., Flagg, T. A., & Mahnken, C. V. W. (1994). *A Review of Seminatural Culture Strategies for Enhancing the Postrelease Survival of Anadromous Salmonids*. National Oceanic and Atmospheric Administration
- McPhee, M. E. (2004). Generations in captivity increase behavioral variance: Considerations for captive breeding and reintroduction programs. *Biological Conservation*, 115(1), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00095-8)
- Mesquita, N., Carvalho, G., Shaw, P., Crespo, E., & Coelho, M. M. (2001). River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitanicum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Heredity*, 86, 253–264.
- Miqueleiz, I., Escribano, N., & Miranda, R. (2022). Conservation of endemic iberian freshwater fishes. In *Imperiled: The Encyclopedia of Conservation* (pp. 532–540). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821139-7.00113-6>
- Miyamoto, K., Kawakami, K., Tamura, K., & Abe, G. (2022). Developmental independence of median fins from the larval fin fold revises their evolutionary origin. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11180-1>
- Moorhead, J. A., & Zeng, C. (2010). Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: A review. *Reviews in Fisheries Science*, 18(4), 315–343. <https://doi.org/10.1080/10641262.2010.516035>
- Müller, J., Houben, N., & Pauly, D. (2023). On being the wrong size, or the role of body mass in fish kills and hypoxia exposure. *Environmental Biology of Fishes*, 106(7), 1651–1667. <https://doi.org/10.1007/s10641-023-01442-w>

- Muñoz, J. A., Martínez, A., & Verges, J. (1986). Thrust sequences in the eastern Spanish Pyrenees. *Journal of Structural Geology*, 8(3), 399–405. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0191-8141\(86\)90058-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0191-8141(86)90058-1)
- Oliveira, J. M. (coord.), Santos, J. M., Teixeira, A., Ferreira, M. T., Pinheiro, P. J., Geraldés, A., & Bochechas, J. (2007). *Projecto AQUARIPORT: Programa Nacional de Monitorização de Recursos Piscícolas e de Avaliação da Qualidade Ecológica de Rios*. Direcção Geral dos Recursos Florestais. www.dgrf.min-agricultura.pt
- Ory, J., Bricheux, G., Togola, A., Bonnet, J. L., Donnadiou-Bernard, F., Nakusi, L., Forestier, C., & Traore, O. (2016). Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent. *Environmental Pollution*, 214, 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.033>
- Osse, J. W. M., & Van Den Boogaart, J. G. M. (1995). Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment. *ICES Marine Science Symposium*, 201, 21–34.
- O’Sullivan, R. J., Aykanat, T., Johnston, S. E., Rogan, G., Poole, R., Prodöhl, P. A., De Eyto, E., Primmer, C. R., McGinnity, P., & Reed, T. E. (2020). Captive-bred Atlantic salmon released into the wild have fewer offspring than wild-bred fish and decrease population productivity: Relative fitness in Atlantic salmon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1937). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1671>
- Pais, J., Cunha, P. P., Pereira, D., Legoinha, P., Dias, R., Moura, D., da Silveira, A. B., Kullberg, J. C., & González-Delgado, J. A. (2012). *The Paleogene and Neogene of Western Iberia (Portugal): A Cenozoic Record in the European Atlantic Domain* (pp. 1–138). https://doi.org/10.1007/978-3-642-22401-0_1
- Pankhurst, N. W., & King, H. R. (2010). Temperature and salmonid reproduction: Implications for aquaculture. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 76, Issue 1, pp. 69–85). <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02484.x>
- Pankhurst, N. W., & Munday, P. L. (2011). Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research*, 62(9), 1015–1026. <https://doi.org/10.1071/MF10269>
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible

anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, 238(12), 2975–3015.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.22113>

- Pepin, P., Robert, D., Bouchard, C., Dower, J. F., Falardeau, M., Fortier, L., Jenkins, G. P., Leclerc, V., Levesque, K., Llopiz, J. K., Meekan, M. G., Murphy, H. M., Ringuette, M., Sirois, P., & Sponaugle, S. (2014). Once upon a larva: Revisiting the relationship between feeding success and growth in fish larvae. In *ICES Journal of Marine Science* (Vol. 72, Issue 2, pp. 359–373). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu201>
- Perea, S., Böhme, M., Zupančič, P., Freyhof, J., Šanda, R., Özulu, M., Abdoli, A., & Doadrio, I. (2010). Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-265>
- Pereira, L., Agostinho, A., & Winemiller, K. (2017). Revisiting cannibalism in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 27, 499–513. <https://doi.org/10.1007/s11160-017-9469-y>
- Philippart, J. C. (1995). Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biological Conservation*, 72, 281–295.
- Pimentel, N., & Azevedo, T. (1990). Terraços fluviais e remobilização das rañas: o exemplo do Rio Sado (Baixo-Alentejo). *Cuaternario y Geomorfología*, 4, 119–129.
- Pluzhnikov, A., & Donnelly, P. (1996). Optimal sequencing strategies for surveying molecular genetic diversity. *Genetics*, 144(3), 1247–1262.
- Poulin, R. (1992). Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. In *Parasitology Today*, *vat* (Vol. 8, Issue 2).
- Priborsky, J., & Velisek, J. (2018). A review of three commonly used fish anesthetics. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 26(4), 417–442.
<https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1442812>
- Puigdefàbregas, C., Muñoz, J. A., & Vergés, J. (1992). Thrusting and foreland basin evolution in the Southern Pyrenees. In K. R. McClay (Ed.), *Thrust Tectonics* (pp. 247–254). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3066-0_22
- Puvaneswari, S., Marimuthu, K., Karuppasamy, R., & Haniffa, M. A. (2009). Early embryonic and larval development of Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. *EurAsian Journal of BioSciences*, 3, 84–96. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2009.3.0.12>

- Rakes, P. L., Shute, J. R., & Shute, P. W. (1999). Reproductive behavior, captive breeding, and restoration ecology of endangered fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 55, 31–42.
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Robalo, J. I. (2007). *Filogenia, filogeografia e comportamento dos pequenos ciprinídeos do género Chondrostoma Agassiz, 1832 (Actinopterygii: Cyprinidae)*. Universidade de Lisboa.
- Robalo, J. I., Almada, V. C., Levy, A., & Doadrio, I. (2007). Re-examination and phylogeny of the genus *Chondrostoma* based on mitochondrial and nuclear data and the definition of 5 new genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2), 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.003>
- Robalo, J. I., Doadrio, I., Valente, A., & Almada, V. C. (2007). Identification of ESUs in the critically endangered Portuguese minnow *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980, based on a phylogeographical analysis. *Conservation Genetics*, 8(5), 1225–1229. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9275-x>
- Robalo, J. I., Doadrio, I., Valente, A., & Almada, V. C. (2008). Insights on speciation patterns in the genus *Iberochondrostoma* (Cyprinidae): Evidence from mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(1), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.07.010>
- Robalo, J. I., Sousa-Santos, C., & Almada, V. C. (2009). Threatened fishes of the world: *Iberochondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira, 1980 (Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes*, 86(2), 295–296. <https://doi.org/10.1007/s10641-009-9510-7>
- Robalo, J., Sousa-Santos, C., Mendes, S., Perea, S., Lima, C.S., & Doadrio, I. (in press). Clarificação taxonómica do tipo de ocorrência de peixes de águas dulciaquícolas com marcadores moleculares. In M. Magalhães, S. Amaral, M. Sousa, C. Alexandre, P. Almeida, M. Alves, R. Cortes, A. Farrobo, A. Filipe, A. Franco, J. Jesus, J. Oliveira, J. Pereira, D. Pires, M. Reis, F. Ribeiro, J. Robalo, F. Sá, C. Santos, & I. Domingos (Eds.), *Livro Vermelho dos Peixes Dulciaquícolas e Diádrocos de Portugal Continental*.

- Rodrigues, E., & Collares-Pereira, M. J. (1996). NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae). In *Genetica* (Vol. 98). Kluwer Academic Publishers.
- Rogado, L., Alexandrino, P., Almeida, P. R., Alves, M. J., Bochechas, J., Cortes, R., Domingos, I., Filipe, A. F., Madeira, J., & Magalhães, M. F. (2005). Peixes. In M. J. Cabral, J. Almeida, P. R. Almeida, T. Dellinger, N. Ferrand-Almeida, M. E. Oliveira, J. M. Palmeirim, A. I. Queirós, L. Rogado, & M. Santos-Reis (Eds.), *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*.
- Rosenberg, N. A., & Nordborg, M. (2002). Genealogical trees, coalescent theory, and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 380–390. <https://doi.org/10.1038/nrg795>
- Ruzzante, D. E. (1994). Domestication effects on aggressive and schooling behavior in fish. *Aquaculture*, 120, 1–24.
- Rytwinski, T., Kelly, L. A., Donaldson, L. A., Taylor, J. J., Smith, A., Drake, D. A. R., Martel, A. L., Geist, J., Morris, T. J., George, A. L., Dextrase, A. J., Bennett, J. R., & Cooke, S. J. (2021). What evidence exists for evaluating the effectiveness of conservation-oriented captive breeding and release programs for imperilled freshwater fishes and mussels? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 78(9), 1332–1346. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2020-0331>
- Sahashi, G., & Morita, K. (2022). Wild genes boost the survival of captive-bred individuals in the wild. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 20(4), 217–221. <https://doi.org/10.1002/fee.2457>
- Salonen, A., & Peuhkuri, N. (2006). The effect of captive breeding on aggressive behaviour of European grayling, *Thymallus thymallus*, in different contexts. *Animal Behaviour*, 72(4), 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.12.012>
- Sanjur, O. I., Carmona, J. A., & Doadrio, I. (2003). Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(1), 20–30. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00088-5)
- Schiemer, F., Flore, L., & Keckeis, H. (2001). 0+ fish as indicators for the ecological status of large rivers. *Large Rivers*, 12(2–4), 115–116. <https://doi.org/10.1127/lr/12/2001/115>

- Schiemer, F., Keckeis, H., & Kamler, E. (2003). The early life history stages of riverine fish: ecophysiological and environmental bottlenecks. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (Vol. 133).
- Schiemer, F., Spindler, T., Wintersberger, H., Schneider, A., & Chovanec, A. (1991). Fish fry associations: Important indicators for the ecological status of large rivers. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 24(4), 2497–2500. <https://doi.org/10.1080/03680770.1989.11899997>
- Schönhuth, S., Luikart, G., & Doadrio, I. (2003). Effects of a founder event and supplementary introductions on genetic variation in a captive breeding population of the endangered Spanish killifish. *Journal of Fish Biology*, 63, 1538–1551. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00265.x>
- Schönhuth, S., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L., & Mayden, R. L. (2018). Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 781–799. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.026>
- Scott, W., & Crossman, E. (1973). *Freshwater fishes of Canada* (Stevenson, Ed.). Department of the Environment Fisheries Research Board of Canada.
- Solomon, K. R., Dalhoff, K., Volz, D., & Van Der Kraak, G. (2013). Effects of Herbicides on Fish. In *Fish Physiology* (Vol. 33, pp. 369–409). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00007-8>
- Sousa, V., & Hey, J. (2013). Understanding the origin of species with genome-scale data: modelling gene flow. *Nature Reviews Genetics*, 14(6), 404–414. <https://doi.org/10.1038/nrg3446>
- Sousa, V., Penha, F., Collares-Pereira, M. J., Chikhi, L., & Coelho, M. M. (2008). Genetic structure and signature of population decrease in the critically endangered freshwater cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*. *Conservation Genetics*, 9(4), 791–805. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9399-7>
- Sousa-Santos, C., Collares-Pereira, M. J., & Almada, V. (2007). Reading the history of a hybrid fish complex from its molecular record. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(3), 981–996. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.05.011>

- Sousa-Santos, C., Gante, H. F., Robalo, J., Proença Cunha, P., Martins, A., Arruda, M., Alves, M. J., & Almada, V. (2014). Evolutionary history and population genetics of a cyprinid fish (*Iberochondrostoma olisiponensis*) endangered by introgression from a more abundant relative. *Conservation Genetics*, *15*(3), 665–677. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0568-1>
- Sousa-Santos, C., Gil, F., & Almada, V. C. (2014). Ex situ reproduction of Portuguese endangered cyprinids in the context of their conservation. *Ichthyological Research*, *61*(2), 193–198. <https://doi.org/10.1007/s10228-013-0383-6>
- Sousa-Santos, C., Jesus, T. F., Fernandes, C., Robalo, J. I., & Coelho, M. M. (2019). Fish diversification at the pace of geomorphological changes: evolutionary history of western Iberian Leuciscinae (Teleostei: Leuciscidae) inferred from multilocus sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *133*, 263–285. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.020>
- Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., Collares-Pereira, M. J., & Almada, V. C. (2005). Heterozygous indels as useful tools in the reconstruction of DNA sequences and in the assessment of ploidy level and genomic constitution of hybrid organisms. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, *16*(6), 462–467. <https://doi.org/10.1080/10425170500356065>
- Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., Francisco, S. M., Carrapato, C., Cardoso, A. C., & Doadrio, I. (2014). Metapopulations in temporary streams - The role of drought-flood cycles in promoting high genetic diversity in a critically endangered freshwater fish and its consequences for the future. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *80*, 281–296. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.007>
- Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., Pereira, A. M., Branco, P., Santos, J. M., Ferreira, M. T., Sousa, M., & Doadrio, I. (2016). Broad-scale sampling of primary freshwater fish populations reveals the role of intrinsic traits, inter-basin connectivity, drainage area and latitude on shaping contemporary patterns of genetic diversity. *PeerJ*, *2016*(2). <https://doi.org/10.7717/peerj.1694>
- Souty-Grosset, C., Anastácio, P. M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C., & Tricarico, E. (2016). The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. In *Limnologica* (Vol. 58, pp. 78–93). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.03.003>

- Stange, K. M., Van Balen, R. T., Garcia-Castellanos, D., & Cloetingh, S. (2016). Numerical modelling of Quaternary terrace staircase formation in the Ebro foreland basin, southern Pyrenees, NE Iberia. *Basin Research*, 28(1), 124–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bre.12103>
- Thompson, J. M., Hirethota, P. S., & Eggold, B. T. (2005). A comparison of elastomer marks and fin clips as marking techniques for walleye. *North American Journal of Fisheries Management*, 25(1), 308–315. <https://doi.org/10.1577/m03-237.1>
- Tickner, D., Opperman, J. J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A. H., Bunn, S. E., Cooke, S. J., Dalton, J., Darwall, W., Edwards, G., Harrison, I., Hughes, K., Jones, T., Leclère, D., Lynch, A. J., Leonard, P., McClain, M. E., Muruven, D., Olden, J. D., ... Young, L. (2020). Bending the curve of global freshwater biodiversity loss: An emergency recovery plan. *BioScience*, 70(4), 330–342. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa002>
- van den Boogaart, J. G. M., Muller, M., & Osse, J. W. M. (2012). Structure and function of the median finfold in larval teleosts. *Journal of Experimental Biology*, 215(14), 2359–2368. <https://doi.org/10.1242/jeb.065615>
- Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 965–968. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>
- Voesenek, C. J., Muijres, F. T., & Van Leeuwen, J. L. (2018). Biomechanics of swimming in developing larval fish. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 221, Issue 1). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.149583>
- Wang, N., Teletchea, F., Kestemont, P., Milla, S., & Fontaine, P. (2010). Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 2, Issue 4, pp. 209–222). <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01037.x>
- Waples, R. S. (1991). *NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-194*.
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, 138, 161–165.
- Weiskopf, S. R., Rubenstein, M. A., Crozier, L. G., Gaichas, S., Griffis, R., Halofsky, J. E., Hyde, K. J. W., Morelli, T. L., Morissette, J. T., Muñoz, R. C., Pershing, A. J., Peterson, D. L., Poudel, R., Staudinger, M. D., Sutton-Grier, A. E., Thompson, L., Vose, J., Weltzin, J. F., & Whyte, K. P. (2020). Climate change effects on biodiversity, ecosystems,

- ecosystem services, and natural resource management in the United States. *Science of the Total Environment*, 733. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137782>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591–625. <http://hdl.handle.net/2066/16774>
- Whittaker, R. J., & Fernández-Palacios, J. M. (2007). *Island Biogeography. Ecology, evolution, and conservation*. (Second). Oxford University Press.
- Wolter, C., & Sukhodolov, A. (2008). Random displacement versus habitat choice of fish larvae in rivers. *River Research and Applications*, 24(5), 661–672. <https://doi.org/10.1002/rra.1146>
- Wood, C. M., & McDonald, D. G. (1997). *Global warming: implications for freshwater and marine fish*. Cambridge University Press.
- Woodworth, L. M., Montgomery, M. E., Briscoe, D. A., & Frankham, R. (2002). Rapid genetic deterioration in captive populations: Causes and conservation implications. In *Conservation Genetics* (Vol. 3).
- WWF. (2020). *Living Planet Report 2020: Bending the Curve of Biodiversity Loss* (R. Almond, M. Grooten, & T. Petersen, Eds.).
- Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global Nitrogen Cycle: Critical Enzymes, Organisms, and Processes for Nitrogen Budgets and Dynamics. *Chemical Reviews*, 120(12), 5308–5351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>
- Zohar, Y., & Mylonas, C. C. (2001). *Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes*. www.elsevier.nl/locateraqua-online