

**CONNECTIVIDADE GENÉTICA
EM AMBIENTES AQUÁTICOS –
IMPLICAÇÕES PARA A
CONSERVAÇÃO**

SOFIA ISABEL PARDAL

Orientadora de Dissertação:

DOUTORA CARLA SOUSA SANTOS

Professor de Seminário de Dissertação:

PROFESSOR DOUTOR EMANUEL GONÇALVES

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de

MESTRE EM BIOLOGIA MARINHA E CONSERVAÇÃO

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Carla Sousa Santos, apresentada no ISPA – Instituto Universitário para obtenção de grau de Mestre na especialidade de Biologia Marinha e Conservação

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Sofia Quaresma pela oportunidade e confiança depositada em mim, por toda a ajuda ao longo deste percurso e por me ter dado a conhecer locais únicos e maravilhosos no meio da natureza.

Agradeço também ao Professor Emanuel Gonçalves, por toda a orientação ao longo deste percurso.

A todos os meus amigos de longa data e também da faculdade por todo o apoio incondicional prestado, pelos momentos de lazer passados e por todas as partilhas importantes ao longo deste caminho. Sem eles este caminho teira sido muito mais complicado e sem dúvida menos divertido.

Quero ainda agradecer à Cristina Lima por me ter acompanhado e ajudado no trabalho laboratorial, dando-me a confiança e segurança necessária. Obrigada, também pelas conversas e histórias engraçadas que ajudaram a desanuviar e a passar o tempo nos tempos mortos.

Não poderia de deixar de agradecer à minha família por me apoiarem incondicionalmente e por me terem acompanhado ao longo destes 5 anos de faculdade, acompanhando-me em saídas de campo e relendo muitos dos meus trabalhos (Obrigada Moon Moon por isso). Obrigada por acreditarem em mim e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. You rock!

And for last but definitely not least o meu maior agradecimento vai para a minha orientadora, a Dra. Carla Sousa Santos, pois sem ela nada disto seria possível. Obrigada pela paciência, pelos conselhos, pela ajuda, pelas conversas, e pelas experiências profissionais que me proporcionou nos últimos anos e que me ajudam a crescer enquanto profissional, mas também enquanto pessoa.

Mais uma vez, obrigada a todos.

Resumo

A evolução dos peixes primários na Península Ibérica encontra-se correlacionada com a evolução paleogeomorfológica das bacias hidrográficas e o movimento orogénico de sistemas montanhosos, como o Maciço Calcário Estremenho (MCE). Esta elevação separa duas regiões biogeográficas para a ictiofauna nativa: vertente ocidental com pequenos rios costeiros e ligações antigas ao rio Mondego; e oriental, zonas de cabeceira de sub-bacias do Tejo. Por terem maior declive, menor caudal e carácter intermitente, as nascentes do MCE eram consideradas desprovidas de ictiofauna. Os objetivos deste estudo foram: (1) conhecer as espécies aquáticas (peixes e gastrópodes) presentes nas nascentes; (2) avaliar a conectividade genética entre zonas de cabeceira e a jusante para duas espécies-alvo nas vertentes opostas do MCE (*Achondrostoma oligolepis* e *Squalius pyrenaicus*); e (3) confirmação genética da identidade taxonómica de gastrópodes. Os resultados demonstraram que as nascentes têm vida aquática (8 espécies nativas de peixes e 4 espécies nativas de gastrópodes) e podem ser locais prioritários para a conservação da Biodiversidade. Como esperado, encontraram-se diferenças interpopulacionais entre as populações de peixes dos diferentes rios. Foram ainda detetadas diferenças intrapopulacionais, entre locais de amostragem de um mesmo rio, demonstrando que, em ecossistemas fluviais, a determinação da diversidade genética populacional pode ser afetada pelo esquema de amostragem. Além disso, ficou claro que as características destes ecossistemas podem afetar a conectividade genética das populações de peixes, sendo importante investir em estudos de genética de paisagem para avaliar a conectividade e a diversidade genética das espécies ameaçadas, relacionando-as com as características dos habitats fluviais onde ocorrem.

Palavras – chave: ictiofauna dulciaquícola, gastrópodes aquáticos, espécies ameaçadas, zonas de nascente, diversidade genética.

Abstract

The evolution of primary fish in the Iberian Peninsula is correlated with the paleogeomorphological evolution of hydrographic basins and the orogenic movement of mountain systems, such as the Maciço Calcário Estremenho (MCE). This elevation separates two biogeographic regions for the native ichthyofauna: western slope with small coastal rivers and old connections to the Mondego River; and eastern, headwaters of Tagus sub-basins. Due to their higher slope, lower flow and intermittent character, the springs of the MCE were considered devoid of ichthyofauna. The objectives of this study were: (1) to know the aquatic species (fish and gastropods) present in the springs; (2) to evaluate the genetic connectivity between headwater and downstream zones for two target species on opposite slopes of the MCE (*Achondrostoma oligolepis* and *Squalius pyrenaicus*); and (3) genetic confirmation of the taxonomic identity of gastropods. The results showed that the springs have aquatic life (8 native species of fish and 4 native species of gastropods) and may be priority sites for the conservation of Biodiversity. As expected, interpopulation differences were found between fish populations from different rivers. Intrapopulation differences were also detected, between sampling sites of the same river, demonstrating that, in fluvial ecosystems, the determination of population genetic diversity can be affected by the sampling scheme. In addition, it became clear that the characteristics of these ecosystems can affect the genetic connectivity of fish populations, making it important to invest in landscape genetic studies to assess the connectivity and genetic diversity of threatened species, relating them to the characteristics of river habitats where they occur.

Keywords: Freshwater ichthyofauna, gastropods, protection zones, spring threatened species, genetic diversity.

Índice

Introdução	10
Metodologia	13
Amostragem.....	13
Identificação morfológica dos gastrópodes.....	13
Extração de ADN, amplificação e sequenciação das amostras.....	14
Análise das sequências de ADN dos peixes.....	15
Resultados	17
Caracterização da ictiofauna	17
Análise de <i>Achondrostoma oligolepis</i>	18
Citocromo <i>b</i> – Rios em estudo	18
Citocromo <i>b</i> – Rios em estudo e bacias vizinhas	20
Beta-actina – Rios em estudo	24
Beta-actina – Rios em estudo e bacias vizinhas	26
Análise de <i>Squalius pyrenaicus</i>	30
Citocromo <i>b</i> – Rios em estudo	30
Citocromo <i>b</i> – Rios em estudo e bacias vizinhas	32
Beta-actina – Rios em estudo	36
Beta-actina – Rios em estudo e bacias vizinhas	38
Caracterização da fauna de gastrópodes	41
Discussão	43
i) <i>Composição específica</i>	44
ii) <i>Identidade taxonómica dos gastrópodes – confirmação genética</i>	45
iii) <i>Conetividade genética das espécies-alvo</i>	46
a) <i>Conetividade genética passada</i>	46
b) <i>Conetividade genética atual</i>	47
Conclusões finais	49
Anexos	51
Anexo I – Estado da Arte	51
Conetividade Hidrológica.....	51
Diversidade genética.....	53
Evolução das espécies	54
Genética da paisagem	56
Colonização da Península Ibérica por peixes estritamente dulciaquícolas.....	57
Maciço Calcário Estremenho e Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros.....	60
Anexo II – Suplementos	62
A. Materiais e métodos.....	62
B. Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância.....	67
Anexo III – Informação sobre as espécies	75
Espécies de estudo genético	75
Espécies encontradas nas nascentes	77
Gastrópodes	84
Bibliografia	89

Índice de tabelas

Tabela 1 - Espécies amostradas nas nascentes (X assinala a presença da espécie na nascente).	17
Tabela 2 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo <i>b</i> para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para <i>A. oligolepis</i>	18
Tabela 3 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo <i>b</i> para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>A. oligolepis</i>	21
Tabela 4 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para <i>A. oligolepis</i>	24
Tabela 5 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>A. oligolepis</i>	27
Tabela 6 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo <i>b</i> para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para <i>S. pyrenaicus</i>	30
Tabela 7 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo <i>b</i> para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>S. pyrenaicus</i>	33
Tabela 8 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para <i>S. pyrenaicus</i>	36
Tabela 9 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>S. pyrenaicus</i>	39
Tabela 10 - Espécies de gastrópodes identificadas nas nascentes (X assinala a presença da espécie na nascente).	41
Tabela 11 - Nº de haplótipos que seriam detetados se apenas se amostrasse um local no rio (apenas nascente) vs número de haplótipos detetados com vários locais amostrados	49
Tabela A1 - Coordenadas dos locais amostrados neste estudo (excluindo sequências da base de dados do MARE-ISPA).	64
Tabela A2 - Nº de sequências utilizadas (os números entre parêntesis representam o nº de sequências obtidas nas nascentes do MCE no âmbito deste trabalho).	65
Tabela A3 - Condições <i>PCR</i> e sequência de <i>primers</i> utilizados.	66
Tabela A4 - Accession numbers, espécie, localização e coordenadas das sequências utilizadas na análise dos gastrópodes.	66
Tabela B 1 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene citocromo <i>b</i> obtidas para a espécie-alvo <i>A. oligolepis</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	67
Tabela B2 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene citocromo <i>b</i> obtidas para a espécie alvo <i>A. oligolepis</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	68
Tabela B3 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie-alvo <i>A. oligolepis</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	69
Tabela B4 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie alvo <i>A. oligolepis</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	70
Tabela B5 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene citocromo <i>b</i> obtidas para a espécie-alvo <i>S. pyrenaicus</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	71
Tabela B6 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene citocromo <i>b</i> obtidas para a espécie-alvo <i>S. pyrenaicus</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	72
Tabela B7 - Valores de <i>Fst</i> e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie-alvo <i>S. pyrenaicus</i> (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).	73

Tabela B8 - Valores de F_{st} e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie-alvo *S. pyrenaicus* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes). 74

Índice de figuras

Figura 1 - Exemplo de fotografias para identificação morfológica dos gastrópodes.....	14
Figura 2 - Rede de haplótipos do gene citocromo <i>b</i> dos rios em estudo para <i>A. oligolepis</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	19
Figura 3 - Rede de haplótipos do gene citocromo <i>b</i> dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>A. oligolepis</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	23
Figura 4 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo para <i>A. oligolepis</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. As linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	25
Figura 5 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>A. oligolepis</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos não identificados representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	29
Figura 6 - Rede de haplótipos do gene citocromo <i>b</i> dos rios em estudo para <i>S. pyrenaicus</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. As linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	31
Figura 7 - Rede de haplótipos do gene citocromo <i>b</i> dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>S. pyrenaicus</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos não identificados representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	35
Figura 8 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo para <i>S. pyrenaicus</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. As linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	37
Figura 9 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo e bacias vizinhas para <i>S. pyrenaicus</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com tamanho proporcional ao número de indivíduos representados. As linhas que os unem possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	40
Figura 10 - Rede de haplótipos da espécie <i>T. baeticus</i> . [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com tamanho proporcional ao número de indivíduos representados. As linhas que os unem possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.].....	42
Figura A1 - Localização do MCE (delimitado pelo tracejado preto) (Carvalho et al., 2011).....	60
Figura A2 - Nascente do Alcoa.....	62
Figura A3 - Nascente do Lena.....	62
Figura A6 - Nascente do Alcobertas.....	62
Figura A4 - Nascente de Almonda.....	62
Figura A5 - Nascente do Alviela.....	62
Figura A7 - Nascente do Lis.....	62
Figura A8 - Recolha das amostras com recurso à pesca elétrica.....	63
Figura A9 - Corte da barbatana dorsal para genética.....	63
Figura A10 - Exemplar de <i>S. pyrenaicus</i> . Foto: C. Sousa-Santos.....	76
Figura A11 - Exemplar de <i>A. oligolepis</i> . Foto: C. Sousa-Santos.....	77
Figura A12 - Exemplar de <i>P. polylepis</i> . Foto: C. Sousa-Santos.....	78

Figura A13 - Exemplar de <i>I. lusitanicum</i> . Foto: C. Sousa-Santos	78
Figura A14 - Exemplar de <i>L. bocagei</i> . Foto: C. Sousa-Santos	79
Figura A15 - Exemplar de <i>A. anguilla</i> . Foto: C. Sousa-Santos.	80
Figura A16 - Exemplar de <i>G. aculeatus</i> . Foto: C. Sousa-Santos.....	81
Figura A17 - Exemplar de <i>C. paludica</i> . Foto: C. Sousa-Santos.....	82
Figura A18 - Exemplar de <i>C. paludica</i> . Foto: C. Sousa-Santos.....	83
Figura A19 - Diversos exemplares com características externas diferentes de <i>T. baeticus</i>	84
Figura A20 - Exemplar de <i>R. balthica</i>	85
Figura A21 - Exemplar de <i>Oestophora spp.</i>	86
Figura A22 - Exemplar de <i>P. acuta</i>	87
Figura A23 - Exemplar de <i>Xeroplexa spp.</i>	88

Introdução

As espécies de água doce encontram-se distribuídas em bacias isoladas por diferentes barreiras biogeográficas, incluindo o oceano (Burrige et al., 2008). Estas distribuições podem ser explicadas por dois processos: dispersão e vicariância, estando este último mais estudado e definido em espécies terrestres e marinhas (Burrige et al., 2006). A dispersão caracteriza-se pela movimentação livre das espécies entre habitats levando à colonização de novos locais (Burrige et al., 2008). Digamos que existe uma cheia e que duas bacias isoladas passam a estar temporariamente unidas. As espécies de cada bacia passam a poder deslocar-se de uma para a outra e assim colonizar a nova bacia. Por sua vez, a vicariância é considerada um processo fundamental biogeográfico que causa a interrupção da conectividade entre populações de uma espécie facilitando o processo de deriva genética e de especiação (Burrige et al., 2006). Por exemplo, o aparecimento de uma cadeia montanhosa pode ter influência na drenagem de uma bacia hidrográfica, podendo causar a inversão de um rio ou a sua captura por uma bacia hidrográfica distinta, com óbvias consequências para a evolução das espécies estritamente dulciaquícolas que aí ocorrem. A distribuição das espécies dulciaquícolas pode ser influenciada por características da bacia hidrográfica, como o declive, o caudal, a altitude ou a existência de cascatas, e também por perturbações antropogénicas (Caldera & Bolnick, 2008). A genética é uma ferramenta importante no estudo da distribuição de espécies dulciaquícolas e pode explicar padrões de evolução tanto a uma escala temporal de milhões de anos como a escalas pequenas de escassos milhares de anos (Craw et al., 2007).

A uma escala espacial mais fina, os estudos genéticos de organismos estritamente dulciaquícolas podem igualmente permitir detetar diferenças dentro das populações uma vez que a conectividade genética destas pode ser influenciada pela posição dos indivíduos ao longo do curso do rio (Hughes et al., 2009). Por exemplo, uma população fragmentada, com um núcleo populacional localizado junto à nascente de um rio, poderá apresentar diferenças genéticas relativamente a núcleos populacionais localizados a jusante com os quais não comunicam devido à existência de barreiras que impedem o livre fluxo genético entre eles. Neste contexto, populações de peixes estritamente dulciaquícolas que ocorram em massas de água separadas por barreiras geográficas intransponíveis (como um sistema montanhoso com bacias hidrográficas independentes em vertentes opostas) e que, numa mesma massa de água, apresentem núcleos populacionais dispersos e pouco conectivos, constituem bons modelos para o estudo da conectividade genética em ambientes de água doce, a diferentes escalas espaciais.

Área de estudo

Localizada na área central da bacia do mediterrâneo e entre as massas de terra euro-asiática e africana, a Península Ibérica sofreu alterações climáticas e geológicas importantes a partir do Cenozoico (Casal-López et al., 2018). A diversidade fisiográfica e a história geológica desta península influenciaram a evolução das espécies ibéricas de peixes de água doce, o que torna a Península Ibérica uma região ideal para estudos biogeográficos deste grupo taxonómico (Casal-López et al., 2018).

Por ser maioritariamente constituída por peixes primários, a ictiofauna dulciaquícola da Península Ibérica pode apenas dispersar-se entre rios e lagos se estes estiverem conectados, ainda que temporariamente (Almeida et al., 2019; Casal-López et al., 2018). A dispersão de peixes primários entre bacias hidrográficas não é possível, a não ser que exista uma alteração geomorfológica ou tectónica que permita que as espécies dispersem para bacias anteriormente isoladas (Sousa-Santos et al., 2019). Por esse motivo, a distribuição e a filogenia dos peixes ciprinídeos e leuciscídeos estão intimamente relacionadas com a formação e evolução paleogeomorfológica da rede hidrográfica Ibérica, como demonstram vários estudos realizados até à data (e.g. Aboim et al., 2013; Casal-López et al., 2018; Sousa-Santos et al., 2019; Zardoya & Doadrio, 1999).

A Península Ibérica conta com um número elevado de peixes ciprinídeos e leuciscídeos endémicos, representados por poucos géneros mas com um elevado número de espécies por género (Doadrio et al., 2011; Robalo, Sousa-Santos, Almada, et al., 2006). Este fenómeno pode ser explicado pela quantidade de barreiras persistentes, como as cadeias montanhosas, que reduziram a amplitude das colonizações e potenciaram o isolamento de populações e o surgimento de linhagens evolutivas distintas e a especiação (Aboim et al., 2013; Robalo et al., 2006). Para além desta relação íntima entre os peixes estritamente dulciaquícolas e a formação/evolução das bacias hidrográficas, é expectável que o mesmo ocorra para outras espécies estritamente dulçaquícolas, como os gastrópodes, cuja evolução poderá igualmente ter sido influenciada pelas alterações paleogeomorfológicas das bacias hidrográficas onde ocorrem.

O Maciço Calcário Estremenho (MCE), localizado no centro de Portugal Continental, é uma formação geológica que poderá ter tido influência na evolução da ictiofauna dulçaquícola. Este maciço abrange os distritos de Leiria e Santarém, englobando 10 concelhos: Alcanena, Alcobaça, Batalha, Leiria, Ourém, Porto de Mós, Rio Maior, Santarém, Tomar e

Torres Novas (J. Carvalho et al., 2011; Marques, 2010; Peyroteo et al., 2015; Ramos, 2008). O sistema aquífero deste maciço abrange três grandes bacias hidrográficas portuguesas (Tejo, Lis e Ribeiras do Oeste), ocupando cerca de 767,6 km² na região centro-oeste e estando delimitado a sul por Rio Maior, a nordeste por Fátima e a norte por Porto de Mós (J. Carvalho et al., 2011; S. L. dos Santos, 2019; Peyroteo et al., 2015). Existem seis nascentes no sistema aquífero deste maciço localizadas nos limites e em zonas de contacto com rochas menos permeáveis do Jurássico, Cretácico e Cenozoico: Lis, Lena e Alcoa (Chiqueda) na vertente oeste do MCE; e Almonda, Alviela e Alcobertas nas vertentes sul e este (J. Carvalho et al., 2011; S. L. dos Santos, 2019; Peyroteo et al., 2015). Estando a crista do MCE a separar estes dois conjuntos de nascentes (e respetivas bacias/sub-bacias hidrográficas), o mesmo poderá ter influenciado a evolução da fauna aquática em cada vertente, por isso, constitui um bom modelo para estudos filogeográficos de espécies estritamente dulciaquícolas. Para além disso, a uma escala mais fina, as barreiras intransponíveis que existem ao longo de cada curso de água, também poderão afetar a conectividade genética das populações, originando diferenças entre as zonas de nascente e de jusante.

O estudo de como a estrutura do habitat e da paisagem podem afetar a conectividade espacial e a dispersão das espécies, bem como a sua diversidade genética, poderá fornecer novos dados com importância para a conservação das espécies (Ruppert et al., 2017). No presente trabalho, pretendeu-se obter dados de base que poderão servir para estudos futuros mais detalhados no âmbito da genética da paisagem e sua correlação com a evolução de organismos estritamente dulciaquícolas. Assim, e sabendo que o MCE separa duas regiões distintas (pequenos rios costeiros, com ligações antigas ao rio Mondego, na vertente ocidental e zonas de cabeceira de várias sub-bacias do rio Tejo na vertente oriental) estabeleceu-se como prioridade conhecer os organismos aquáticos existentes nas nascentes do MCE e colocou-se a hipótese de o sistema montanhoso constituir uma barreira efetiva, isolando espécies aquáticas distintas em vertentes opostas. Mais detalhadamente, os objetivos deste estudo foram: (1) conhecer as espécies aquáticas, nomeadamente de peixes e gastrópodes, presentes nas nascentes; (2) avaliar conectividade genética entre as zonas de cabeceira e as zonas a jusante para duas espécies-alvo existentes em vertentes opostas do MCE (*Achondrostoma oligolepis* e *Squalius pyrenaicus*); e (3) confirmação da identidade taxonómica das espécies de gastrópodes com recurso a análises genéticas.

Metodologia

Amostragem

No total foram amostradas seis nascentes permanentes do Maciço Calcário Estremenho ao longo dos meses de Abril, Maio e Outubro de 2021 (Anexo II – Figuras A2 a A7 e Tabela A1). Os peixes foram capturados com recurso à técnica de amostragem por pesca elétrica, mantidos em baldes arejados e, após a identificação da espécie e da recolha de tecido para análise genética, foram imediatamente devolvidos ao rio (Anexo II – Figura A8). A amostragem para análise genética foi realizada apenas para *Achondrostoma oligolepis* (Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat, 2005) e *Squalius pyrenaicus* (Günther, 1868), escolhidas como espécies-alvo do estudo genético por serem as espécies que ocorrem num maior número de linhas de água pertencentes, respetivamente, à vertente oeste e este do Maciço Calcário Estremenho, possibilitando assim comparações de diversidade populacional. Para estas espécies foi retirado um pedaço da barbatana dorsal que foi preservado em etanol 96% até ao momento da extração de ADN (Anexo II – Figura A9).

Além dos peixes amostrados em 2021, também foram utilizadas amostras e sequências pertencentes ao banco de amostras do MARE-ISPA, não só para que o número de amostras fosse maior, mas também para que fosse possível comparar os rios em estudo com rios vizinhos (Anexo II – Tabela A2).

Por último, além da amostragem da ictiofauna foi igualmente amostrada a fauna gastrópode existente na área de estudo. Os gastrópodes presentes no local foram recolhidos manualmente do leito do rio e conservados em etanol 96% até à análise laboratorial.

Identificação morfológica dos gastrópodes

Dos 223 indivíduos capturados, foram selecionados 30 considerados morfológicamente diferentes para identificação pelo especialista Dr. David Holyoak. Para tal, os espécimes foram fotografados individualmente em 3 posições, juntamente com uma escala de 1 centímetro (Figura 1), e foi elaborada uma base de dados (em *Excel*) com a informação sobre o local de amostragem (coordenadas e rio) do indivíduo em análise. Com base na

identificação providenciada pelo especialista, os restantes exemplares foram classificados de acordo com a espécie a que mais se assemelhavam, tendo esta classificação sido igualmente validada pelo Dr. David.

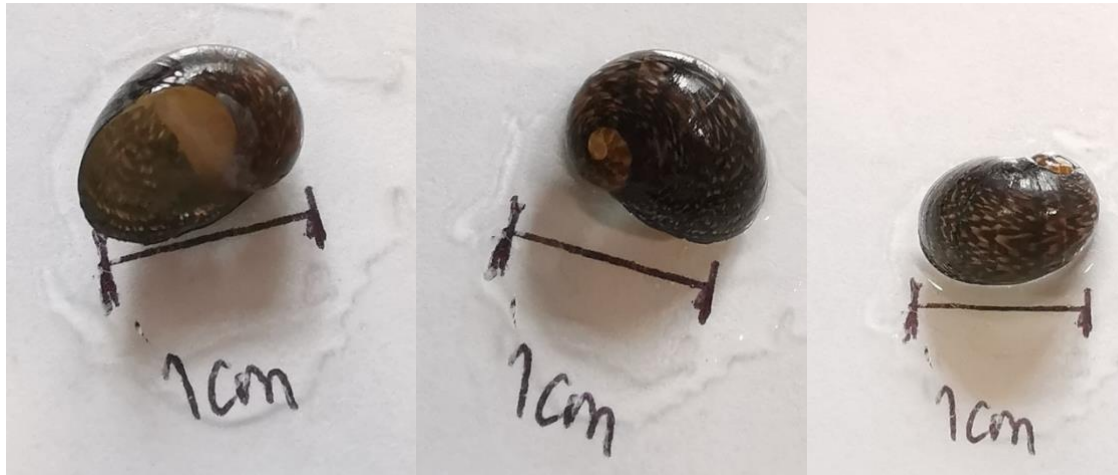


Figura 1 - Exemplo de fotografias para identificação morfológica dos gastrópodes.

Extração de ADN, amplificação e sequenciação das amostras

O ADN foi extraído com recurso ao kit *REDEExtract-N-Amp Tissue PCR* (Sigma-Aldrich®) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas a 55°C por 10 minutos e a 95°C por 3 minutos juntamente com 100 µl da solução *extraction* e 25 µl da solução *tissue preparation* tendo, no final, sido colocado um volume de 100 µl da solução *neutralization*. No caso dos peixes foi utilizado um pedaço da barbatana dorsal e dos gastrópodes um pedaço de tecido do corpo, tendo sido apenas analisados 3 indivíduos de cada espécie de gastrópode e de cada rio para a confirmação genética da espécie anteriormente identificada apenas pela morfologia.

Com recurso ao PCR (*Polymerase Chain Reaction*), o gene mitocondrial citocromo *b* e o gene nuclear beta-actina foram amplificados para os peixes e o gene COI para os gastrópodes. Para tal, foram misturados 4 µl das extrações de ADN com 4,4 µl de água ultrapura, 10 µl de *REDEExtract- N-Amp PCR Reaction Mix* (Sigma-Aldrich®) e 0,8 µl de cada *primer forward* e *reverse*. No citocromo *b* foram utilizados os *primers* LCB1 (Sousa-Santos et al., 2016) e HA (Schmidt & Gold, 1993), na beta-actina foram os BactFor (Robalo, Sousa-Santos, Levy, et al., 2006) e BactRev (Robalo, Sousa-Santos, Levy, et al., 2006) e no COI os LCO1490 e HCO2198 (Folmer et al., 1994). Após o PCR (Anexo II – Tabela A3) os resultados

foram verificados recorrendo à eletroforese dos produtos de amplificação, utilizando géis de agarose a 1.5% (100ml de TBE e 1,5g de agarose em pó ou 40ml de TBE e 0,6g de agarose).

Os produtos de amplificação por PCR dos peixes foram sequenciados na GATC (Konstanz, Alemanha) utilizando os *primers* LCB1 para citocromo *b* e BactFor para a beta-actina enquanto os produtos de amplificação dos gastrópodes foram sequenciadas na StabVida (Caparica, Portugal) utilizando o *primer* LCO1490.

Análise das sequências de ADN dos peixes

As sequências foram alinhadas e editadas no programa CodonCode Aligner v.10.0.1 Mac OS X (CodonCode Corp., USA) e cortadas nas pontas 3' e 5' para que pudessem ter o mesmo comprimento (720bp para o citocromo *b* e 907bp para a beta-actina). Posteriormente, as sequências foram colapsadas em haplótipos recorrendo à ferramenta *DNA-collapser* (FaBox v.1.61; que se encontra disponível online no seguinte site: <<https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/dnacollapser.php>>). As sequências heterozigóticas de beta-actina foram manualmente revistas e separadas utilizando o procedimento descrito em Sousa-Santos et al. (2005).

Para a construção das redes de haplótipos foi utilizado o programa PopART (*Population Analysis with Reticulate Trees*, v.1.1 Mac OS X), com recurso ao algoritmo TCS (Clement et al., 2002). Por fim, utilizou-se o software Inkscape v. 1.1.2 Mac OS X para edição gráfica das redes de haplótipos obtidas.

Para o cálculo de índices de diversidade molecular (diversidade genética, diversidade nucleotídica e número médio de diferenças entre pares de sequências) e para a realização de análises de variância molecular (AMOVA) foi utilizado o programa Arlequin v. 3.5.2.2 Windows (Excoffier & Lischer, 2010).

Análise das sequências de ADN dos gastrópodes

Após a sequenciação foi utilizada a ferramenta *Nucleotide BLAST* (disponível online em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>) para uma primeira verificação da identidade das espécies sequenciadas.

As sequências do gene COI foram posteriormente editadas com recurso ao software CodonCode Aligner v.10.0.1 Mac OS X (CodonCode Corp., USA) e contrastadas com outras sequências do mesmo grupo taxonómico disponíveis na base de dados pública GenBank (Anexo II – Tabela A4).

Para a espécie *Theodoxus baeticus* foi realizada uma rede de haplótipos com as amostras deste estudo e com as recolhidas do GenBank. Recorreu-se ao programa PopART (*Population Analysis with Reticulate Trees*, v.1.1 Mac OS X) e ao algoritmo TCS (Clement et al., 2002) para a construção da rede de haplótipos. Por fim, utilizou-se o software Inkscape v. 1.1.2 Mac OS X para edição gráfica da rede de haplótipos obtida.

Resultados

Caracterização da ictiofauna

As várias amostragens realizadas na área de estudo detetaram a presença de 9 espécies, sendo 8 nativas e 1 exótica (Tabela 1 e Anexo III – informação sobre as espécies).

Tabela 1 - Espécies amostradas nas nascentes (X assinala a presença da espécie na nascente).

Espécie	Origem	Estatuto de conservação (IUCN)	Alcobertas	Alviela	Almonda	Lena	Alcoa	Lis
Boga-de-boca-reta (<i>Pseudochondrostoma polylepis</i> , Steindachner, 1865)	Nativo	Pouco Preocupante		X	X			
Boga-portuguesa (<i>Iberochondrostoma lusitanicum</i> , Collares-Pereira 1980)	Nativo	Criticamente em Perigo		X				
Barbo-comum (<i>Luciobarbus bocagei</i> , Steindachner, 1865)	Nativo	Pouco Preocupante		X				
Enguia-europeia (<i>Anguilla anguilla</i> , Linnaeus, 1758)	Nativo	Em Perigo	X	X	X	X	X	X
Escalo-do-sul (<i>Squalius pyrenaicus</i> , Günther, 1868)	Nativo	Em Perigo	X	X				
Esgana-gata (<i>Gasterosteus aculeatus</i> , Linnaeus, 1758)	Nativo	Em Perigo			X			
Ruivaco (<i>Achondrostoma oligolepis</i> , Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat, 2005)	Nativo	Pouco Preocupante		X	X	X	X	X
Verdemã (<i>Cobitis paludica</i> , de Buen, 1930)	Nativo	Pouco Preocupante		X				X
Góbio (<i>Gobio lozanoi</i> , Linnaeus, 1758)	Exótico	(Não se aplica)		X				
Riqueza específica (espécies nativas)			2	7	4	2	2	3

Análise de *Achondrostoma oligolepis*

Citocromo *b* – Rios em estudo

No total foram analisadas 98 sequências de citocromo *b* (66 da bacia do Lis e 32 do Rio Alcoa) que foram colapsadas em nove haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 2. No que diz respeito ao número de haplótipos amostrados no rio Alcoa, este foi mais elevado (N=3) no ponto de amostragem “Valado dos Frades” e menos elevado (N=1) no ponto de amostragem “Alcobaça”. Por sua vez, no rio Lis, o ponto de amostragem “Leiria” registou o maior número de haplótipos (N=4) e o ponto de amostragem “Lena” o menor (N=1) (Tabela 2). Verifica-se também que os haplótipos exclusivos variam, globalmente, entre 0 e 100 %, sendo que os dois pontos de amostragem que apresentam maior percentagem de haplótipos exclusivos pertencem ao rio Alcoa (“nascente” e “Valado dos Frades”) e que o ponto de amostragem com a maior percentagem de haplótipos exclusivos no rio Lis é o “Leiria” (Tabela 2). Relativamente aos índices de diversidade genética, e não considerando os pontos de amostragem que apresentam apenas um haplótipo (“Alcobaça” e “Lena”, com diversidade nula), verifica-se que a diversidade é mais elevada nos pontos de amostragem “Leiria” e “Carreira”, localizados no rio Lis, e menos elevada nos pontos de amostragem “Alcoa nascente” e “Valdos dos Frades”, ambos no rio Alcoa (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo *b* para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para *A. oligolepis*.

Bacia	Ponde de amostragem	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Alcoa	Alcoa nascente		2	0	2	100%	0,2857 ± 0,1964	0,001190 ± 0,001085	0,857143 ± 0,681989
	Alcobaça		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,00000	0,00000 ± 0,00000
	Valado dos Frades		3	1	2	67%	0,3778 ± 0,1813	0,000556 ± 0,000633	0,400000 ± 0,402885
Lis	Lis Nascente		3	2	1	33%	0,5263 ± 0,0887	0,000780 ± 0,000743	0,561404 ± 0,478851
	Leiria		4	2	2	50%	0,7143 ± 0,0787	0,001297 ± 0,001063	0,934066 ± 0,682043
	Lena		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,00000	0,00000 ± 0,00000

Tabela 2.1 – Continuação da Tabela 2.

Bacia	Ponde de amostragem	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Lis	Sirol		2	2	0	0%	0,5000 ± 0,2652	0,000694 ± 0,000861	0,500000 ± 0,519115
	Bajouca		2	2	0	0%	0,4000 ± 0,2373	0,000556 ± 0,000706	0,400000 ± 0,435050
	Carreira		3	2	1	33%	0,8333 ± 0,2224	0,005093 ± 0,003870	3,666667 ± 2,333333

A rede de haplótipos demonstra que existe uma clara separação entre os haplótipos presentes em cada um dos rios em estudo (Alcoa e Lis), havendo apenas um haplótipo (CYTB 1) partilhado entre as duas bacias (Figura 2). Seis dos nove haplótipos amostrados são exclusivos em apenas um ponto de amostragem: “Lis nascente” (CYTB 3), “Leiria” (CYTB 4 e CYTB 5), “Carreira” (CYTB 6) no caso do rio Lis e em “Valado dos Frades” (CYTB 8 e CYTB 9) no rio Alcoa (Figura 2). Os restantes três haplótipos são partilhados por três a sete pontos de amostragem.

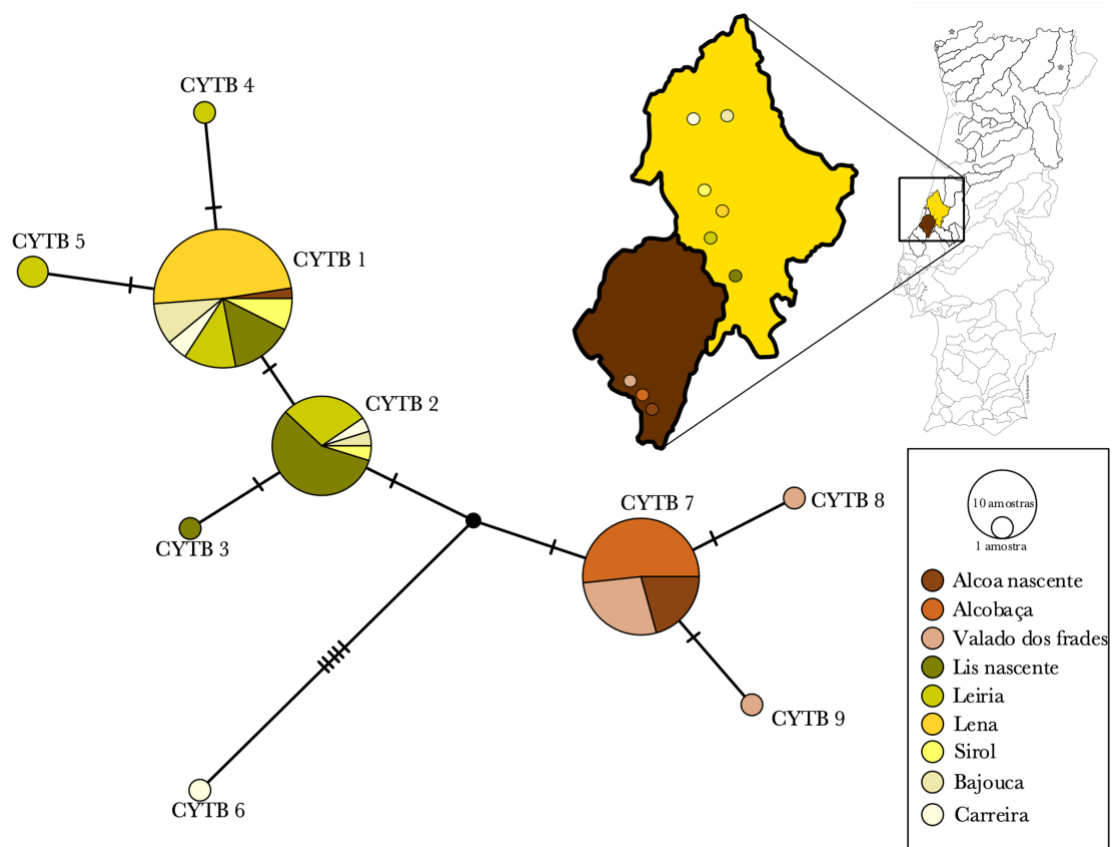


Figura 2 - Rede de haplótipos do gene citocromo *b* dos rios em estudo para *A. oligolepis*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos representam haplótipos intermediários não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Para testar a existência de diferenças significativas entre a diversidade genética das duas bacias hidrográficas em estudo constituíram-se dois grupos para a análise de variância molecular (AMOVA): um grupo com os três pontos de amostragem do Alcoa e outro com os seis pontos de amostragem do Lis. Os resultados da AMOVA hierárquica assim estabelecida detetaram uma maior percentagem de variação entre os grupos (78,85%) e demonstraram que existem diferenças significativas entre a diversidade genética observada no Alcoa e no Lis ($F_{ST} = 0,82142$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Mais especificamente, as comparações entre todos os pares de pontos de amostragem (Anexo II B – Tabela B1) demonstraram que: 1) existem diferenças significativas entre todos os pontos de amostragem do Alcoa relativamente a todos os pontos de amostragem do Lis ($p < 0,05$); 2) os pontos de amostragem do Alcoa não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); 3) na bacia do Lis só existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pares de pontos de amostragem “Carreira” – “Lena”; “Leiria” – “Lena” e “Lena” – “Lis Nascente”.

Citocromo *b* – Rios em estudo e bacias vizinhas

No total foram analisadas 324 sequências de citocromo *b* (66 da bacia do Lis, 32 do Alcoa, 105 da bacia do Tejo e 121 da bacia do Mondego) que foram colapsadas em 35 haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 3. No que diz respeito ao número de haplótipos, os rios em estudo, Alcoa e Lis, apresentaram quatro e seis haplótipos, respetivamente, sendo que o rio Lis apresentou uma maior percentagem de haplótipos exclusivos (50%) do que o rio Alcoa (25%). Além disso, o rio Lis apresentou igualmente valores mais elevados para os três índices de diversidade genética (Tabela 3).

Relativamente às bacias vizinhas à área em estudo, verifica-se que na bacia do Mondego, a sub-bacia do rio Arunca foi a que apresentou um maior número de haplótipos ($N=7$), enquanto a do rio Dão foi a que apresentou menos haplótipos ($N=2$). Contudo, a maior percentagem de haplótipos exclusivos foi registada na sub-bacia do rio Corvo (67%) e a menor na do rio Alva (0%). Em termos de diversidade genética, esta é mais elevada na sub-bacia do rio Ceira e menos elevada na sub-bacia do rio Dão (Tabela 3).

Em relação à bacia do Tejo, o maior número de haplótipos foi registado no rio Nabão ($N=9$) e o menor nas sub-bacias dos rios Almonda e Alviela ($N=1$), sendo os valores dos índices

de diversidade genética bastante superiores no rio Nabão dada a diversidade nula registada nas restantes duas sub-bacias. Foi também este rio que apresentou a maior percentagem de haplótipos exclusivos (56%).

Finalmente, relativamente às pequenas bacias costeiras da Região Oeste (Real, São Pedro e Tornada) que confinam com as bacias hidrográficas do Alcoa e Lis, a sub-bacia do Real apresenta o maior número de haplótipos (N=7), o maior índice de diversidade nucleotídica e o maior nº médio de diferenças emparelhadas enquanto a sub-bacia de São Pedro apresenta os menores valores para estes índices e também o menor número de haplótipos (N=2). A maior diversidade genética verificou-se na sub-bacia do Tornada sendo este também o rio com a maior percentagem de haplótipos exclusivos (75%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo *b* para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para *A. oligolepis*.

Bacia	Sub-bacia	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Alcoa	Alcoa		4	3	1	25%	0,1815 ± 0,0903	0,000434 ± 0,000509	0,312500 ± 0,329166
Lis	Lis		6	3	3	50%	0,5380 ± 0,0462	0,001060 ± 0,000874	0,763170 ± 0,567387
Mondego	Dão		2	1	1	50%	0,2807 ± 0,1163	0,000390 ± 0,000488	0,280702 ± 0,314560
	Alva		4	4	0	0%	0,7211 ± 0,0584	0,001623 ± 0,001217	1,168421 ± 0,784755
	Arunca		7	5	2	29%	0,7381 ± 0,0672	0,002480 ± 0,001645	1,785714 ± 1,063978
	Ceira		6	5	1	17%	0,8088 ± 0,0547	0,002471 ± 0,001682	1,779412 ± 1,082126
	Corvo		3	1	2	67%	0,06397 ± 0,0799	0,001164 ± 0,000974	0,838235 ± 0,626583
	Mortágua		3	2	1	33%	0,4158 ± 0,1157	0,001075 ± 0,000914	0,773684 ± 0,589255
Tejo	Almonda		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,000000 ± 0,000000	0,000000 ± 0,000000
	Alviela		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,000000 ± 0,000000	0,000000 ± 0,000000
	Nabão		9	4	5	56%	0,7681 ± 0,0518	0,003433 ± 0,002118	2,471774 ± 1,371275
Oeste	Real		7	2	5	71%	0,5211 ± 0,1346	0,001345 ± 0,001066	0,968421 ± 0,687035
	São Pedro		2	2	0	0%	0,4583 ± 0,0954	0,000637 ± 0,000661	0,458333 ± 0,425019
	Tornada		4	1	3	75%	0,5333 ± 0,1801	0,000833 ± 0,000816	0,600000 ± 0,519281

A rede de haplótipos gerada com todos os haplótipos de citocromo *b* amostrados na área em estudo e nas bacias confinantes (Figura 3) mostra que existem dois haplótipos mais frequentes (CYTB 21 e CYTB 3) dos quais derivam 30 haplótipos por um a três passos mutacionais, formando duas sub-redes em formato de estrela. Estas sub-redes incluem, respetivamente, haplótipos presentes na área em estudo, bacias costeiras do Oeste e nas três sub-bacias do Tejo (sub-rede à esquerda na Figura 3); e haplótipos presentes em todas as sub-bacias do Mondego e em duas sub-bacias do Tejo (Almonda e Nabão) (Figura 3).

Nesta análise global, que tem em conta as bacias confinantes, verifica-se que ambos os rios em estudo apresentam haplótipos exclusivos: no caso do Lis, os haplótipos CYTB 23, CYTB 24 e CYTB 25 e, no caso do Alcoa, apenas o haplótipo CYTB 31 (Figura 3). Relativamente aos restantes haplótipos das duas bacias em estudo (N= 6), estes são partilhados tanto com as bacias hidrográficas do Mondego e Tejo, como com as pequenas bacias costeiras da região Oeste, sobretudo no caso do rio Lis. De facto, os haplótipos não exclusivos presentes no rio Lis são partilhados com: 1) sub-bacias do Mondego e rio Nabão (CYTB 3); 2) rios Nabão e São Pedro (CYTB 22); e 3) rios Alcoa, Nabão, Almonda, São Pedro e Arunca (CYTB 21) (Figura 3). Por outro lado, os três haplótipos não exclusivos detetados no rio Alcoa são partilhados com: 1) o rio Lis (CYTB 21); 2) o rio Real (CYTB 30); e 3) os rios Tornada, Alviela e Real (CYTB 28) (Figura 3). Portanto, em resumo e em comparação com o que se verifica no rio Lis, os haplótipos presentes no rio Alcoa (números totais, partilhados e exclusivos) são em menor número e as afinidades com as bacias confinantes são menos amplas e restritas a duas bacias costeiras da Região Oeste (Tornada e Real) e a uma sub-bacia do rio Tejo (Alviela) que é precisamente aquela cuja cabeceira fica apenas a escassos quilómetros da nascente do Alcoa (Figura 3).

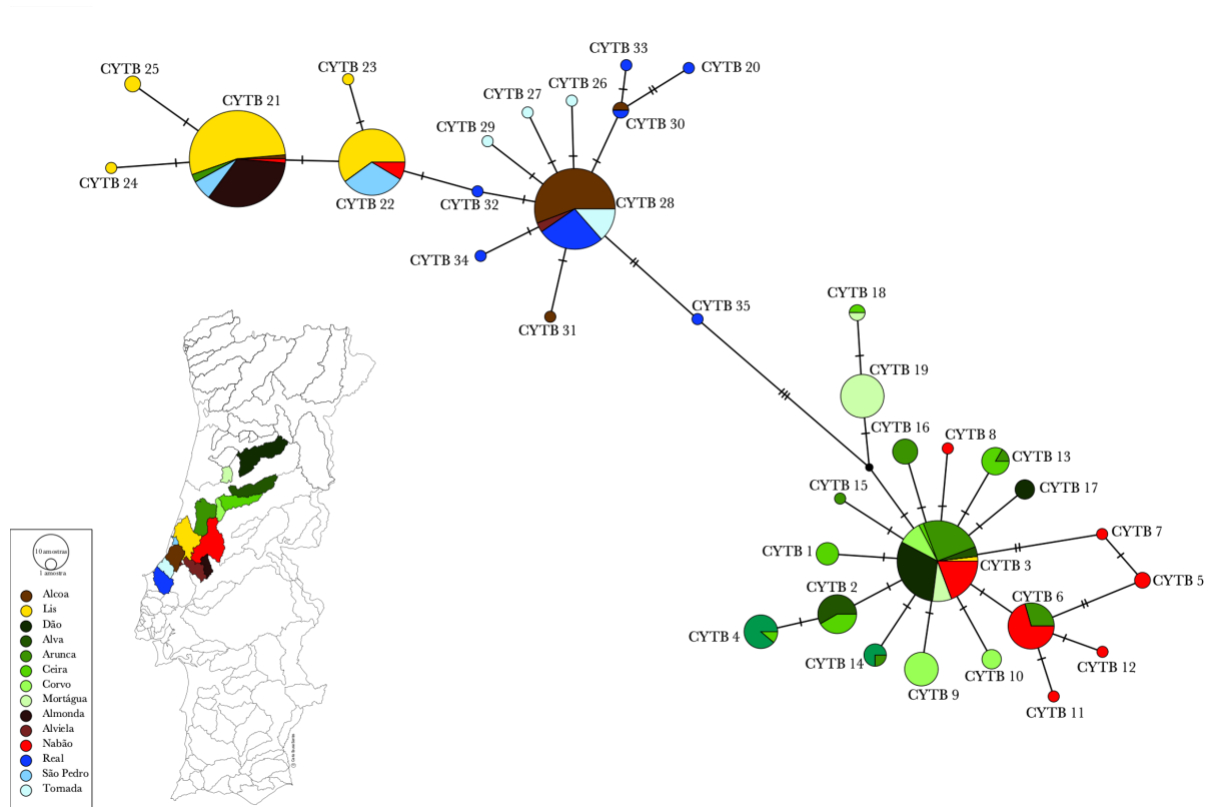


Figura 3 - Rede de haplótipos do gene citocromo *b* dos rios em estudo e bacias vizinhas para *A. oligolepis*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) dos cinco grupos constituídos (Alcoa, Lis, sub-bacias do Tejo, sub-bacias do Mondego e as três bacias do Oeste) mostraram que existe uma maior variação entre os grupos (45,38%) e que existem diferenças significativas entre os locais amostrados ($F_{ST} = 0,81117$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Mais especificamente as comparações entre os pares de populações (Anexo II B – Tabela B2) demonstram que: 1) existem diferenças significativas entre os dois rios em estudo, Alcoa e Lis ($p < 0,05$); 2) o rio Alcoa difere significativamente de todos os rios da bacia do Mondego ($p < 0,05$); 3) o rio Alcoa difere significativamente dos rios Nabão e Almonda na bacia do Tejo ($p < 0,05$); 4) das bacias do Oeste, o rio Alcoa difere significativamente apenas do rio São Pedro ($p < 0,05$) e 5) o rio Lis difere significativamente de todos os rios da bacia do Mondego, do Tejo e das bacias do Oeste ($p < 0,05$).

Beta-actina – Rios em estudo

No total foram analisadas 168 sequências de beta-actina (104 da bacia do Lis e 64 do Alcoa) que foram colapsadas em 13 haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 4. No rio Alcoa, os pontos de amostragem “Alcoa nascente” e “Valado dos Frades” apresentaram o maior número de haplótipos (N=4), sendo que “Valado dos Frades” apresenta a maior percentagem de haplótipos exclusivos (50%) e “Alcoa nascente” a menor (0%). Em relação à diversidade genética, são os pontos de amostragem “Valado dos Frades” e “Alcobaça” que demonstram ter uma maior e menor diversidade, respetivamente (Tabela 4). Em relação ao rio Lis, os pontos de amostragem “Lena” e “Carreira” apresentam o maior número de haplótipos (N=4) e o ponto de amostragem “Sirol” o menor (N=1). Em termos de exclusividade, apenas o ponto de amostragem “Carreira” tem haplótipos exclusivos (25%). Por fim, a diversidade genética é mais elevada no ponto de amostragem “Carreira” e é nula em “Sirol” (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para *A. oligolepis*.

Bacia	Ponde de amostragem	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Alcoa	Alcoa nascente		4	4	0	0%	0,5906 ± 0,0810	0,002792 ± 0,001734	2,532609 ± 1,411124
	Alcobaça		3	2	1	33%	0,5476 ± 0,0448	0,001216 ± 0,000914	1,103175 ± 0,744200
	Valado dos Frades		4	2	2	50%	0,7121 ± 0,1053	0,003692 ± 0,002292	3,348485 ± 1,846108
Lis	Lis Nascente		7	5	2	29%	0,7793 ± 0,0410	0,004136 ± 0,002364	3,751452 ± 1,930511
	Leiria		2	2	0	0%	0,2500 ± 0,1802	0,000827 ± 0,000771	0,750000 ± 0,613775
	Lena		4	4	0	0%	0,5808 ± 0,0407	0,005359 ± 0,002965	4,860256 ± 2,420795
	Sirol		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,000000 ± 0,000000	0,000000 ± 0,000000
	Bajouca		3	3	0	0%	0,8000 ± 0,1217	0,002940 ± 0,002096	2,666667 ± 1,646545
	Carreira		4	3	1	25%	1,0000 ± 0,1768	0,009188 ± 0,006448	8,333333 ± 4,897948

Considerando apenas os rios em estudo, Alcoa e Lis, detetou-se a presença de seis haplótipos exclusivos, três em cada rio (Figura 4). No rio Alcoa, foi amostrado o haplótipo BACT 3 em “Alcobaça”, um ponto de amostragem intermédio entre a nascente a foz, e os haplótipos BACT 4 e BACT 7 em “Valado dos Frades”, o ponto de amostragem mais próximo da foz do rio Alcoa (Figura 4). No caso do rio Lis, os haplótipos exclusivos foram detetados na nascente do rio (BACT 10 e BACT 11) e em “Carreira” (BACT 13), o ponto de amostragem mais perto da foz (Figura 4). No que diz respeito a haplótipos partilhados, os dois rios partilham três haplótipos (BACT 1, BACT 5 e BACT 6); os diferentes pontos de amostragem do Lis partilham outros três haplótipos (BACT 8, BACT 9 e BACT 12); e os pontos de amostragem do rio Alcoa partilham o haplótipo BACT 2 (Figura 4).

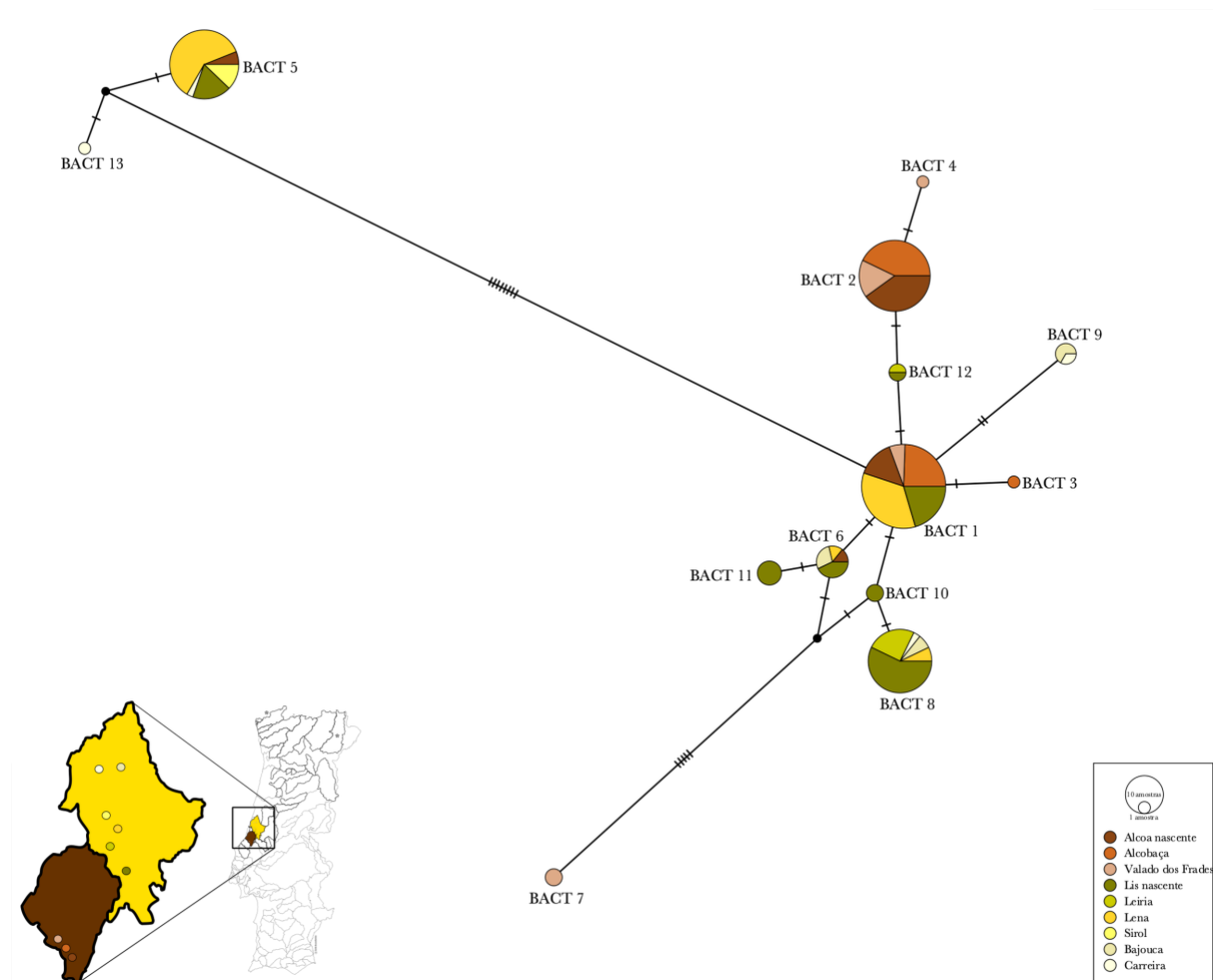


Figura 4 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo para *A. oligolepis*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. As linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Para testar a existência de diferenças significativas entre a diversidade genética das duas bacias hidrográficas em estudo constituíram-se dois grupos para a análise de variância molecular (AMOVA): um grupo com os três pontos de amostragem do Alcoa e outro com os seis pontos de amostragem do Lis. Os resultados da AMOVA hierárquica assim estabelecida detetaram uma maior percentagem de variação dentro das populações (60,4%) e demonstraram que existem diferenças significativas entre a diversidade observada no Alcoa e no Lis ($F_{ST} = 0,39603$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$) (Anexo II B – Tabela B3). Mais especificamente, as comparações entre todos os pares de pontos de amostragem (Anexo II B – Tabela B3) demonstraram que: 1) existem diferenças significativas entre todos os pontos de amostragem do Alcoa relativamente a todos os pontos de amostragem do Lis ($p < 0,05$); 2) os pontos de amostragem do Alcoa não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); 3) na bacia do Lis apenas não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os pares de pontos de amostragem “Lis nascente” – “Bajouca”; “Leiria” – “Bajouca”; “Lena” – “Sirol”; “Lena”- “Carreira”; “Sirol” – “Carreira” e “Bajouca” – “Carreira” (Anexo II B – Tabela B3).

Beta-actina – Rios em estudo e bacias vizinhas

No total foram analisadas 360 sequências de beta-actina (104 da bacia do Lis, 64 do Alcoa, 86 da bacia do Tejo, 56 da bacia do Mondego e 50 das bacias do Oeste) que foram colapsadas em 18 haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 5. No que diz respeito aos rios em estudo, Alcoa e Lis, estes apresentam um total de sete e nove haplótipos, respetivamente, sendo o rio Alcoa o que apresenta uma maior percentagem de haplótipos exclusivos (43%). Contudo, as amostras do rio Lis demonstram ter uma maior diversidade genética em comparação com as do Alcoa (Tabela 5).

Relativamente às bacias contíguas à área em estudo, verifica-se que na bacia do Mondego, apenas a sub-bacia do rio Arunca apresenta mais do que um haplótipo, sendo a diversidade genética nula nas restantes duas sub-bacias (Tabela 5).

Em relação à bacia do rio Tejo, a sub-bacia do rio Nabão apresenta maior número de haplótipos, maior percentagem de haplótipos exclusivos e maior diversidade genética (Tabela 5). Por outro lado, a sub-bacia do rio Alviela é a que apresenta menor número de haplótipos, menor percentagem de haplótipos exclusivos e menor diversidade genética (Tabela 5).

Por último, nenhuma bacia do Oeste apresenta haplótipos exclusivos, sendo que o Real teve o menor número de haplótipos (N=2) e o Tornada e São Pedro o maior número (N=3). A bacia do Tornada apresenta a maior diversidade genética e a menor diversidade nucleotídica enquanto o Real apresenta a menor diversidade genética e o São Pedro a maior diversidade nucleotídica (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para *A. oligolepis*.

Bacia	Sub-bacia	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Alcoa	Alcoa		7	4	3	43%	0,5893 ± 0,0429	0,002287 ± 0,001438	2,073090 ± 1,175935
Lis	Lis		9	8	1	11%	0,7722 ± 0,0189	0,005619 ± 0,003043	5,096341 ± 2,491984
Mondego	Arunca		5	5	0	0%	0,5941 ± 0,0751	0,004695 ± 0,002634	4,257928 ± 2,151669
	Ceira		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,00000	0,00000 ± 0,00000
	Corvo		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,00000	0,00000 ± 0,00000
Tejo	Almonda		6	4	2	33%	0,6885 ± 0,0504	0,006292 ± 0,003425	5,706970 ± 2,795567
	Alviela		2	2	0	0%	0,6667 ± 0,2041	0,001470 ± 0,001349	1,333333 ± 1,024941
	Nabão		7	4	3	43%	0,8002 ± 0,0330	0,004609 ± 0,002593	4,180761 ± 2,117741
Oeste	Real		2	2	0	0%	0,2333 ± 0,1256	0,000257 ± 0,000352	0,233333 ± 0,285145
	São Pedro		3	3	0	0%	0,4842 ± 0,1129	0,002855 ± 0,001782	2,589474 ± 1,447267
	Tornada		3	3	0	0%	0,6044 ± 0,0759	0,001345 ± 0,001020	1,219780 ± 0,824260

A rede de haplótipos gerada com todos os haplótipos de beta-actina amostrados na área em estudo e nas bacias vizinhas (Figura 5) mostra que existem dois grupos de haplótipos separados por oito passos mutacionais: um constituído por três haplótipos (BACT 5, BACT 13 e BACT 18) detetados no Lis, sub-bacia do Arunca (bacia do rio Mondego), em todas as sub-bacias do rio Tejo e no São Pedro (sub-rede à esquerda na Figura 5); e outro grupo, bastante

mais diversificado, com um total de 15 haplótipos (sub-rede à direita na Figura 5). Este grupo mais diversificado de haplótipos apresenta um formato em estrela, centrada em dois haplótipos mais frequentes (BACT 1 e BACT 6) e partilhados entre os rios em estudo e as bacias confinantes dos quais derivam os restantes 13 haplótipos por um a oito passos mutacionais (Figura 5). Ambos os rios em estudo apresentam haplótipos exclusivos: um no Lis (BACT 10) e três no Alcoa (BACT 4, BACT 3 e BACT 7) (Figura 5). Relativamente a haplótipos partilhados, as amostras do Lis partilham haplótipos com: 1) Alcoa e sub-bacias do Tejo, do Mondego e do Oeste (BACT 1, BACT 5 e BACT 6); 2) apenas com sub-bacias do Tejo (Nabão: BACT 9 e Alviela: BACT 12); 3) com sub-bacias do Mondego, Tejo e Oeste (respetivamente, Arunca e São Pedro: BACT 8, e Almonda: BACT11); 4) apenas sub-bacias do Mondego e Oeste (Arunca e São Pedro: BACT 13) (Figura 5). Por outro lado, no rio Alcoa, foram detetados apenas quatro haplótipos partilhados: 1) partilhados com Lis e sub-bacias do Tejo, Mondego e Oeste (BACT 1, BACT 5 e BACT 6); e 2) com apenas uma sub-bacia do Tejo e do Oeste (Almonda e Tornada: BACT 2) (Figura 5).

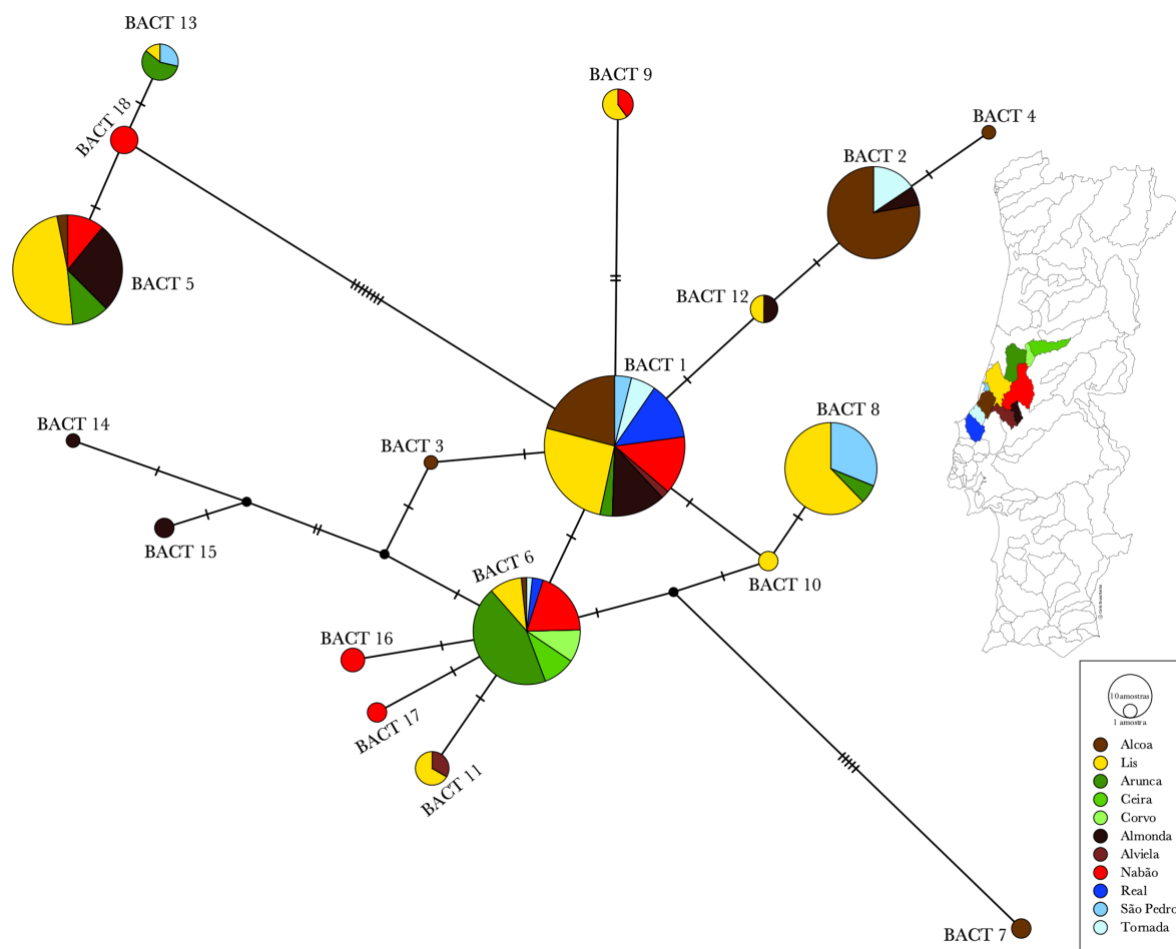


Figura 5 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo e bacias vizinhas para *A. oligolepis*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos não identificados representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) aos cinco conjuntos formados (Alcoa, Lis, sub-bacias do Tejo, sub-bacias do Mondego e bacias do Oeste) mostraram que existe uma maior variação dentro das populações e que existem diferenças significativas e estruturação entre os pares de locais de amostragem (80,47%; $F_{ST} = 0,19527$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Neste caso é possível concluir que: 1) o Alcoa e o Lis têm diferenças significativas ($p < 0,05$); 2) os locais de amostragem da bacia do Mondego diferem significativamente dos dois rios em estudo ($p < 0,05$); 3) todos os locais da bacia do Tejo têm diferenças significativas com o Alcoa ($p < 0,05$); 4) das bacias do Tejo apenas o Alviela não difere significativamente do Lis ($p > 0,05$); 5) o rio Alcoa difere significativamente de todos os rios das bacias do Oeste à exceção do Tornada e 6) o rio Lis difere significativamente de todos os rios das bacias do Oeste (Anexo II B – Tabela B4).

Análise de *Squalius pyrenaicus*

Citocromo *b* – Rios em estudo

No total foram analisadas 69 sequências de citocromo *b* (27 da bacia do Almonda, 17 do Alviela e 25 do Maior) que foram colapsadas em 17 haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 6. Analisando cada uma das três sub-bacias do rio Tejo em estudo, verifica-se que na sub-bacia do rio Maior o ponto de amostragem com um maior número de haplótipos, maior percentagem de haplótipos exclusivos e índices de diversidade genética mais elevados foi o “Rio Maior” (Tabela 6). Dos três pontos amostrados na sub-bacia do rio Almonda, o ponto de amostragem “Torres Novas” apresentou maior número de haplótipos e maior percentagem de haplótipos exclusivos, no entanto, foi o ponto de amostragem “Ruiva” que apresentou maior diversidade genética (Tabela 6). Por outro lado, o ponto de amostragem “Alvorão” foi o que apresentou menor número de haplótipos e menores valores dos índices de diversidade genética, não tendo sido detetados haplótipos exclusivos nos pontos de amostragem “Alvorão” e “Ruiva” (Tabela 6). Por último, no rio Alviela não é possível fazer comparações uma vez que só foi analisado um ponto.

Tabela 6 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo *b* para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para *S. pyrenaicus*.

Bacia / Sub-bacia	Ponto de Amostragem	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Tejo / Maior	Alcobertas		2	2	0	0%	0,4848 ± 0,1059	0,006061 ± 0,003626	4,363636 ± 2,318773
Tejo / Maior	Rio Maior		9	3	6	67%	0,9487 ± 0,0423	0,010292 ± 0,005789	7,410256 ± 3,705887
Tejo / Almonda	Alvorão		3	3	0	0%	0,7333 ± 0,1552	0,001667 ± 0,001416	1,200000 ± 0,883176
Tejo / Almonda	Ruiva		4	4	0	0%	0,8667 ± 0,1291	0,003056 ± 0,002257	2,200000 ± 1,407125
Tejo / Almonda	Torres Novas		7	3	4	57%	0,8381 ± 0,0680	0,002989 ± 0,001970	2,152381 ± 1,264849
Tejo / Alviela	Alviela nascente		3	2	1	33%	0,4853 ± 0,1260	0,001164 ± 0,000974	0,838235 ± 0,626583

Ao analisar a rede de haplótipos detetados nas bacias em estudo, Almonda, Alviela e Maior, verifica-se que existem 11 haplótipos exclusivos de um determinado ponto de amostragem (Figura 6). Na sub-bacia do rio Almonda existem quatro haplótipos exclusivos do ponto de amostragem “Torres Novas”, o ponto mais a jusante (CYTB 13, CYTB 14, CYTB 15 e CYTB 16). Na amostragem da nascente do Alviela também foi detetado um haplótipo exclusivo: CYTB 17. Por último, na sub-bacia do rio Maior foram detetados seis haplótipos exclusivos do ponto de amostragem “Rio Maior” (CYTB 1, CYTB 3, CYTB 4, CYTB 5, CYTB 7 e CYTB 8). Relativamente à partilha de haplótipos entre pontos de amostragem, foram detetados quatro haplótipos partilhados: 1) CYTB 11 e CYTB 12 são partilhados por todos os pontos de amostragem do Almonda e pela nascente do Alviela; 2) CYTB 2 e CYTB 6 partilhados pelos dois pontos de amostragem do Maior; 3) CYTB 10 partilhado por todos os pontos de amostragem do Almonda; e 4) CYTB 9 partilhado pelos pontos de amostragem “Ruiva” (Almonda) e “Rio Maior” (Maior).

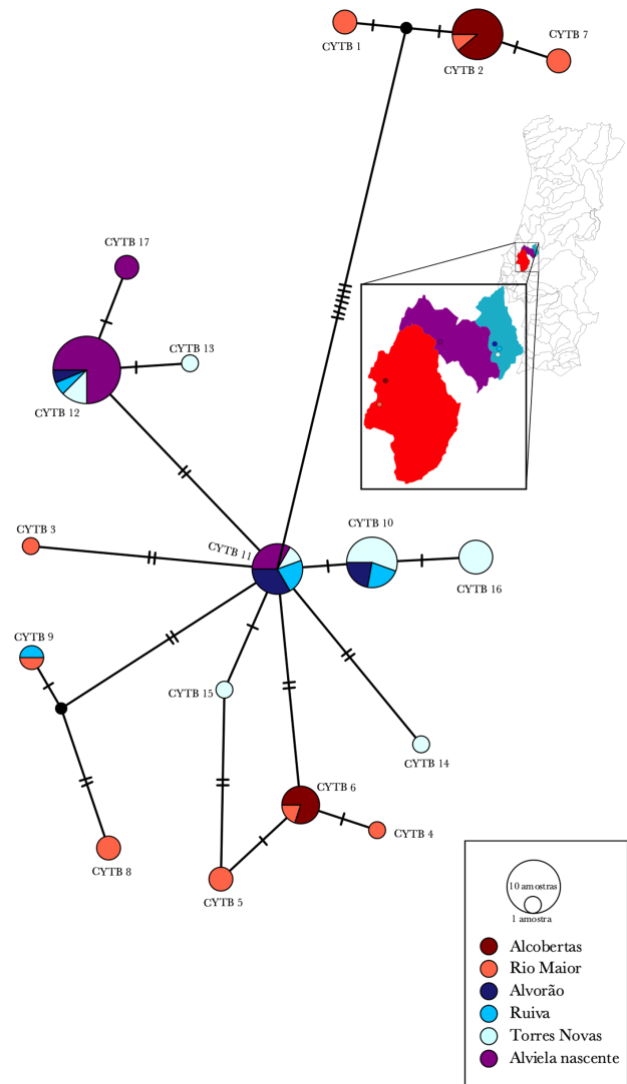


Figura 6 - Rede de haplótipos do gene citocromo *b* dos rios em estudo para *S. pyrenaicus*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. As linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Para testar a existência de diferenças significativas entre a diversidade genética das três sub-bacias do Tejo em estudo, constituíram-se três grupos para a análise de variância molecular (AMOVA): um grupo com os três pontos de amostragem do rio Almonda, um segundo com os dois pontos de amostragem do rio Maior e um terceiro grupo com o único ponto de amostragem do rio Alviela. Os resultados da AMOVA hierárquica assim estabelecida detetaram uma maior percentagem de variação dentro das populações (55,07%) e demonstraram que existem diferenças significativas entre a diversidade observada nas três sub-bacias ($F_{ST} = 0,44934$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Mais especificamente, as comparações entre todos os pares de pontos de amostragem (Anexo II B – Tabela B5) demonstraram que: 1) existem diferenças significativas entre o ponto de amostragem “Alviela” relativamente a todos os pontos de amostragem do Almonda e do Maior ($p < 0,05$); 2) os pontos de amostragem do Maior não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); 3) entre os pontos do Maior e do Almonda apenas o par “Rio Maior” – “Ruiva” não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$); e 4) nenhum dos pontos do Almonda apresenta diferenças significativas entre si ($p > 0,05$) (Anexo II B – Tabela B5).

Citocromo *b* – Rios em estudo e bacias vizinhas

No total foram analisadas 264 sequências de citocromo *b* (27 da bacia do Almonda, 17 do Alviela, 29 do Maior, 36 do Lis, e 155 do Tejo) que foram colapsadas em 52 haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 7. Das três sub-bacias do rio Tejo em estudo verifica-se que a do rio Maior apresenta maior número de haplótipos, maior percentagem de haplótipos exclusivos e maior diversidade genética (Tabela 7). Por outro lado, o rio Alviela apresenta o menor número de haplótipos e a menor diversidade genética, enquanto o rio Almonda apresenta a menor percentagem de haplótipos exclusivos (Tabela 7).

Relativamente às bacias contíguas à área em estudo, verifica-se que as sub-bacias dos rios Ponsul e Ocreza são as que apresentam maior número de haplótipos ($N=7$), a sub-bacia do rio Sever é a que apresenta maior percentagem de haplótipos exclusivos (100%) e a sub-bacia do rio Ocreza a maior diversidade genética (Tabela 7). Por último, a sub-bacia do rio Sever apresenta o menor número de haplótipos ($N=2$); os rios Lis, Sertã e Nabão a menor percentagem de haplótipos exclusivos (25%); e o rio Lis a menor diversidade genética (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de citocromo *b* para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para *S. pyrenaicus*.

Bacia	Sub-bacia	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Tejo	Alviela		3	2	1	33%	0,4853 ± 0,1260	0,001164 ± 0,000974	0,838235 ± 0,626583
Tejo	Almonda		8	6	2	25%	0,8205 ± 0,0446	0,002675 ± 0,001747	1,925926 ± 1,129591
Tejo	Maior		11	4	7	64%	0,8670 ± 0,0433	0,00901 ± 0,004885	6,487685 ± 3,160218
Lis	Lis		4	3	1	25%	0,2111 ± 0,0890	0,000668 ± 0,000657	0,480952 ± 0,425750
Tejo	Erges		4	2	2	50%	0,6381 ± 0,0931	0,003413 ± 0,002191	2,457143 ± 1,406962
Tejo	Aravil		3	1	2	67%	0,6000 ± 0,2152	0,004352 ± 0,003022	3,133333 ± 1,884439
Tejo	Ponsul		7	1	6	86%	0,8309 ± 0,0582	0,004310 ± 0,002633	3,102941 ± 1,694043
Tejo	Ocreza		7	4	3	43%	0,9643 ± 0,0772	0,004514 ± 0,002958	3,250000 ± 1,869756
Tejo	Sertã		4	3	1	25%	0,8095 ± 0,1298	0,003042 ± 0,002183	2,190476 ± 1,372385
Tejo	Nabão		4	3	1	25%	0,8000 ± 0,1721	0,002685 ± 0,002036	1,933333 ± 1,269296
Tejo	Grande Pipa		4	2	2	50%	0,7105 ± 0,0660	0,006118 ± 0,003520	4,405263 ± 2,269284
Tejo	Ota		3	2	1	33%	0,6368 ± 0,0644	0,001703 ± 0,001261	1,226316 ± 0,812671
Tejo	Sever		2	0	2	100%	0,4190 ± 0,1132	0,000582 ± 0,000629	0,149048 ± 0,403612
Tejo	Figueiró		5	1	4	80%	0,7789 ± 0,0524	0,001608 ± 0,001209	1,157895 ± 0,779664
Tejo	Muge		5	1	4	80%	0,6952 ± 0,1092	0,002910 ± 0,001928	2,095238 ± 1,238095
Tejo	Canha		4	1	3	75%	0,8667 ± 0,1291	0,00285 ± 0,002036	1,933333 ± 1,269296

A rede de haplótipos gerada com todos os haplótipos de citocromo *b* amostrados na área em estudo e nas bacias confinantes (Figura 7) é bastante diversificada, com um total de 52 haplótipos, centrada num haplótipo (CYTB 1) mais frequente e partilhado por um maior número de bacias/sub-bacias (N=10, incluindo Lis e cinco sub-bacias do Tejo) do qual derivam os restantes haplótipos por um a seis passos mutacionais. Nesta análise global, que tem em conta as bacias confinantes, verifica-se que os rios em estudo apresentam 10 haplótipos exclusivos: dois no Almonda (CYTB 26 e CYTB 27), um no Alviela (CYTB 25) e sete no Maior (CYTB 3, CYTB 4, CYTB 9, CYTB 10, CYTB 11, CYTB 13 e CYTB 14). Destes

últimos, salienta-se que três haplótipos detetados apenas no rio Maior (CYTB 4, CYTB 10 e CYTB 11) formam uma pequena sub-rede (à esquerda na Figura 7), derivada do haplótipo central por um mínimo de sete passos mutacionais.

Relativamente aos restantes haplótipos das três sub-bacias em estudo (N=8), estes são partilhados sobretudo com outras sub-bacias do Tejo (N=5) mas também com o Lis (N=3). Mais concretamente, o rio Almonda apresenta seis haplótipos partilhados: 1) CYTB 1, partilhado com as restantes duas sub-bacias em estudo (Alviela e Maior), com o Lis e com outras cinco sub-bacias do Tejo; 2) CYTB 17, partilhado com o Lis e com o Nabão; 3) CYTB 23, partilhado com o Lis; 4) CYTB 15, partilhado com o Maior; 5) CYTB 5, partilhado com três sub-bacias da margem direita do rio Tejo; e 6) CYTB 24, partilhado com o Alviela e com outras duas sub-bacias da zona inferior do rio Tejo. O rio Alviela, além do haplótipo CYTB 1 referido acima, apresenta um segundo haplótipo partilhado (CYTB 24), com o Almonda e outras duas sub-bacias da zona inferior do rio Tejo. Por fim, o rio Maior apresenta quatro haplótipos partilhados: 1) os acima mencionados CYTB 15 (partilhado com o Almonda) e CYTB 1 (partilhado com as restantes duas sub-bacias em estudo (Alviela e Maior), com o Lis e com outras cinco sub-bacias do Tejo); 2) CYTB 2, partilhado com a sub-bacia do rio Grande Pipa, localizada no Tejo inferior; 2) CYTB 15, com a sub-bacia do Almonda; e 3) CYTB 12, com a sub-bacia do rio Ocreza, localizada no troço médio direito do rio Tejo.

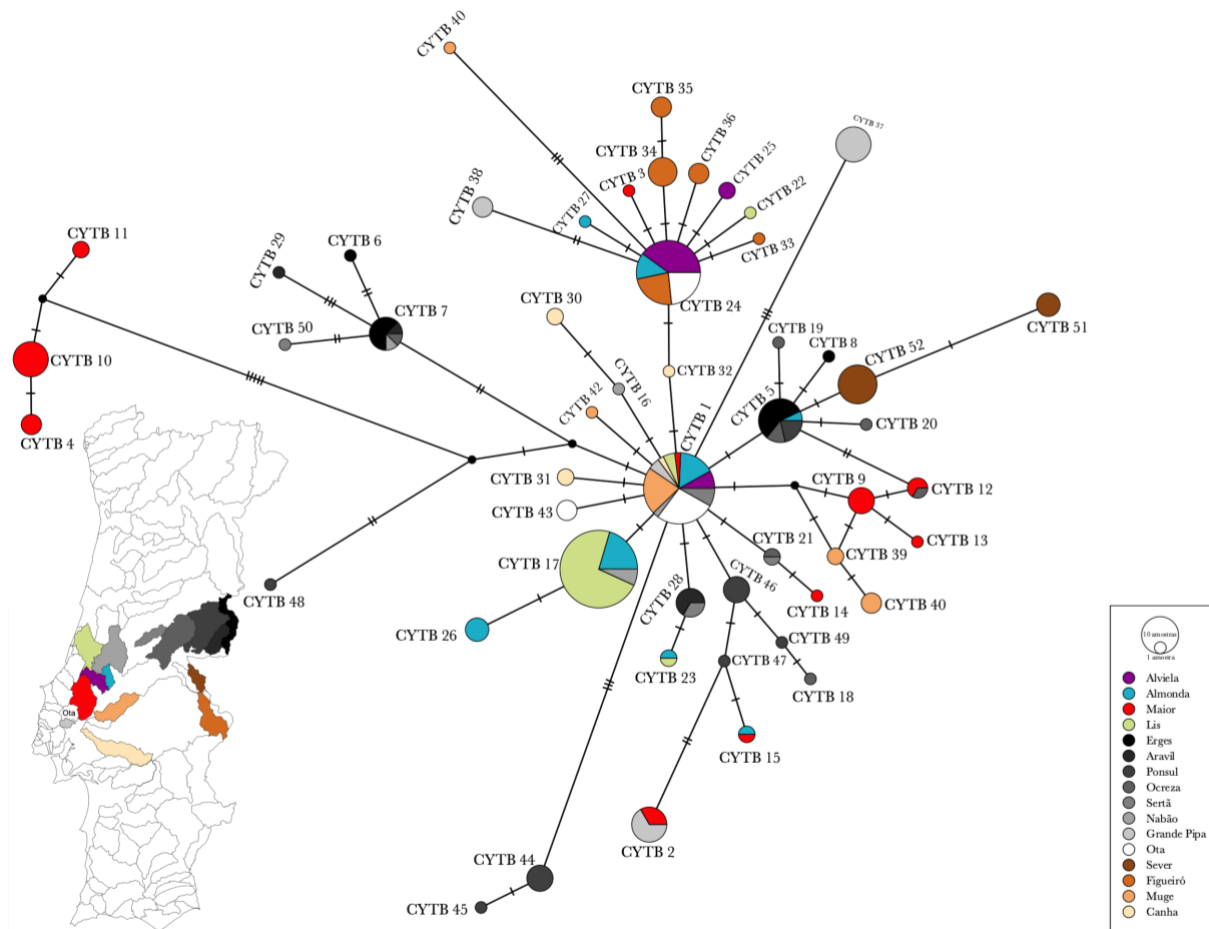


Figura 7 - Rede de haplótipos do gene citocromo *b* dos rios em estudo e bacias vizinhas para *S. pyrenaicus*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. Os círculos pretos não identificados representam haplótipos intermédios não sequenciados; e as linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA hierárquica) aos grupos criados (Alviela, Almonda, Maior, Lis e sub-bacias do Tejo) mostraram que existe uma maior variação dentro das populações (56,91%) e que existem diferenças significativas e estruturação entre estas ($F_{ST} = 0,43085$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Neste caso é possível concluir que: 1) as sub-bacias dos rios Alviela e Maior têm diferenças significativas entre si e relativamente a todas as outras sub-bacias e bacias amostradas ($p < 0,05$); 2) a sub-bacia do rio Almonda apresenta diferenças significativas relativamente a todas as outras sub-bacias amostradas exceto a do Nabão ($p > 0,05$); 3) a bacia do Lis apresenta diferenças significativas com todas as bacias e sub-bacias amostradas; e 4) considerando a totalidade das sub-bacias do rio Tejo apenas os pares Aravil – Nabão, Aravil – Sertã, Aravil – Canha, Canha – Nabão, Erges – Ocreza, Muge – Sertã, Nabão – Sertã e Ocreza – Sertã não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) (Anexo II B – Tabela B6).

Beta-actina – Rios em estudo

No total foram analisadas 122 sequências de beta-actina (36 do rio Alviela, 43 do rio Maior e 34 do rio Almonda) que foram colapsadas em oito haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 8. Na sub-bacia do rio Maior, o ponto de amostragem com maior número de haplótipos e maior diversidade genética é “Alcobertas”, sendo que os dois pontos de amostragem realizados nesta sub-bacia não apresentaram haplótipos exclusivos (Tabela 8). Na sub-bacia do rio Almonda, o maior número de haplótipos foi detetado em “Alvorão” (N=5) e o menor em “Ruiva” (N=3); a maior percentagem de haplótipos partilhados registou-se em “Ruiva” (33%) e a menor em “Torres Novas” (0%); e a maior diversidade genética foi igualmente obtida em “Ruiva” e a menor em “Torres Novas” (Tabela 8). Não tendo sido possível fazer comparações entre pontos de amostragem do rio Alviela por só ter sido amostrado um ponto, verifica-se que existe neste 33% de haplótipos exclusivos, tal como no ponto de amostragem “Ruiva” do rio Almonda, sendo essa a maior percentagem de haplótipos exclusivos detetada na totalidade dos pontos de amostragem (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo para *S. pyrenaicus*.

Bacia / Sub-bacia	Ponto de Amostragem	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Tejo / Maior	Alcobertas		4	4	0	0%	0,6506 ± 0,0505	0,001592 ± 0,001101	1,485057 ± 0,922904
Tejo / Maior	Rio Maior		3	3	0	0%	0,5541 ± 0,0967	0,001522 ± 0,001078	1,419913 ± 0,901642
Tejo / Almonda	Alvorão		5	4	1	20%	0,8222 ± 0,0969	0,003001 ± 0,001955	2,800000 ± 1,613122
Tejo / Almonda	Ruiva		3	2	1	33%	0,8333 ± 0,2224	0,002680 ± 0,002157	2,500000 ± 1,685500
Tejo / Almonda	Torres Novas		4	4	0	0%	0,7263 ± 0,0665	0,002386 ± 0,001533	2,226316 ± 1,280817
Tejo / Alviela	Alviela nascente		3	2	1	33%	0,6556 ± 0,0392	0,002611 ± 0,001610	2,436508 ± 1,351419

Ao analisar a rede de haplótipos detetados nas bacias em estudo, Alviela, Maior e Almonda, mostra a existência de duas sub-redes separadas por três passos mutacionais, cada uma delas centrada num haplótipo bastante frequente (BACT 1 e BACT 3), presente em quatro e seis pontos de amostragem. Verifica-se ainda que existem apenas três haplótipos exclusivos de um determinado ponto de amostragem (Figura 8). Na sub-bacia do rio Alviela foi detetado um haplótipo exclusivo (BACT 5) no único ponto amostrado, enquanto no rio Almonda foram detetados dois haplótipos exclusivos: 1) BACT 7 em “Alvorão”, o ponto mais próximo da nascente; e 2) BACT 8 em “Ruiva”, o ponto amostrado no troço intermédio deste rio. Dos quatro haplótipos partilhados apenas BACT 1 e BACT 3 são partilhados pelos três rios em estudo, enquanto BACT 6 é partilhado pelo Alviela e Almonda e BACT 2 pelo Almonda e Maior.

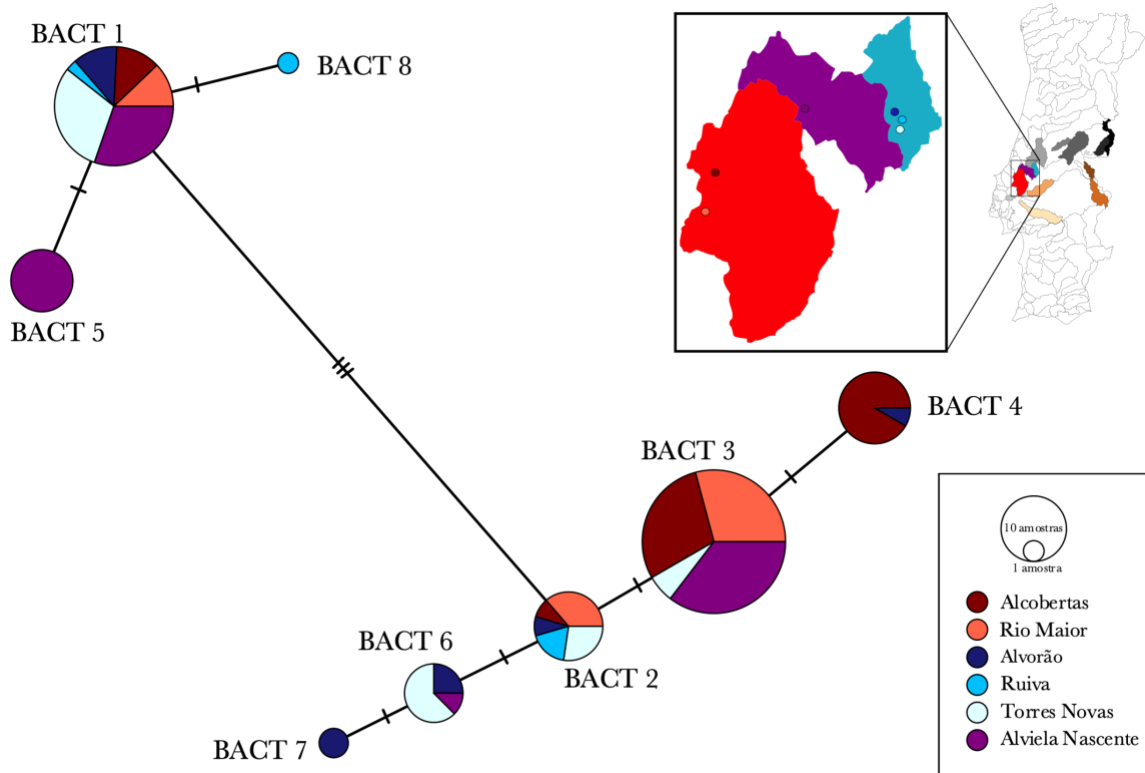


Figura 8 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo para *S. pyrenaicus*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com um tamanho proporcional ao número de indivíduos que o apresenta. As linhas que unem os haplótipos possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Para testar a existência de diferenças significativas entre a diversidade genética das três sub-bacias do Tejo em estudo, constituíram-se três grupos para a análise de variância molecular (AMOVA): um grupo com os três pontos de amostragem do rio Almonda, um segundo com os dois pontos de amostragem do rio Maior e um terceiro grupo com o único ponto de amostragem do rio Alviela. Os resultados da AMOVA hierárquica assim estabelecida detetaram uma maior percentagem de variação dentro das populações (79,01%) e demonstraram que existem diferenças significativas entre a diversidade observada nas três sub-bacias ($F_{ST} = 0,20986$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Mais especificamente, as comparações entre todos os pares de pontos de amostragem (Anexo II B – Tabela B7) demonstraram que: 1) o ponto de amostragem “Alviela Nascente” apenas difere significativamente dos pontos de amostragem da sub-bacia do rio Maior ($p < 0,05$); 2) os dois pontos de amostragem do rio Maior não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$); 3) existem diferenças significativas entre todos os pontos amostrados nos rios Maior e Almonda, à exceção do par “Rio Maior” – “Ruiva” ($p > 0,05$); e 4) os pontos amostrados no rio Almonda não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Beta-actina – Rios em estudo e bacias vizinhas

No total foram analisadas 296 sequências de beta-actina (38 do rio Alviela, 58 do rio Maior, 34 do rio Almonda e 166 dos rios da bacia do Tejo) que foram colapsadas em 11 haplótipos. Os resultados relativos aos haplótipos e índices de diversidade em cada ponto de amostragem são apresentados na Tabela 9. Das três sub-bacias do rio Tejo em estudo, a do Almonda é a que apresenta maior número de haplótipos e maior diversidade genética, enquanto a do Alviela apresenta a maior percentagem de haplótipos exclusivos (Tabela 9). Por outro lado, a sub-bacia do rio Alviela apresenta o menor número total de haplótipos e a menor diversidade genética, enquanto a sub-bacia do rio Maior apresenta a menor diversidade genética (Tabela 9).

Relativamente às bacias contíguas à área em estudo, verifica-se que, a sub-bacia do rio Erges apresenta o maior número de haplótipos ($N=5$) e a do Aravil o menor ($N=1$); a sub-bacia do rio Canha apresenta a maior percentagem de haplótipos exclusivos (33%) e as restantes sub-bacias, à exceção da do Erges, apresentam uma percentagem nula de haplótipos exclusivos; e, por último, a sub-bacia do rio Nabão apresenta a maior diversidade genética e a do rio Aravil a menor (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultado dos haplótipos e índices de diversidade de beta-actina para cada ponto de amostragem dos rios em estudo e bacias vizinhas para *S. pyrenaicus*.

Bacia	Sub-bacia	Cor associada	Nº haplótipos	Nº haplótipos partilhados	Nº haplótipos exclusivos	% haplótipos exclusivos	Diversidade genética (h)	Diversidade nucleotídica (π)	Nº médio de diferenças emparelhadas (MNPD)
Tejo	Almonda		7	6	1	14%	0,7665 ± 0,0505	0,002533 ± 0,001574	2,363636 ± 1,320489
Tejo	Alviela		3	2	1	33%	0,6415 ± 0,0440	0,002599 ± 0,001602	2,425320 ± 1,344734
Tejo	Maior		4	4	0	0%	0,6612 ± 0,0470	0,001793 ± 0,001184	1,672716 ± 0,996364
Tejo	Erges		5	4	1	20%	0,6450 ± 0,0850	0,000998 ± 0,000796	0,930736 ± 0,665837
Tejo	Aravil		1	1	0	0%	0,0000 ± 0,0000	0,000000 ± 0,000000	0,000000 ± 0,000000
Tejo	Ocreza		3	3	0	0%	0,6000 ± 0,2152	0,001429 ± 0,001181	1,333333 ± 0,954521
Tejo	Sertã		2	2	0	0%	0,1667 ± 0,1343	0,000536 ± 0,000551	0,500000 ± 0,456254
Tejo	Nabão		3	3	0	0%	0,7333 ± 0,1552	0,002358 ± 0,001741	2,200000 ± 1,407125
Tejo	Grande Pipa		3	3	0	0%	0,5942 ± 0,0788	0,001942 ± 0,001292	1,811594 ± 1,081308
Tejo	Sever		4	4	0	0%	0,7169 ± 0,0495	0,001333 ± 0,000968	1,243386 ± 0,811122
Tejo	Figueiró		3	3	0	0%	0,5363 ± 0,0328	0,001689 ± 0,001143	1,576102 ± 0,959535
Tejo	Muge		3	3	0	0%	0,5385 ± 0,1146	0,000930 ± 0,000780	0,868132 ± 0,648485
Tejo	Canha		3	2	1	33%	0,5909 ± 0,1079	0,002403 ± 0,001600	2,242424 ± 1,326136

A rede de haplótipos gerada com todos os haplótipos de beta-actina amostrados na área em estudo e nas bacias confinantes (Figura 9) mostra que existem três haplótipos mais frequentes (BACT 1, BACT 2 e BACT 3), dos quais derivam os restantes oito haplótipos por apenas um ou dois passos mutacionais. Os três haplótipos mais comuns estão presentes em 10 (BACT 1 e BACT 3) e 12 (BACT 2) sub-bacias de ambas as margens da bacia do Tejo, incluindo nas sub-bacias em estudo (BACT 1 e BACT 2 nas três sub-bacias e BACT 3 nas dos rios Almonda e Maior) (Figura 9). A sub-bacia do rio

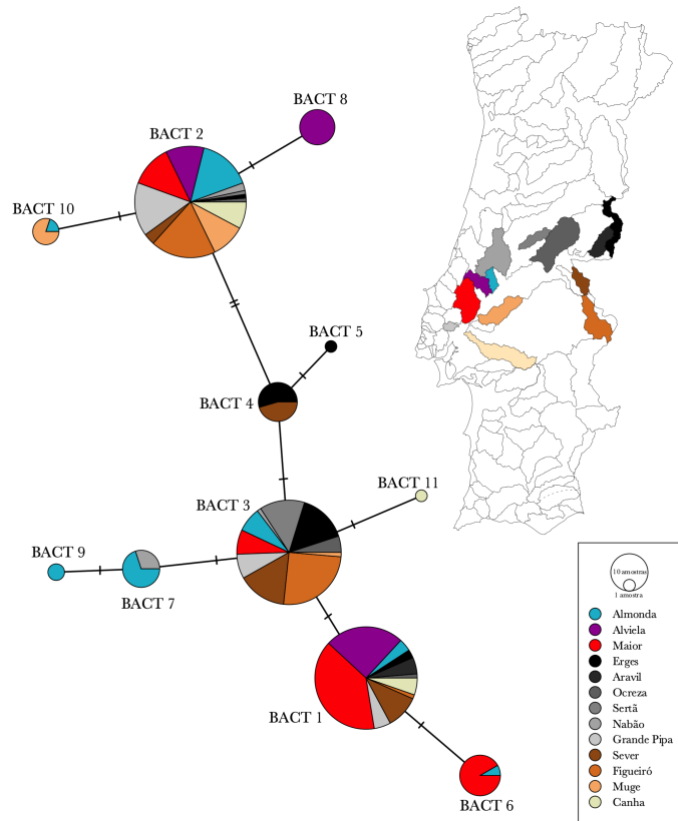


Figura 9 - Rede de haplótipos do gene beta-actina dos rios em estudo e bacias vizinhas para *S. pyrenaicus*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com tamanho proporcional ao número de indivíduos representados. As linhas que os unem possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Almonda partilha ainda o haplótipo BACT 6 com a sub-bacia do rio Maior, o haplótipo BACT 7 com a sub-bacia do rio Nabão e o haplótipo BACT 10 com a sub-bacia do rio Muge (Figura 9). Além dos já mencionados, os rios Maior e Alviela não partilham mais nenhum haplótipo.

Duas das três sub-bacias em estudo apresentam haplótipos exclusivos: BACT 9 no Almonda e BACT 8 no Alviela (Figura 9). Das restantes sub-bacias do Tejo, apenas a do Erges e de Canha apresentam também haplótipos exclusivos (BACT 5 e BACT 11, respetivamente).

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA hierárquica) aos grupos criados (Almonda, Alviela, Maior e sub-bacias do Tejo) mostraram que existe uma maior variação dentro das populações (78,56%) e que existem diferenças significativas e estruturação entre estas ($F_{ST} = 0,21443$; $p = 0,00000 \pm 0,00000$). Neste caso é possível concluir que: 1) as três sub-bacias em estudo têm diferenças significativas entre si ($p < 0,05$); 2) a sub-bacia do rio Alviela apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente às seguintes sub-bacias das margens direita e esquerda do rio Tejo: Erges, Figueiró, Muge, Sertã e Sever ($p < 0,05$); 3) a sub-bacia do rio Almonda apresenta diferenças significativas relativamente às sub-bacias dos rios Aravil, Erges, Muge, Sertã e Sever ($p < 0,05$) e 4) a sub-bacia do rio Maior difere significativamente de todas as sub-bacias do Tejo, exceto das do Aravil e Ocreza ($p > 0,05$), ambas na margem direita do rio (Anexo II B – Tabela B8).

Caracterização da fauna de gastrópodes

No total foram analisados 223 indivíduos, com base em critérios morfológicos (ver Anexo III), tendo sido identificadas cinco espécies de gastrópodes, incluindo uma espécie exótica (Tabela10).

Tabela 10 - Espécies de gastrópodes identificadas nas nascentes (X assinala a presença da espécie na nascente).

Espécie	Nº Indivíduos	Habitat	Origem	Estatuto de Conservação (IUCN)	Lis	Lena	Alcoa	Alcobertas	Alviela
<i>Theodoxus baeticus</i> (Lamarck, 1822)	198	Aquático	Nativo	Pouco Preocupante	X	X	X	X	X
<i>Radix balthica</i> (Linnaeus, 1758)	9	Aquático	Nativo	Pouco Preocupante	X				
<i>Oestophora spp.</i>	3	Terrestre	Nativo	-			X		
<i>Physa acuta</i> (Draparnaud, 1805)	12	Aquático	Exótico	(Não se aplica)			X		
<i>Xeroplexa spp.</i>	1	Terrestre	Nativo	-			X		
Riqueza específica (espécies nativas)					2	1	3	1	1

A identificação genética por *DNA barcoding*, com recurso ao gene COI, permitiu confirmar a identidade taxonómica de três das espécies previamente identificadas com base em caracteres fenotípicos: *Theodoxus baeticus*, *Radix balthica* e *Oestophora spp.*. No caso do indivíduo identificado como pertencente à espécie *Xeroplexa spp.* não foi possível fazer a extração e amplificação de ADN, uma vez que a concha estava vazia e não existia material genético para analisar. Relativamente à espécie exótica *Physa acuta* a extração de ADN foi bem-sucedida, no entanto, os resultados da amplificação não permitiram identificar a espécie dada a reduzida qualidade da sequência.

A rede de haplótipos elaborada para os indivíduos pertencentes à espécie *Theodoxus baeticus* demonstrou que existe semelhança entre os indivíduos analisados neste estudo e os de outros estudos que incluem indivíduos de Portugal e Espanha (Bunje & Lindberg, 2007; Sands et al., 2019, 2020) (Figura 10). Todos os indivíduos sequenciados, à exceção de um (COI 2, proveniente do rio Maior) partilham o haplótipo COI 1, presente igualmente em três rios amostrados por outros autores (Bunje & Lindberg, 2007; Sands et al., 2019, 2020): Mondego,

Anços e Fuentes de Tubos (Figura 10). O haplótipo exclusivo detetado no rio Maior (COI 2) difere do haplótipo partilhado pelos restantes indivíduos por apenas uma mutação (Figura 10). Globalmente, a espécie *T. baeticus* está representada por 19 haplótipos com um a sete passos mutacionais entre si (Figura 10). Os haplótipos mais diferenciados (COI 12, COI 13, COI 15 e COI 16) pertencem a indivíduos amostrados por outros autores no rio Jiloca (bacia hidrográfica do rio Ebro, Espanha) (Figura 10).

A rede apresentada inclui também um indivíduo pertencente à espécie *Theodoxus fluviatilis* (COI 8), para que seja perceptível a distância entre as duas espécies. Além deste, o haplótipo COI 14 (identificado no *Genbank* como sendo *T. baeticus*) também se encontra afastado dos haplótipos de *T. baeticus* por mais de 30 passos mutacionais, o que indica que poderá ser um indivíduo incorretamente classificado pelos autores da sequência (Sands et al., 2020) e, perante os resultados, pertencente à *T. fluviatilis* e não *T. baeticus*.

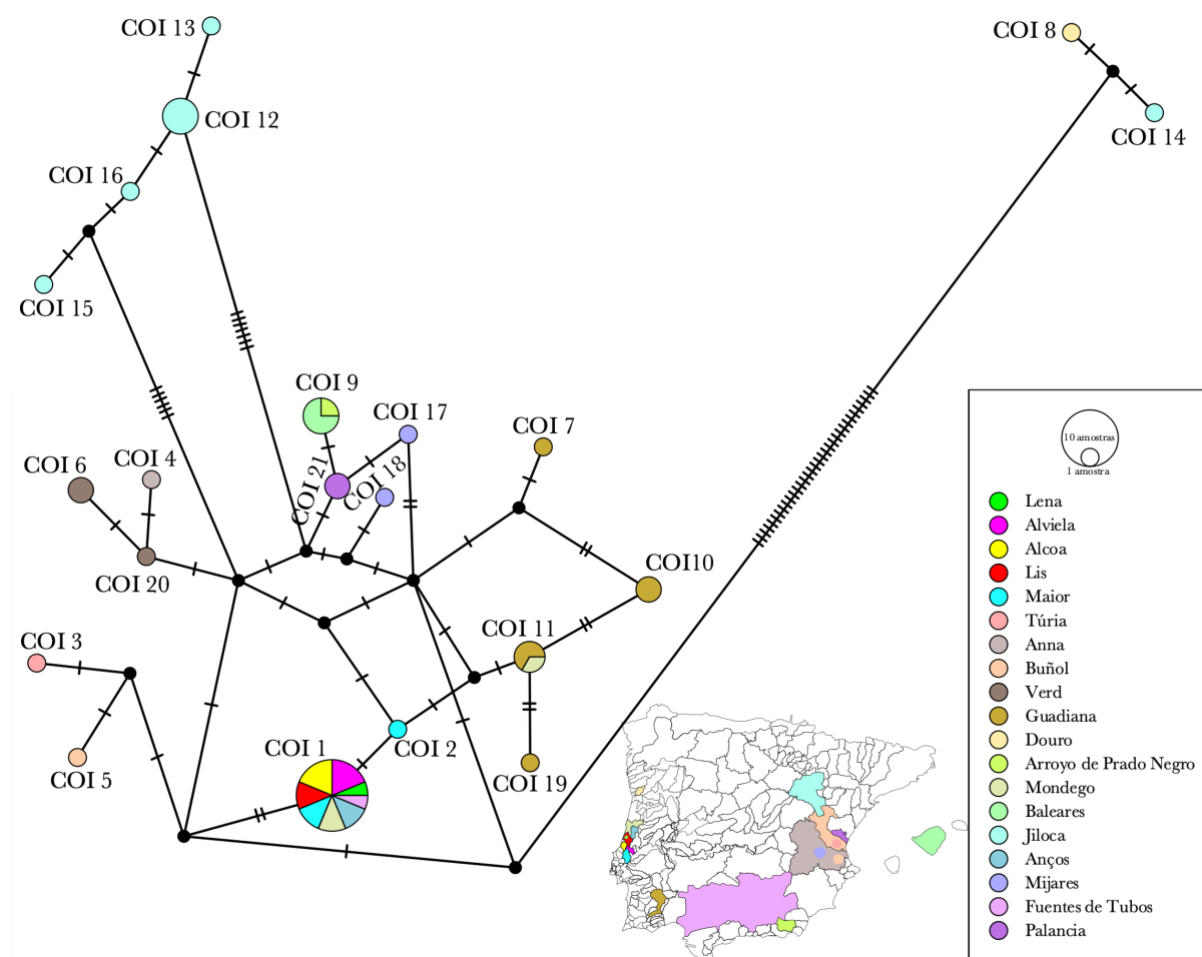


Figura 10 - Rede de haplótipos da espécie *T. baeticus*. [Cada círculo representa um haplótipo distinto, com tamanho proporcional ao número de indivíduos representados. As linhas que os unem possuem curtos traços perpendiculares correspondentes ao número de mutações existente entre os haplótipos por elas interligados.]

Discussão

A conectividade em ambientes aquáticos, especialmente em ambientes dulciaquícolas, pode ser afetada por diversos fatores incluindo as barreiras físicas naturais e antropogênicas existentes ao longo dos cursos de água (Caldera & Bolnick, 2008). A maior ameaça à conectividade das populações que ocorrem em sistemas dulciaquícolas é a fragmentação imposta pela construção de barragens e açudes que dificultam ou impedem total ou parcialmente a migração livre das espécies ao longo do curso do rio (Coleman et al., 2018; Rodeles et al., 2020; Selkoe et al., 2015). Esta fragmentação conseqüente isolamento de núcleos populacionais torna as populações mais vulneráveis a eventos estocásticos e à perda de diversidade genética (Bijlsma & Loeschcke, 2012; Coleman et al., 2018). Neste seguimento, a genética de paisagem (*landscape genetics*) pretende avaliar a diversidade genética num local tendo em conta as características da sua paisagem, incluindo a conectividade entre vários locais, podendo assim recolher informação sobre as microevoluções de uma população (Anderson et al., 2010; Balkenhol, Gugerli, et al., 2009; Balkenhol, Waits, et al., 2009; Bowman et al., 2016; Davis et al., 2015).

Como anteriormente descrito no capítulo de introdução, a evolução das espécies estritamente dulciaquícolas na Península Ibérica está estritamente ligada às alterações paleogeomorfológicas das bacias hidrográficas, sobretudo nos últimos 5 milhões de anos, à medida que as paleobacias deixaram de ser endorreicas e passaram a drenar para o Atlântico e Mediterrânico (Aboim et al., 2013; Casal-López et al., 2018; Sousa-Santos et al. 2019). Foi esta evolução da rede hidrológica ibérica e o conseqüente isolamento de populações que, a uma macroescala, deu origem não só a novas espécies, mas também a diferentes linhagens evolutivas de uma espécie em bacias que passaram a estar isoladas.

Ao longo dos últimos 50 anos temos vindo a assistir a um aumento muito rápido do número de barragens e açudes que são construídos nos rios e que modificam significativamente toda a sua dinâmica, fragmentando e isolando as populações de organismos aquáticos que neles ocorrem (Branco et al., 2012). A fragmentação dos rios graças às barreiras que quebram a sua conectividade longitudinal impede que os animais possam realizar migrações entre a nascente e a foz e vice-versa e, a longo prazo, pode mesmo conduzir ao aparecimento de diferenças genéticas entre sectores distintos de um mesmo rio.

Tendo em conta estes fatores, pretendeu-se colmatar a falta de informação sobre as espécies aquáticas existentes nas nascentes do Maciço Calcário Estremenho (MCE) e avaliar a diversidade genética de duas espécies-alvo, estabelecendo comparações interpopulacionais (com as bacias confinantes à área em estudo) e intrapopulacionais (entre locais de amostragem do mesmo rio). Este trabalho demonstrou, como será detalhado em seguida, que as nascentes do MCE não são desprovidas de vida e que este maciço não parece constituir uma barreira de isolamento efetiva entre as linhas de água existentes nas suas duas vertentes, pelo menos para uma das espécies de peixes dulciaquícolas e uma espécie de gastrópodes: no caso da ictiofauna, *A. oligolepis* (cuja área de distribuição conhecida estaria restrita à vertente oeste do MCE) está presente nas zonas de cabeceira dos rios Alviela, Almonda e Nabão, localizados na vertente este e norte do MCE; e, no caso dos gastrópodes, *T. baeticus* está presente em dois rios da vertente oeste (Lis e Alcoa) e em dois da vertente este (Alviela e Alcobertas) do MCE. Em ambos os casos, a colonização dos rios poderá ter acontecido de forma natural por contacto de cabeceiras no passado, como detalhado abaixo. Além disso, as análises genéticas realizadas a duas espécies-alvo de peixes revelaram que existe não só diferenciação genética interpopulacional (refletindo uma conectividade antiga entre bacias atualmente independentes), como também diferenciação intrapopulacional, o que indica que poderá existir perda de conectividade genética num mesmo curso de água devido às características particulares dos ecossistemas fluviais.

i) Composição específica

A realização deste estudo demonstrou que as nascentes do Maciço Calcário Estremenho (MCE) não são desprovidas de vida, tendo sido detetada a presença de oito espécies nativas de peixes e quatro espécies nativas de gastrópodes. As nascentes são, por isso, um local importante para a conservação de espécies dulciaquícolas nativas e endémicas, três delas com elevada categoria de ameaça: escalo-do-sul *Squalius pyrenaicus* (Actinopterygii, Leuciscidae, endémica da Península Ibérica, Em Perigo), enguia europeia *Anguilla anguilla* (Actinopterygii, Anguillidae, nativa da Península Ibérica, Em Perigo) e boga-portuguesa *Iberochondrostoma lusitanicum* (Leuciscidae, endémica de Portugal, Criticamente em Perigo). A presença destas espécies nas bacias e sub-bacias hidrográficas existentes no MCE não é uma novidade, pois as suas áreas de distribuição eram previamente conhecidas (Bolotov et al., 2017; Bunje &

Lindberg, 2007; Collares-Pereira et al., 2021). Contudo, a sua presença nas zonas montante das linhas de água do MCE, junto às nascentes, não estava descrita até ao momento.

Além da presença das referidas espécies nativas, este estudo também revelou a presença de duas espécies exóticas: góbio *Gobio lozanoi* (Actinopterygii, Cyprinidae) e o caramujo *Physa Acuta* (Gastropoda, Physidae). Estas espécies podem prejudicar as espécies nativas através da predação e da competição, sendo que algumas espécies exóticas podem até hibridar com as nativas (Kats et al., 2013). Estima-se que na região mediterrânica uma em cada três espécies de peixes de água doce sejam exóticas e que 44% da ictiofauna ibérica também o seja (Ascensão, 2011; Paulson & Stockwell, 2020). É, por isso, necessário que exista um forte investimento na prevenção de novas introduções e no controlo da proliferação das espécies alóctones (ou, idealmente, a sua erradicação) para que não causem danos irreversíveis nos ecossistemas nas quais foram introduzidas. Por exemplo, podem ser realizadas ações de remoção e ações de sensibilização ambiental para o público em geral, uma vez que a introdução destas espécies tem origem antropogénica, deliberada ou inadvertida.

ii) *Identidade taxonómica dos gastrópodes – confirmação genética*

O *DNA barcoding* é uma ferramenta rápida e precisa na identificação nas espécies eucariotas através da análise do gene COI (Ankola et al., 2020). Neste estudo, e após a identificação morfológica por parte de um especialista, a técnica de *DNA barcoding* permitiu confirmar a identidade de três das espécies identificadas com base em caracteres fenotípicos: *Theodoxus baeticus*, *Radix balthica* e *Xeroplexa spp.*.

Ao longo dos anos, têm existido alterações taxonómicas no género *Theodoxus* e várias espécies têm sido renomeadas. Uma das trocas mais comuns é a identificação de *Theodoxus baeticus* como *Theodoxus fluviatilis* ou o oposto. A rede de haplótipos construída, usando *Theodoxus fluviatilis* como *outgroup*, permitiu ter a confirmação de que os exemplares encontrados nestas nascentes pertencem à espécie *Theodoxus baeticus*. Foi igualmente possível perceber que os gastrópodes analisados neste estudo são geneticamente semelhantes aos de rios presentes em Espanha, para o gene analisado. Estudos futuros devem focar-se na utilização de outros marcadores moleculares para averiguar se existem diferenças entre as populações de diferentes rios ibéricos.

iii) Conetividade genética das espécies-alvo

Em termos genéticos, este estudo demonstrou que, além das esperadas diferenças interpopulacionais entre peixes da mesma espécie existentes nas diferentes linhas de água (e que refletem a ocorrência de conetividade genética no passado), também existem diferenças intrapopulacionais que permitem tecer algumas considerações sobre a conetividade genética atual dentro de uma mesma bacia/sub-bacia hidrográfica. Para responder a estes dois planos de análise (conetividade genética passada e atual) foram analisadas populações de duas espécies-alvo que ocorrem nas nascentes do MCE (*Achondrostoma oligolepis* e *Squalius pyrenaicus*) e que estão amplamente distribuídas, respetivamente, nas vertentes oeste e este do MCE.

a) Conetividade genética passada

Em primeiro lugar, ao nível da caracterização genética interpopulacional, a rede de haplótipos de citocromo *b* construída englobando as bacias em estudo e as bacias com elas confinantes demonstrou que, no caso do *A. oligolepis*, as populações encontradas nas nascentes da vertente oeste do MCE, nos rios Alcoa e Lis, têm afinidade com as bacias hidrográficas do Mondego e das Ribeiras do Oeste, como seria de esperar dada a distribuição da espécie ao longo de uma faixa Atlântica que se estende desde o rio Minho até ao rio Real (Collares-Pereira et al. 2021). As populações de *A. oligolepis* dos rios Alcoa e Lis apresentam haplótipos exclusivos (para os dois genes analisados), o que indica que a ocorrência desta espécie na vertente oeste do MCE será o resultado de um processo natural de dispersão que resultou do contacto entre as cabeceiras/afluentes de rios que atualmente são independentes, mas que, no passado, estiveram ligados e, por isso, as populações apresentam já algum grau de diferenciação., mesmo que temporariamente. Além destas populações localizadas a oeste do MCE, o que este estudo trouxe de inovador foi a caracterização genética de três núcleos populacionais encontrados fora da área de distribuição dada para a espécie, amostrados em três nascentes da vertente este do MCE: Almonda, Alviela e Nabão (sub-bacias do rio Tejo).

As populações de *A. oligolepis* presentes nas cabeceiras das sub-bacias do Tejo localizadas na vertente este do MCE, Almonda e Alviela, apresentaram apenas um haplótipo e o mesmo era partilhado com populações dos rios costeiros da vertente oposta do MCE (Lis, São Pedro, Alcoa, Tornada e Real). Uma vez que só foi encontrado um haplótipo e que o mesmo não era exclusivo, mas sim partilhado, a presença de *A. oligolepis* nestas sub-bacias do Tejo

poderá ter origens antropogénicas, ou seja, esta espécie pode ter sido transportada para estes locais por mão humana. Contudo, as nascentes destes rios ficam no máximo a 50 km de distância e poderá ter acontecido, alternativamente, um contacto entre cabeceiras num passado recente, sem que tenha decorrido tempo suficiente para que se possam diferenciar e originar haplótipos exclusivos das sub-bacias do Tejo. Pelo contrário, no caso do rio Nabão, a população de *A. oligolepis* aí encontrada apresentou nove haplótipos, sendo que apenas quatro são partilhados (com rios da vertente oeste e com o Mondego) e os restantes são exclusivos da população. Neste caso, a presença de *A. oligolepis* na sub-bacia do Nabão poderá ser o resultado de contactos passados e não mediados por mão humana com as cabeceiras de afluentes do Mondego e de rios da vertente oeste do MCE, há tempo suficiente para terem surgido haplótipos exclusivos neste rio.

No caso da segunda espécie-alvo analisada, *S. pyrenaicus*, verificou-se que as populações presentes nas nascentes da vertente Este do MCE apresentam, como seria de esperar dada a área de distribuição da espécie, afinidade genética com as bacias confinantes (sub-bacias do Tejo e bacia do Lis), já com algum grau de diferenciação ao nível do gene mitocondrial citocromo *b* traduzido pela presença de haplótipos exclusivos destes locais. A presença desta espécie na bacia do Lis, localizada na vertente oeste do MCE e no limite sul da área de distribuição de *Squalius carolitertii* (que ocorre desde a bacia do Mondego até às bacias da Galiza) pode ser explicada por contactos com as cabeceiras das sub-bacias do Tejo, localizadas a escassos quilómetros na vertente oposta do MCE. É importante reforçar que antes da elevação do MCE a configuração hidrográfica era diferente e poderá ter sido nessa altura que os rios estavam interligados, permitindo assim a passagem destas espécies entre as diversas bacias e sub-bacias.

b) Conetividade genética atual

Em relação à conetividade genética atual, verificou-se que em ambas as espécies e para ambos os genes existem diferenças intrapopulacionais. A presença de haplótipos exclusivos em determinados troços dos rios demonstra que, apesar destes animais partilharem o mesmo rio, podem existir barreiras ao livre fluxo genético que justificam a deteção de conjuntos de haplótipos diferentes consoante o local amostrado. Salienta-se ainda o facto de terem sido detetados haplótipos exclusivos nas nascentes, tanto para o citocromo *b* como para a beta-actina, para as espécies-alvo *A. oligolepis* e *S. pyrenaicus*. A presença de haplótipos exclusivos nas nascentes parece indicar que existem núcleos populacionais residentes nestes locais,

provavelmente com reduzido contacto com os núcleos localizados a jusante e, conseqüentemente, com reduzida troca de genes entre si. Apesar de normalmente serem vistas como zonas com menos recursos e como locais aos quais os peixes não regressam por não conseguirem migrar de volta graças às barreiras que encontram ao longo dos rios, as cabeceiras dos rios do MCE parecem albergar uma parte considerável da diversidade genética global das populações analisadas. Por outro lado, também foram encontrados haplótipos exclusivos em locais amostrados a jusante das nascentes, o que reforça a ideia de existirem núcleos populacionais com fundos genéticos distintos ao longo do rio, provavelmente muito pouco comunicantes entre si. Esta aparentemente reduzida conectividade genética intrapopulacional pode justificar-se devido à existência de barreiras físicas intransponíveis e/ou ao estabelecimento de núcleos populacionais em troços com habitats mais favoráveis, intercalados por zonas menos favoráveis e, por isso, menos povoadas. Uma vez que uma parte significativa do território português está sob influência do clima mediterrânico, muitos rios são intermitentes, alternando entre caudais elevados no inverno e seca total no verão (Acuña et al., 2005), e os rios em estudo não são exceção. No verão, muitos locais destes rios ficam secos, obrigando a que os peixes encontrem refúgios em pequenos pegos para que consigam sobreviver à época quente. A procura destes refúgios e a fixação nestes locais também poderá contribuir para o aparecimento de haplótipos exclusivos em determinados troços de um rio. As diferenças intrapopulacionais detetadas neste estudo poderão, por isso, ser o resultado da perda da conectividade longitudinal dos rios. De facto, a construção de barragens e açudes e as secas no período estival impedem/dificultam as migrações dentro dos rios, contribuindo para a fragmentação das populações de peixes e para a diminuição dos efetivos populacionais: os peixes acabam por ficar isolados em pequenos troços ao longo do rio, acabando, em teoria, por se reproduzir nestes locais com um número mais limitado (e geneticamente menos diversificado) de parceiros, o que pode justificar as diferenças intrapopulacionais observadas no que diz respeito ao conjunto de haplótipos detetados em cada ponto de amostragem.

A Tabela 11 procura sistematizar os resultados obtidos de modo a demonstrar a importância de adotar esquemas de amostragem que contemplem vários locais ao longo de um rio, quando se planeiam estudos de genética populacional em peixes dulciaquícolas primários. Assim, verifica-se que, em todos os rios estudados, se tivessem sido analisados apenas os haplótipos presentes nas nascentes, estes representariam apenas 22% a 50% do total de haplótipos detetados quando se consideram todos os locais de amostragem desse mesmo rio. Por isso, ao analisar apenas um local, estaríamos a influenciar os resultados de uma forma

negativa, perdendo informação importante sobre a real diversidade genética global da população.

Tabela 11 - Nº de haplótipos que seriam detetados se apenas se amostrasse um local no rio (apenas nascente) vs número de haplótipos detetados com vários locais amostrados

Rio	<i>Achondrostoma oligolepis</i>		<i>Squalius pyrenaicus</i>	
	Apenas nascente	Vários locais amostrados	Apenas nascente	Vários locais amostrados
Almonda			3	8
Lis	3	6		
Maior			2	9
Alcoa	2	4		

Conclusões finais

Uma vez que o MCE faz parte do Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros (PNSAC) que se insere num Sítio de Importância Comunitária, a informação obtida e sintetizada neste estudo poderá ser utilizada em planos de gestão e de conservação das espécies e também poderá ser aplicada, no futuro, a outras espécies dulciaquícolas para que sejam alvos de conservação. Este estudo revela também a importância da integração da genética de paisagem (*Landscape Genetics*), que se encontra dividida em cinco aplicações práticas muito importantes: **(1)** identificação das unidades evolutivamente significativas para conservação; **(2)** gestão de agentes patogénicos e espécies invasoras; **(3)** planeamento de sistemas de património natural; **(4)** avaliação do estado populacional e **(5)** restauro de populações (Bowman et al. 2016). Este último aspeto é de extrema importância para os ecossistemas dulciaquícolas, uma vez que serve para a deteção de barreiras (como barragens e açudes), obstáculos (como as cascatas) e locais de refúgios e a sua correlação com dados de genética populacional, fornecem informação importante sobre como agir para poder restaurar uma população.

A existência de diferenciação intrapopulacional detetada neste estudo levanta duas questões importantes: **(1)** a diversidade genética pode diferir entre troços, localizados a montante e a jusante de um mesmo rio; e **(2)** o esquema de amostragem pode influenciar os resultados obtidos, no que respeita à diversidade genética global de uma população distribuída em ambientes dulciaquícolas heterogéneos e com barreiras à conectividade hídrica longitudinal. Este estudo revela, por isso, que a amostragem de peixes dulciaquícolas em vários locais de um

mesmo rio, para a realização de estudos genéticos, gera resultados mais fiáveis de diversidade populacional. No futuro, seria importante apostar em estudos adicionais, com marcadores moleculares de ritmo rápido (como os microssatélites, por exemplo) para avaliar a conectividade genética das populações de peixes estritamente dulciaquícolas e relacioná-la com os habitats fluviais e com alterações hidrológicas e morfológicas que tenham impacto no livre fluxo de genes, de modo a ser possível estabelecer normas de gestão e conservação que maximizem o estado de conservação das espécies.

Contudo, os resultados deste estudo já permitem realçar cinco medidas fundamentais e prioritárias a adotar no PNSAC: **(1)** preservação e reabilitação das galerias ripícolas; **(2)** melhoria da qualidade da água; **(3)** incremento da disponibilidade hídrica em época estival; **(4)** controlo da proliferação de espécies exóticas e invasoras e **(5)** promoção da conectividade fluvial. Estas cinco medidas podem, ainda, ser desdobradas em oito medidas ainda mais concretas e benéficas para o património nativo e endémico do PNSAC e territórios imediatamente adjacentes: **(1)** remoção de barreiras transversais obsoletas e/ou desnecessárias que impeçam a progressão da ictiofauna ao longo do curso de água para promover a redução da fragmentação das populações; **(2)** investimento na reabilitação das galerias ripícolas autóctones, recorrendo a técnicas de engenharia natural, para promoção da permanência hídrica estival, estabilização de taludes e constituição de zonas-refúgio para a ictiofauna; **(3)** promoção da melhoria da qualidade da água, dando ênfase à resolução dos pontos de descarga de efluentes sem tratamento prévio e à articulação efetiva entre entidades com vista à resolução das situações de incumprimento; **(4)** realização de ações regulares de controlo da proliferação de espécies exóticas aquáticas, com efeitos reconhecidamente nefastos para a conservação da ictiofauna nativa. Estas ações deverão ser acompanhadas por ações de sensibilização da população local de modo a minimizar a probabilidade de novas introduções; **(5)** adoção de medidas eficazes de gestão dos usos da água, de modo a minimizar a interrupção da conectividade hídrica em época estival; **(6)** capacitação de técnicos para a adoção de boas práticas na execução das limpezas das linhas de água; **(7)** capacitação os diferentes utilizadores dos sistemas aquáticos para a adoção de boas práticas que potenciem a disponibilidade hídrica em época estival (preservação de galerias ripícolas, arborização de terrenos abandonados, correta gradagem dos solos, gestão eficaz das regas, estabilização dos taludes em risco de erosão) e **(8)** promoção da literacia ambiental e o papel cívico dos munícipes na preservação da Natureza e da Biodiversidade local, desenvolvendo ações de sensibilização, formação, capacitação de técnicos e divulgação científica.

Anexos

Anexo I – Estado da Arte

Conetividade Hidrológica

A conetividade hidrológica é essencial para a integridade ecológica dos ecossistemas de água doce e pode ser explicada como a transferência, mediada pela água, de matéria, energia e até de organismos dentro e/ou entre elementos dos ciclos hidrológicos, cuja alternância pode ter grandes impactos ambientais (Rodeles et al., 2020). Esta conetividade inclui interações ao longo do tempo e em três dimensões espaciais: a longitudinal (deslocação da nascente à foz); a lateral (deslocação entre habitats ribeirinhos e planícies aluviais) e a vertical (deslocações entre a água superficial e a água em profundidade) (Rodeles et al., 2020).

O conceito de conetividade hidrológica abrange também a conetividade populacional que se define pela troca e estabelecimento de indivíduos da mesma espécie entre populações com áreas de distribuição diferentes (Hughes et al., 2013). Este conceito é igualmente aplicado à existência de livre circulação de indivíduos (e dos seus genes) entre os vários sectores que constituem um rio, sem que existam barreiras a impedir a sua progressão. As características intrínsecas de cada espécie e as condições extrínsecas dos diferentes habitats acabam por ser fatores que influenciam a conetividade populacional e o fluxo genético (Washburn et al., 2020). No caso dos sistemas de água doce, a conetividade pode ser afetada pelas características da estrutura da bacia hidrográfica, como por exemplo: inclinação do canal, caudal, altitude, existência de cascatas e quedas de água e dimensão dos rios e ribeiras. A conetividade fluvial pode, ainda, ser afetada por fatores antropogénicos (Caldera & Bolnick, 2008) como a construção de açudes ou barragens e o desvio das linhas de água. Todos estes aspetos podem afetar a livre circulação e as migrações das espécies, bem como a diversidade e o fluxo genético das populações (Bowman et al., 2016; Caldera & Bolnick, 2008).

Uma das maiores ameaças que os rios enfrentam é fragmentação dos seus habitats (Coleman et al., 2018; Rodeles et al., 2020; Selkoe et al., 2015) que, por norma, acontece devido à construção de barragens ou açudes ao longo do curso do rio. A perda e fragmentação de habitats afetam a conetividade natural dos rios o que poderá contribuir para o declínio das populações de peixes de água doce (Blomqvist et al., 2010; Branco et al., 2012). Também a

escassez de água e a existência de longos períodos de seca, como acontece em Portugal, causam a perda de conectividade fluvial, ameaçando a sobrevivência das espécies de peixes de água doce (Branco et al., 2012). As populações isoladas ficam assim mais vulneráveis a eventos estocásticos e, como consequência, mais vulneráveis à perda da diversidade genética e com maior probabilidade de extinção (Bijlsma & Loeschcke, 2012; Coleman et al., 2018).

No ecossistema marinho existem vários habitats que podem estar fragmentados como é o caso das pradarias marinhas, recifes de coral e fontes hidrotermais (Baguette et al., 2013; Selkoe et al., 2015). Por isso, as paisagens marinhas (*seascapes*) podem ser consideradas redes de manchas de habitat dentro do meio marinho nas quais existem populações locais das espécies conectadas por dispersão ativa ou passiva (Baguette et al., 2013). Contudo, e de um modo geral, as espécies marinhas apresentam um grande fluxo genético e conectividade tanto a escalas locais, regionais e globais (Junge et al., 2019). Mesmo assim, a conectividade no ambiente marinho é difícil de avaliar visto que a maioria das espécies apresente um ciclo de vida bifásico inicialmente com dispersão de ovos e/ou das larvas e posteriormente com adultos bentônicos ou sedentários (Appleyard et al., 2021; Gandra et al., 2021; Selkoe et al., 2015; Selkoe & Toonen, 2011; Toonen et al., 2011). Neste caso, a dispersão dos ovos ou das larvas está dependente das correntes oceânicas que têm a capacidade de ligar uma mancha de habitat a outra mais distante (Boussarie et al., 2022; Snyder et al., 2014). No caso das espécies que não apresentam fase larvar, como é o caso dos mamíferos marinhos e dos elasmobrânquios, apresentam uma capacidade de se dispersar por todo o oceano sem enfrentar barreiras óbvias à sua dispersão, como as barreiras físicas (Boussarie et al., 2022; Selkoe et al., 2015; Toonen et al., 2011). No entanto, estas espécies acabam por apresentar estrutura genética espacial devido aos seus locais de desova ou reprodução (Selkoe et al., 2015).

Entender os padrões da conectividade marinha é essencial para a gestão de recursos, especialmente a criação e para o aumento da eficácia das áreas marinhas protegidas uma vez que estas dependem não só da sua auto-reposição, mas também do efeito de *spillover*, ou seja, da exportação de biomassa para o exterior da área marinha protegida (Gandra et al., 2021; Junge et al., 2019).

Incluir a avaliação da conectividade populacional em estudos com vista ao estabelecimento de medidas de conservação é, portanto, essencial para o controlo e gestão das diferentes populações pois sem esta variável não é possível prever como é que uma população será afetada quando se tenta modificar/controlar uma outra (Hughes et al., 2013). Além disso,

a diversidade genética de duas populações de uma espécie pode também indicar se existe conectividade entre as mesmas através da avaliação da sua estrutura genética (Beger et al., 2014).

Diversidade genética

A diversidade genética de uma espécie/população é representada pelas diferentes características de cada indivíduo, sejam elas ao nível do fenótipo ou apenas ao nível do genótipo (Abdul-Muneer, 2014). Esta diversidade é necessária para que as populações se possam adaptar a mudanças no ecossistema e assim sobreviverem (Frankham et al., 2004). Os genes são definidos como sequências de nucleótidos de um determinado locus de uma molécula de DNA, ou seja, a diversidade genética traduz-se em pequenas alterações nestas sequências (Frankham et al., 2004; Lindenmayer & Burgman, 2005). Diferenças nas sequências de DNA podem levar a modificações nas sequências de aminoácidos na proteína que determinado gene codifica (Abdul-Muneer, 2014; Frankham et al., 2004; Lindenmayer & Burgman, 2005). São estas variações de proteínas que provocam diferenças em funções bioquímicas, morfológicas ou comportamentais que, conseqüentemente, afetam a taxa de reprodução, sobrevivência e comportamento dos indivíduos (Frankham et al., 2004). As semelhanças e diferenças genéticas dentro das populações e entre grupos de populações são, por isso, fontes de informação essenciais para entender a história evolutiva de uma espécie mas também são capazes de fornecer informação sobre o seu potencial evolutivo e sobre o seu estado atual (Dionne et al., 2008).

Quanto maior for a diversidade genética de uma população, maior probabilidade terá de sobreviver a alterações que eventualmente ocorram no ambiente. Em populações de grandes dimensões e com elevado fluxo genético com populações vizinhas, é expectável existir uma grande diversidade genética e uma maior aptidão para lidar com alterações do ambiente (Frankham et al., 2004). Pelo contrário, em populações pequenas, que por norma representam também espécies ameaçadas, a diversidade genética é muito reduzida, o que irá afetar ainda mais a sua probabilidade de sobrevivência (Arif & Khan, 2009; Frankham et al., 2004).

Apesar das suas diferenças, tanto no meio marinho como no de água doce existe um número semelhante de espécies de peixes, sendo que no meio de água doce são cerca de 15 150 espécies do grupo *Actinopterygii* vs 14 740 no meio marinho e em ambos os locais existem zonas com maior diversidade (Arthington et al., 2016). No caso dos sistemas marinhos, a

diversidade de espécies é maior ao longo das plataformas continentais e de recifes de corais associados as ilhas, enquanto que em ambientes de água doce a diversidade específica está associada à elevação de montanhas, sistemas com carácter insular e até flutuações do nível do mar (Arthington et al., 2016)

O estudo da diversidade genética de uma população e a avaliação do seu efetivo populacional são aspetos importantes para estabelecer o estado de conservação da espécie (Beger et al., 2014). Tornar as populações unidades de conservação e reunir esforços para conservar individualmente as diferentes populações de uma espécie são igualmente medidas importantes para conservar a variabilidade genética e diminuir o seu risco de extinção (Lindenmayer & Burgman, 2005).

Evolução das espécies

De uma forma resumida e básica, a evolução pode ser definida como uma mudança na composição genética de uma população, no entanto, esta mudança necessita de diversidade genética (Frankham et al., 2004). A evolução ocorre quando existe uma alteração de frequência de um alelo graças aos processos de mutação, seleção natural, acaso ou migração (Beger et al., 2014; Frankham et al., 2004). A mutação é a principal origem de toda a diversidade genética a longo prazo, uma vez que a curto prazo as taxas de mutação são normalmente muito baixas (Frankham et al., 2004). A existência de migração, por seu lado, contribui para a redução das diferenças genéticas entre populações mas pode ser um importante fonte de diversidade para a população recetora (Frankham et al., 2004). Por último, a seleção natural é o único método evolutivo que melhora a aptidão das populações no seu ecossistema (Frankham et al., 2004). No entanto, nas populações pequenas, a seleção natural pode não ter tempo de atuar uma vez que eventos estocásticos podem facilmente induzir perturbações drásticas das frequências alélicas que se traduzem numa rápida perda de diversidade genética (Frankham et al., 2004) e, consequentemente, numa diminuição da aptidão e da taxa de sobrevivência destas populações.

Genética em populações pequenas ou em declínio

Populações pequenas ou em declínio devem ser consideradas com especial atenção em termos conservacionistas uma vez que sofrem perdas mais acentuadas de diversidade genética por deriva genética e endogamia que, conseqüentemente, resultam na diminuição da aptidão reprodutiva e da capacidade de sobrevivência a mudanças ambientais (Bijlsma & Loeschke, 2012; Frankham et al., 2004). Isto significa que estas populações estão em maior risco de extinção do que populações com maiores efetivos populacionais.

A conservação de populações de pequena dimensão pode ser considerada um desafio, especialmente quando estão isoladas de populações vizinhas (Ackiss et al., 2021) ou, no caso de populações de organismos aquáticos fluviais, quando estão bastante fragmentadas. Este isolamento leva a que estas populações sejam mais suscetíveis a modificações no habitat e a variações ambientais (Ackiss et al., 2021). Por exemplo, em climas mediterrâneos, os cursos de água doce sofrem uma drástica modificação no verão, por vezes com seca total de grandes troços, e as populações dulciaquícolas são obrigadas a sobreviver em pequenos pegos, ficando fragmentadas e isoladas até à época das chuvas que restabelece a conectividade hídrica.

A redução do número de indivíduos numa população pode ser identificada como um *bottleneck* ou efeito gargalo. Os efeitos gargalo resultam em maiores taxas de endogamia, menor aptidão reprodutiva, menor diversidade genética e uma capacidade de evolução comprometida, tornando as populações pequenas mais vulneráveis à extinção (Frankham et al., 2004; Harmon & Braude, 2010). A fragmentação dos habitats fluviais, por exemplo, é uma das causas que pode levar à redução drástica dos efetivos populacionais e, conseqüentemente, à redução da diversidade genética das populações, sendo o seu efeito cíclico nos rios de regime Mediterrânico onde o regime de seca estival é também ele cíclico e cada vez mais marcado. As populações fragmentadas ficam mais vulneráveis a fatores de pressão estocásticos e acabam por enfrentar ameaças à sua diversidade genética (Blomqvist et al., 2010; Hinkson & Richter, 2016). Por terem um número restrito de indivíduos, ficam igualmente mais vulneráveis à endogamia (ameaça mais imediata), mais sujeitos à perda de variabilidade genética para responderem a variações ambientais e é esperado que exista um acumular de mutações desfavoráveis uma vez que a seleção natural é menos eficiente em pequenas populações (Blomqvist et al., 2010; Hinkson & Richter, 2016).

A deriva genética também afeta estas populações e irá fazer com que a frequência de alelos varie de uma forma mais marcada, com maior probabilidade de perda e fixação aleatória de alelos, e que a homozigotia aumente (Bijlsma & Loeschcke, 2012). A probabilidade de um alelo se fixar na população é maior quanto maior for a sua frequência inicial, ou seja, alelos raros têm menor probabilidade de se fixarem nas populações pequenas e serão os primeiros a desaparecerem (Bijlsma & Loeschcke, 2012). Uma vez que normalmente os alelos raros representam aqueles que conferem ao organismo a resistência ao stress, as populações pequenas irão facilmente perder a capacidade de se adaptarem a mudanças no ambiente e de sobreviverem a momentos de stress (Bijlsma & Loeschcke, 2012).

Genética da paisagem

A genética da paisagem (*Landscape Genetics*) é uma área de investigação que junta o estudo da genética de populações, ecologia das paisagens, geografia e estatística espaciais (Anderson et al., 2010; Balkenhol, Gugerli, et al., 2009; Bowman et al., 2016). Esta área pretende entender como é que as características da paisagem podem afetar os processos de microevolução das espécies, incluindo o fluxo e a deriva genética (Anderson et al., 2010; Balkenhol, Gugerli, et al., 2009; Balkenhol, Waits, et al., 2009; Bowman et al., 2016). A genética de paisagem também tenta perceber como é que as modificações antropogénicas nas características naturais dos sistemas pode afetar a conectividade genética entre as populações e os padrões espaciais de variação genética (Davis et al., 2015; Lean et al., 2017). De um modo geral, esta área de genética permite avaliar a conectividade funcional caracterizada pela dispersão e pelo fluxo genético, e pela conectividade estrutural, ou seja, a distância que existe entre habitats diferentes e entre manchas de habitat (Lean et al., 2017).

O investimento nesta área de estudo é bastante importante para avaliar questões de conectividade em larga escala, uma vez que os ecossistemas estão a enfrentar mudanças climáticas, existindo uma aceleração na perda e degradação de habitat (Balkenhol, Gugerli, et al., 2009; Bowman et al., 2016). Além disso, e uma vez que os ecossistemas não são homogêneos, esta área de investigação consegue contribuir para o estudo da genética de populações demonstrando como é que as paisagens complexas podem afetar a conectividade das populações e, assim, afetar os padrões genéticos (Balkenhol, Gugerli, et al., 2009; Balkenhol, Waits, et al., 2009). É ainda considerada adequada para estudar quais os mecanismos de especiação que levam à formação de uma nova espécie quando existe uma separação, por

barreiras intransponíveis, de uma população e o seu fluxo de genes é reduzido (Balkenhol, Gugerli, et al., 2009).

Os ecossistemas dulciaquícolas podem ser considerados bons modelos para estudos de genética da paisagem, em comparação com os ecossistemas terrestres e marinhos, uma vez que a dispersão das espécies estritamente de água doce está restrita à rede fluvial, permitindo uma mais fácil caracterização de corredores de dispersão e das características de habitat associadas aos mesmos (Lean et al., 2017). Nestes ecossistemas, para além da ação humana na fragmentação dos ambientes de água doce, também existem barreiras físicas naturais que fragmentam estes habitats, como é o caso das montanhas, quedas de água e cascatas (Lean et al., 2017; Leclerc et al., 2008). No caso de espécies com pouca capacidade de dispersão, estas fragmentações não permitem a migração entre manchas de habitat, resultando em reduções demográficas e até em extinções locais, especialmente se além da fragmentação existir perda e degradação de habitat (Lean et al., 2017).

Finalmente, a genética da paisagem também pode ser utilizada para estudar o potencial adaptativo e evolutivo das populações, analisando a sua variação espacial (Balkenhol, Gugerli, et al., 2009; Lean et al., 2017). Uma vez que as paisagens estão a ficar cada vez mais fragmentadas, levando ao isolamento de populações, o estudo da genética da paisagem é uma mais-valia para a implementação de medidas de conservação que permitam a existência de fluxo genético entre os habitats fragmentados para que se possa manter ou maximizar a diversidade genética global da população (Davis et al., 2015).

Colonização da Península Ibérica por peixes estritamente dulciaquícolas

A Península Ibérica é uma região com bastantes endemismos no que diz respeito a espécies piscícolas de água doce. O número de espécies endémicas é elevado nesta região pois a Península Ibérica tem um efeito insular na ictiofauna continental (Doadrio et al., 2011; Levy et al., 2009; Sousa-Santos et al., 2007). Isto significa que a ictiofauna continental ibérica, ao contrário do que acontece com outros vertebrados e invertebrados, é incapaz de atravessar de forma ativa barreiras geográficas como é o caso dos Pirenéus e do Estreito de Gibraltar (Doadrio et al., 2011). Esta ictiofauna terá surgido, por isso, antes da formação destas e de outras barreiras (ou pelo menos antes destas se terem tornado intransponíveis), sendo o resultado de uma fauna original antiga e isolada no território (Doadrio et al., 2011).

As famílias mais representativas de peixes estritamente dulciaquícolas da Península Ibérica são as dos ciprinídeos e leuciscídeos (Collares-Pereira et al., 2021; Schönhuth et al., 2018). Estes peixes serão originários do leste asiático e terão chegado à Europa quando se ergueram os Montes Urais, que fecharam o Mar Obi que unia o Atlântico e o Mediterrâneo há cerca de 37 milhões de anos (Doadrio et al., 2011; Popov et al., 2004; Zardoya & Doadrio, 1999). Depois de colonizarem a Europa, os ciprinídeos e leuciscídeos terão chegado à Península Ibérica antes da elevação total dos Pirenéus, no Oligoceno, e depois do fecho do Mar Turgai (Doadrio et al., 2011; Popov et al., 2004). Ainda assim, a ictiofauna continental ibérica foi afetada pelo último máximo glacial, no Pleistoceno Superior (há 23 – 18 mil anos) (Doadrio et al., 2011; Levy et al., 2009). Nesta altura, a fauna “mais antiga” refugiou-se nas penínsulas da Itália, Ibérica e Balcãs que funcionaram como uma “bolsa de sobrevivência” para várias espécies, além das dulciaquícolas. Por este motivo, a ictiofauna ibérica é mais semelhante à dos países mediterrâneos do que à da Europa Central, que apresenta uma fauna “mais recente” em resultado de uma recolonização após a época glacial (Abellán & Svenning, 2014; Doadrio et al., 2011).

A evolução dos peixes estritamente dulciaquícolas na Península Ibérica terá sido fortemente influenciada pelo isolamento de diferentes linhagens neste território, após a elevação completa dos Pirenéus e da interrupção dos contactos com o norte de África, e também pelas alterações paleogeomorfológicas que a rede hidrográfica ibérica sofreu. Com efeito, a rede hidrográfica da Península Ibérica sofreu alterações ao longo do tempo e a configuração atual é muito recente, datando do final do Plioceno / início do Pleistoceno (2,5-1,8 milhões de anos) (Casas-Sainz & de Vicente, 2009; Pais et al., 2012). Antes desta configuração, no Mioceno, a Península Ibérica era constituída por grandes lagos endorreicos, ou seja, lagos interiores que não escoavam para o mar (Doadrio & Carmona, 2003; Filipe et al., 2009; Perea et al., 2010, 2016). Entre o Mioceno Superior e o Plioceno deu-se a separação das bacias hidrográficas do Norte e do Sul devido à formação do Maciço Central Ibérico (Andeweg et al., 1999; Casas-Sainz & de Vicente, 2009). Esta rede hidrográfica só passou a ter sistemas exorreicos (com drenagem para o mar) devido à conjugação de eventos tectónicos e orogénicos com alterações climáticas (passagem para um clima mais pluvioso) que potenciaram a ação da erosão regressiva (erosão de jusante para montante), com formação e aprofundamento de vales fluviais e captura de bacias endorreicas por rios costeiros (Cunha & Martins, 2004; Casas-Sainz & de Vicente, 2009; Pais et al., 2012).

O isolamento das linhagens ancestrais de peixes em bacias endorreicas e a sua posterior dispersão para diferentes regiões, à medida que a rede hidrológica exorreica se ia formando, terá provocado diferenciação e especiação das populações ictiofaunísticas, como tem sido demonstrado em diversos estudos filogeográficos (Brito et al., 1997; Casal-López et al., 2018; Doadrio et al., 2011; Doadrio & Carmona, 2003; Perea et al., 2020, 2021; Sousa-Santos et al., 2014, 2016, 2019).

A evolução tectónica no Mesozoico e no Terciário condicionou a topografia da placa ibérica, alterando a disposição das bacias existentes (Casas-Sainz & de Vicente, 2009). A convergência e colisão África – Ibérica – Europa originou o aparecimento dos Pirenéus, da Cadeia Ibérica, do Sistema Central e de outras cadeias de menores dimensões (Casas-Sainz & de Vicente, 2009). Em Portugal existiram três bacias endorreicas mais expressivas durante o Cenozoico: Douro-Oeste, Lusitânica (Mondego) e Alvalade (Tejo inferior e Sado) (Pais et al., 2012). Estas bacias foram influenciadas pelo aparecimento de cadeias montanhosas, condicionando a evolução dos rios e, conseqüentemente, das espécies ancestrais aí presentes (Sousa-Santos et al., 2019). A paleobacia do Douro foi influenciada pela orogenia da cordilheira do Sistema Central (Pais, 2012; Sousa-Santos et al., 2019) e tornou-se exorreica apenas muito recentemente, no Pleistoceno, por erosão regressiva de uma pequena drenagem atlântica para oeste, em direção ao sistema de falhas de Vilariça (Sousa-Santos et al., 2019). No caso da paleobacia Lusitânica (Mondego), esta foi influenciada pela evolução da Serra da Estrela que influenciou a configuração atual dos rios desta bacia (Mora & Vieira, 2020). Por último, a paleobacia de Alvalade está relacionada com a compressão dos Pirenéus, sendo que o seu preenchimento sedimentar terá tido início no Eoceno Médio e a sua transição para a sua incisão fluvial existente terá ocorrido no final do Gelasiano (Pais, 2012). Esta bacia passou a exorreica ainda antes da ligação aos troços médio e superior do atual Tejo, situação que só ocorreu muito mais recentemente, no Pleistoceno (Sousa-Santos et al., 2019).

A Serra de Candeeiros, de idade Jurássica, terá tido igualmente importância, dada a sua localização no centro de Portugal, na evolução dos percursos dos rios atuais da região, mais concretamente na definição dos limites atuais das bacias hidrográficas do Mondego, Oeste e Tejo (J. P. Carvalho et al., 2005).

Maciço Calcário Estremenho e Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros

O Maciço Calcário Estremenho (MCE) teve a sua origem no Jurássico Médio e é uma unidade geomorfológica que está elevada acima da Bacia do Tejo e da de Ourém e da Plataforma Litoral (J. Carvalho et al., 2011; S. L. dos Santos, 2019). Existem 3 regiões elevadas bem definidas que compõem este maciço: Serra de Candeeiros, Planalto de Santo António e o Planalto de São Mamede e, por fim, a Serra de Aire (J. Carvalho et al., 2011). Estas 3 regiões estão separadas pelos sulcos tectónicos Rio Maior – Porto de Mós e Porto de Mós – Moitas Vendas que criaram, respetivamente, a depressão Mendiga e a Alvados e Mindes associadas a acidentes tectónicos (J. Carvalho et al., 2011; Peyroteo et al., 2015) (Figura 11).



Figura A1 - Localização do MCE (delimitado pelo tracejado preto) (Carvalho et al., 2011).

O MCE está, em parte, abrangido pelo Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros (PNSAC) criado em 1979 (S. L. dos Santos, 2019; Marques, 2010). O PNSAC insere-se no SIC Serra de Aire e Candeeiros estando localizado numa zona de transição entre a Estremadura e o Ribatejo e abrangendo os concelhos de Alcobaca e Porto de Mós no distrito de Leiria e os de Alcanena, Rio Maior, Santarém, Torres Novas e Ourém no distrito de Santarém, perfazendo um total de 38162 hectares (S. L. dos Santos, 2019; Marques, 2010). A criação deste parque

natural deve-se ao interesse geológico nas extensões dos afloramentos calcários do MCE que são considerados dos mais significativos do país, acabando por atribuir a este local uma individualidade geológica e geográfica muito própria e importante (Marques, 2010).

O sistema aquífero deste maciço calcário é dominado pela drenagem subterrânea, apresentando uma drenagem superficial praticamente nula devido à natureza carbonatada do maciço (J. Carvalho et al., 2011; S. L. dos Santos, 2019). Este sistema é considerado uma das principais reservas subterrâneas de Portugal que tem bastante importância no abastecimento de água regional e é um centro de irradiação de diversos cursos de água superficiais das bacias do Tejo, Lis e Ribeiras do Oeste (J. Carvalho et al., 2011; S. L. dos Santos, 2019; Peyroteo et al., 2015). As áreas delimitantes deste sistema estão fora dos limites do MCE estendendo-se a sul e a este pelas formações do MCE sobre a Bacia Terciária do Tejo e a oeste inclui a Plataforma de Aljubarrota estendendo-se até à nascente de Chiqueda (Rio Alcoa) (J. Carvalho et al., 2011; S. L. dos Santos, 2019). Das 5 nascentes perenes do MCE, a nascente de Alviela é considerada a mais importante estando situada entre a rocha calcária do MCE e o arenito da Bacia Terciária do Baixo Tejo (S. L. dos Santos, 2019).

Anexo II – Suplementos

A. Materiais e métodos



Figura A2 - Nascente do Alcoa.



Figura A3 - Nascente do Lena.



Figura A5 - Nascente de Almonda.



Figura A6 - Nascente do Alviela.



Figura A4 - Nascente do Alcobertas.



Figura A7 - Nascente do Lis.



Figura A8 - Recolha das amostras com recurso à pesca elétrica.



Figura A9 - Corte da barbatana dorsal para genética.

Tabela A1 - Coordenadas dos locais amostrados neste estudo (excluindo sequências da base de dados do MARE-ISPA).

Bacia / Sub-bacia	Ponto de amostragem	Latitude	Longitude
Alcoa / Alcoa	Alcoa nascente	39°32'13.41"N	8°56'47.88"W
	Alcobaça	39°33'10.00"N	8°58'46.04"W
	Valado dos Frades	39°34'1.00"N	8°59'20.50"W
Lis / Lis	Lis nascente	39°41'8.26"N	8°46'17.62"W
	Leiria	39°44'23.92"N	8°48'0.98"W
	Lena	39°34'57.69"N	8°49'8.59"W
	Sirol	39°45'16.40"N	8°46'4.59"W
	Bajouca	39°53'58.86"N	8°47'57.26"W
	Carreira	39°52'13.37"N	8°51'14.47"W
Tejo / Maior	Alcobertas	39°25'15.59"N	8°54'14.41"W
	Rio Maior	39°20'40.41"N	8°57'59.64"W
Tejo / Almonda	Ruiva	39°29'29.76"N	8°34'32.88"W
	Torres Novas	39°28'35.40"N	8°32'11.76"W
	Alvorão	39°29'55.68"N	8°32'47.04"W
Tejo / Alviela	Alviela nascente	39°26'38.27"N	8°42'37.43"W

Tabela A2- N° de seqüências utilizadas (os números entre parêntesis representam o n° de seqüências obtidas nas nascentes do MCE no âmbito deste trabalho).

Bacia	Sub-bacias	<i>A. oligolepis</i>		<i>S. pyrenaicus</i>	
Bacias em estudo					
		Citocromo <i>b</i>	Beta-actina	Citocromo <i>b</i>	Beta-actina
Alcoa	Alcoa	32 (7)	64 (24)		
Lis	Lis	66 (19)	104 (42)		
Tejo	Alviela			17 (17)	38 (38)
	Almonda			27 (6)	34 (10)
	Maior			29 (15)	58 (30)
Bacias vizinhas					
Tejo	Almonda	25	38		
	Alviela	2	4		
	Nabão	32	44		
Mondego	Alva	20	20		
	Arunca	28	44		
	Ceira	17	6		
	Corvo	17	6		
	Dão	19			
	Mortágua	20			
Ribeiras do Oeste	Real	20	16		
	Tornada	10	14		
	São Pedro	16			
Lis	Lis			36	
Tejo	Canha			6	12
	Aravil			6	4
	Erges			15	22
	Figueiró			20	38
	Grande Pipa			20	24
	Muge			15	14
	Nabão			6	6
	Ocreza			8	6
	Ota			20	
	Ponsul			17	
	Sertã			7	12
	Sever			15	28
	Total	325	360	264	296

Tabela A3 - Condições *PCR* e sequência de *primers* utilizados.

Gene	Forward / Reverse	Nome primer	Sequência do primer	Condições PCR
Citocromo <i>b</i>	Forward	LCB1	5'ACTTGAAGAACCACCGTTG3'	1. 94 °C – 3min 2. 35 ciclos: 94 °C – 1min + 50 °C – 1min 30s + 72°C – 1min 30s 3. 72°C – 10 min
	Reverse	HA	5'CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC3'	
Beta - actina	Forward	BactFor	5'ATGGATGATGAAATTGCCGC3'	1. 94 °C – 3min 2. 35 ciclos: 94 °C – 1min + 55 °C – 1min + 72°C – 1min 30s 3. 72°C – 10 min
	Reverse	BactRev	5'AGGATCTTCATGAGGTAGTC3'	
COI	Forward	LCO1490	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'	1. 94 °C – 3min 2. 40 ciclos: 94 °C – 30s + 50 °C – 30s + 72°C – 1min 3. 72°C – 10 min
	Reverse	HCO2198	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'	

Tabela A4 - *Accession numbers*, espécie, localização e coordenadas das sequências utilizadas na análise dos gastrópodes.

<i>Accession numbers</i>	Espécie	País	Local	Coordenadas
AY771277	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Túria	39.485900, -0.442300
AY771278	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Anna	39.020340, -0.645450
AY771279	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Buñol	39.418030, -0.800590
AY771296	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Verd	39.136170, -0.525170
MK754594	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Guadiana	37.646573, -7.651702
MK754600	<i>Theodoxus fluviatilis</i>	Portugal	Douro	41.093614, -8.522075
MK754617	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Arroyo de Prado Negro	37.321621, -3.452829
MK754660	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Guadiana	37.806344, -7.632635
MK754661	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Guadiana	37.806344, -7.632635
MK754662	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Guadiana	37.641303, -7.656622
MK754663	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Mondego	40.200487, -8.425247
MK754664	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Mondego	40.200487, -8.425247
MK754665	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Mondego	40.200487, -8.425247
MK754803	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Baleares	39.765972, 2.715336
MK754810	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Baleares	39.765972, 2.715336
MK754813	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Baleares	39.765972, 2.715336
MN657531	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.924064, -1.30014
MN657532	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.924064, -1.30014
MN657533	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.921905, -1.30242
MN657534	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.921905, -1.30242
MN657535	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.920314, -1.302572
MN657536	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.920314, -1.302572
MN657537	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.917863, -1.302667
MN657538	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Jiloca	40.917863, -1.302667
MN657574	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Anços	39.9786, -8.572917
MN657575	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Anços	39.9786, -8.572917
MN657576	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Mijares	40.07415, -0.533917
MN657577	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Mijares	40.07415, -0.533917

MN657578	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Guadiana	37.55525, -7.53345
MN657579	<i>Theodoxus baeticus</i>	Portugal	Guadiana	37.55525, -7.53345
MN657580	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Verd	39.135683, -0.524633
MN657581	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Verd	39.135683, -0.524633
MN657582	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Fuentes de Tubos	37.818867, -2.767683
MN657583	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Palancia	39.877733, -0.501717
MN657584	<i>Theodoxus baeticus</i>	Espanha	Palancia	39.877733, -0.501717
KP242785	<i>Radix balthica</i>	Espanha	Oria	43.270000, -2.030000
KP242855	<i>Radix balthica</i>	Espanha	Sèquia Primera	41.800000, 0.840000
KP242860	<i>Radix balthica</i>	Espanha	Sèquia Primera	41.800000, 0.840000
FJ786477	<i>Oestophora barbula</i>	Espanha	Vilches	-
FJ786476	<i>Oestophora barbula</i>	Espanha	Vilches	-

B. Valores de Fst e respetivos valores de significância

Tabela B 1 - Valores de Fst e respetivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene citocromo *b* obtidas para a espécie-alvo *A. oligolepis* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes)

	Alcoa nascente	Alcobaça	Valado dos Frades	Bajouca	Carreira	Leiria	Lena	Lis Nascente	Sirol
Alcoa nascente	*								
Alcobaça	0,32432 ± 0,0473	*							
Valado dos Frades	0,37838 ± 0,0539	0,16216 ± 0,0353	*						
Bajouca	0,02703 ± 0,0139	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*					
Carreira	0,02703 ± 0,0139	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,40541 ± 0,0493	*				
Leiria	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,52252 ± 0,0425	0,27027 ± 0,0407	*			
Lena	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,23423 ± 0,0309	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	*		
Lis Nascente	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,09910 ± 0,0344	0,09910 ± 0,0252	0,11712 ± 0,0333	0,00000 ± 0,0000	*	
Sirol	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,99099 ± 0,0030	0,99099 ± 0,0030	0,75676 ± 0,0310	0,29730 ± 0,0333	0,25225 ± 0,0353	*

Tabela B2 - Valores de Fst e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene citocromo *b* obtidas para a espécie alvo *A. oligolepis* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alcoa	Lis	Dão	Alva	Arunca	Ceira	Corvo	Mortágua	Almonda	Alviela	Nabão	Real	São Pedro	Tornada
Alcoa	*													
Lis	0,00000 ± 0,0000	*												
Dão	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*											
Alva	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*										
Arunca	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0194	0,00000 ± 0,0000	*									
Ceira	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*								
Corvo	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*							
Mortágua	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*						
Almonda	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*					
Alviela	0,99099 ± 0,0030	0,01802± 0,0121	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00901 ± 0,0091	0,02703 ± 0,0139	0,02703 ± 0,0139	0,01802 ± 0,0121	0,01802 ± 0,0182	*				
Nabão	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000± 0,0000	*			
Real	0,10811± 0,0264	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,99099 ± 0,0030	0,00000 ± 0,0000	*		
São Pedro	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*	
Tornada	0,27928 ± 0,0566	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,99099 ± 0,0030	0,00000 ± 0,0000	0,42342 ± 0,0636	0,00000 ± 0,0000	*

Tabela B3 - Valores de Fst e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie-alvo *A. oligolepis* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alcoa nascente	Alcobaça	Valado dos Frades	Lis Nascente	Leiria	Lena	Sirol	Bajouca	Carreira
Alcoa nascente	*								
Alcobaça	0,43243 ± 0,0572	*							
Valado dos Frades	0,22523 ± 0,0279	0,21622 ± 0,0364	*						
Lis Nascente	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*					
Leiria	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	*				
Lena	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*			
Sirol	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,10811 ± 0,0326	*		
Bajouca	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,04505 ± 0,0203	0,18018 ± 0,0383	0,06306 ± 0,0305	0,01802 ± 0,0121	0,00000 ± 0,0000	*	
Carreira	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,04505 ± 0,0152	0,01802 ± 0,0121	0,64865 ± 0,0504	0,15315 ± 0,0430	0,22523 ± 0,0244	*

Tabela B4 - Valores de *Fst* e respectivos valores de significância (*p*) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie alvo *A. oligolepis* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alcoa	Lis	Arunca	Ceira	Corvo	Almonda	Alviela	Nabão	Real	São Pedro	Tornada
Alcoa	*										
Lis	0,00000 ± 0,0000	*									
Arunca	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*								
Ceira	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,18018 ± 0,0449	*							
Corvo	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0194	0,18018 ± 0,0407	0,99099 ± 0,0030	*						
Almonda	0,00000 ± 0,0000	0,04505 ± 0,0203	0,01802 ± 0,0121	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*					
Alviela	0,00901 ± 0,0091	0,11712 ± 0,0237	0,19820 ± 0,0297	0,01802 ± 0,0121	0,00901 ± 0,0091	0,02703 ± 0,0139	*				
Nabão	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,36937 ± 0,0515	0,08108 ± 0,0252	0,09009 ± 0,0303	0,05405 ± 0,0278	0,18919 ± 0,0286	*			
Real	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,04505 ± 0,0203	0,01802 ± 0,0121	*		
São Pedro	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,03604 ± 0,0148	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*	
Tornada	0,90991 ± 0,0253	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*

Tabela B5 - Valores de Fst e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene citocromo b obtidas para a espécie-alvo *S. pyrenaicus* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alviela Nascente	Alcobertas	Rio Maior	Alvorão	Ruiva	Torres Novas
Alviela Nascente	*					
Alcobertas	0,00000 ± 0,0000	*				
Rio Maior	0,00000 ± 0,0000	0,07207 ± 0,0264	*			
Alvorão	0,01802 ± 0,0121	0,00901 ± 0,0091	0,03604 ± 0,0201	*		
Ruiva	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,05405 ± 0,0201	0,99099 ± 0,0030	*	
Torres Novas	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,63063 ± 0,0304	0,41441 ± 0,0411	*

Tabela B6 - Valores de Fst e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene citocromo *b* obtidas para a espécie-alvo *S. pyrenaicus* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alviela	Almonda	Maior	Aravil	Canha	Erges	Figueiró	Grande Pipa	Muge	Nabão	Ocreza	Ota	Ponsul	Sertã	Sever	Lis
Alviela	*															
Almonda	0,00000 ± 0,0000	*														
Maior	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*													
Aravil	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*												
Canha	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*											
Erges	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,00901 ± 0,0091	*										
Figueiró	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*									
Grande Pipa	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,07207 ± 0,0227	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*								
Muge	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*							
Nabão	0,00000 ± 0,0000	0,31532 ± 0,0412	0,02707 ± 0,0182	0,19820 ± 0,0424	0,121612 ± 0,0433	0,05405 ± 0,0148	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	0,02703 ± 0,0139	*						
Ocreza	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,02702 ± 0,0139	0,02703 ± 0,0194	0,00000 ± 0,0000	0,32432 ± 0,0364	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	*					
Ota	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	*				
Ponsul	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*			
Sertã	0,00000 ± 0,0000	0,04505 ± 0,0152	0,00901 ± 0,0091	0,35135 ± 0,0515	0,02703 ± 0,0139	0,07207 ± 0,0227	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,03604 ± 0,0201	0,56757 ± 0,0237	0,05405 ± 0,0242	0,02703 ± 0,0194	0,02703 ± 0,0194	*		
Sever	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*	
Lis	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,05405 ± 0,0201	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*

Tabela B7 - Valores de F_{st} e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie-alvo *S. pyrenaicus* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alviela Nascente	Alcobertas	Rio Maior	Alvorão	Ruiva	Torres Novas
Alviela Nascente	*					
Alcobertas	0,00000 ± 0,0000	*				
Rio Maior	0,02703 ± 0,0139	0,06306 ± 0,0139	*			
Alvorão	0,08108 ± 0,0163	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	*		
Ruiva	0,36036 ± 0,0383	0,00000 ± 0,0000	0,09009 ± 0,0271	0,44144 ± 0,0684	*	
Torres Novas	0,09910 ± 0,0316	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,51351 ± 0,0543	0,72973 ± 0,0479	*

Tabela B8 - Valores de Fst e respectivos valores de significância (p) para as comparações entre pares de populações em estudo e das bacias vizinhas, para as sequências do gene beta-actina obtidas para a espécie-alvo *S. pyrenaicus* (a verde estão assinalados os pares significativamente diferentes).

	Alviela	Almonda	Maior	Aravil	Canha	Erges	Figueiró	Grande Pipa	Muge	Nabão	Ocreza	Sertã	Sever
Alviela	*												
Almonda	0,00901 ± 0,0091	*											
Maior	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*										
Aravil	0,08108 ± 0,0212	0,04504 ± 0,0152	0,27928 ± 0,0316	*									
Canha	0,34234 ± 0,0212	0,27027 ± 0,0407	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	*								
Erges	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	*							
Figueiró	0,01802 ± 0,0121	0,29730 ± 0,0430	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,16216 ± 0,0379	0,00000 ± 0,0000	*						
Grande Pipa	0,09009 ± 0,0271	0,19820 ± 0,0402	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,75676 ± 0,0610	0,00000 ± 0,0000	0,17117 ± 0,0417	*					
Muge	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,03604 ± 0,0201	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	*				
Nabão	0,06306 ± 0,0237	0,47748 ± 0,0385	0,01802 ± 0,0121	0,00901 ± 0,0091	0,12613 ± 0,0337	0,03604 ± 0,0148	0,18919 ± 0,0438	0,14414 ± 0,0278	0,00901 ± 0,0091	*			
Ocreza	0,14414 ± 0,0309	0,24324 ± 0,0305	0,09009 ± 0,0332	0,05405 ± 0,0201	0,09009 ± 0,0271	0,62162 ± 0,0394	0,25225 ± 0,0424	0,13514 ± 0,0311	0,00000 ± 0,0000	0,26126 ± 0,0344	*		
Sertã	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00901 ± 0,0091	0,13514 ± 0,0244	0,06306 ± 0,0305	0,01802 ± 0,0121	0,00000 ± 0,0000	0,04505 ± 0,0203	0,059459 ± 0,0454	*	
Sever	0,00901 ± 0,0091	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,01802 ± 0,0121	0,01802 ± 0,0121	0,27928 ± 0,0344	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,02703 ± 0,0139	0,74775 ± 0,0305	0,09910 ± 0,0163	*

Anexo III – Informação sobre as espécies

Espécies de estudo genético

Escalo-do-sul (*Squalius pyrenaicus*, Günther, 1868)

O escalo-do-sul é um leuciscídeo bentónico com um corpo fusiforme que pode atingir os 30 centímetros de comprimento. Apresenta uma coloração prateada com brilhos metálicos, sendo mais escuro no dorso e mais claro na zona ventral (Doadrio et al., 2011; Sánchez-Pérez & Marín, 2021). Em termos de longevidade, acredita-se que possa atingir os oito anos de idade, com os machos a alcançar a maturidade sexual entre os 60-75 mm (2 anos) e as fêmeas entre os 70-100 mm (3 anos) (Fernández-Delgado & Herrera, 1995; Pires et al., 2000; Soriguer, Bravo, et al., 2000).

Em termos de distribuição, é uma espécie endémica do sul da Península Ibérica (Rogado et al., 2005; Sánchez-Pérez & Marín, 2021). Em Portugal, está presente nas grandes bacias do Tejo, Sado e Guadiana, e nas pequenas bacias costeiras da Samarra, Colares, Lizandro, Junqueira e Gilão (Rogado et al., 2005). Pode ser encontrado em rios e ribeiras permanentes e intermitentes, ocorrendo em zonas fluviais pouco profundas, bem oxigenadas, com vegetação aquática e ensombramento (Rogado et al., 2005). O período de reprodução ocorre entre abril e julho e nesta altura os machos apresentam tubérculos nupciais na zona da cabeça (Doadrio et al., 2011; Fernández-Delgado & Herrera, 1995; Pires et al., 2000). Na fase de pré-postura, os machos escavam pequenas depressões no leito do rio, em substrato de cascalho, onde cortejam as fêmeas até que estas depositem os seus ovos (Sousa-Santos et al., 2014).

Esta espécie está especialmente ameaçada pela perda e degradação de habitat e pela introdução de espécies exóticas (Rogado et al., 2005). Nos últimos anos algumas populações terão desaparecido de locais altamente afetados pela exploração dos recursos hídricos, em resultado sobretudo da extração de água e da construção de barragens que reduzem a disponibilidade de habitat, e pela degradação da qualidade da água devido ao aumento da poluição e de descargas não tratadas de saneamento (Doadrio et al., 2011; Sánchez-Pérez & Marín, 2021). A introdução de espécies exóticas também é uma ameaça à sobrevivência da espécie podendo estas tornar-se competidoras, predadoras e/ou transmissoras de doenças

(Collares-Pereira et al., 2021; Doadrio et al., 2011; Rogado et al., 2005). Por último, esta espécie aparenta ter uma maior suscetibilidade a bactérias quando comparada com outras espécies de leuciscídeos (Grilo et al., 2021).



Figura A10 - Exemplar de *S. pyrenaicus*. Foto: C. Sousa-Santos.

Ruivaco (*Achondrostoma oligolepis*, Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat, 2005)

O ruivaco é um leuciscídeo endémico de Portugal que tem como característica principal a coloração avermelhada na base das barbatanas peitorais, pélvicas e anal e que atinge, em média, 18 centímetros de comprimento, apresentando uma linha lateral muito marcada (Robalo et al., 2005; J. Santos et al., 2013; Silva, 2017). Esta espécie tem uma distribuição relativamente alargada, podendo ser encontrada em bacias hidrográficas do norte e centro de Portugal, mais concretamente entre o rio Minho e o rio Real (Collares-Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2005). A longevidade desta espécie ronda os 8 anos de vida, sendo que a maturidade sexual é atingida por volta dos dois anos de idade (Collares-Pereira et al., 2021; J. Santos et al., 2013; Silva, 2017).

O ruivaco habita preferencialmente sistemas de água doce com um fluxo de água moderado ou lento, com substrato arenoso ou composto por cascalho, e abundante vegetação aquática (J. Santos et al., 2004). Em termos de alimentação, pode ser considerada uma espécie generalista que se alimenta do que estiver disponível: detritos orgânicos, material vegetal e invertebrados bentónicos (J. Santos et al., 2013). A sua reprodução ocorre entre abril e junho e é o macho que inicia a aproximação à fêmea dando-lhe toques na cabeça ou na região ventral para que esta desove junto ao substrato (Pereira, 2007; J. Santos et al., 2013). Os ovos são

adesivos, ficando aderentes à vegetação aquática e raízes imersas das árvores ripícolas (Collares-Pereira et al., 2021).



Figura A11 - Exemplar de *A. oligolepis*. Foto: C. Sousa-Santos.

Espécies encontradas nas nascentes

Boga-de-boca-reta (*Pseudochondrostoma polylepis*, Steindachner, 1865)

A boga-de-boca-reta é uma espécie nativa da Península Ibérica que pode atingir os 45 centímetros de comprimento (Collares-Pereira et al., 2021; Ferreira et al., 1999; Torralva & Oliva-Paterna, 1997). Esta espécie pode alcançar 8 a 10 anos de idade, atingindo a maturidade sexual aos 3/4 anos (Doadrio, 2002). A época de desova ocorre na primavera, em locais com fundos de areia e de cascalho, sendo que os machos desenvolvem pequenos tubérculos nupciais por todo o corpo (Doadrio, 2002; Ferreira et al., 1999). É uma migradora potamódroma, ascendendo às cabeceiras dos rios para desovar (Collares-Pereira et al., 2021). A sua alimentação é feita à base de vegetação mas também se alimenta de pequenos invertebrados, como larvas de insetos, e de detritos (Doadrio, 2002; Ferreira et al., 1999). A característica principal desta espécie é a forma reta do lábio inferior que possui uma lâmina córnea bem desenvolvida (Doadrio, 2002; Torralva & Oliva-Paterna, 1997). Esta característica particular permite que os indivíduos raspem algas do substrato para se alimentarem.



Figura A12 - Exemplar de *P. polylepis*. Foto: C. Sousa-Santos.

Boga-portuguesa (*Iberochondrostoma lusitanicum*, Collares-Pereira 1980)

A boga-portuguesa é uma espécie endémica de Portugal e apresenta uma distribuição restrita às bacias do Tejo (apenas sub-bacias do troço inferior), Sado, região Oeste (Lizandro, Samarra, Colares, Caparide, Laje, Barcarena e Jamor) e lagoas costeiras Melides e Albufeira (Collares-Pereira et al., 2021; Robalo et al., 2007). Esta espécie pode atingir os 16 centímetros e os 4 anos de idade (Collares-Pereira et al., 2021). Em relação à sua alimentação, ainda não existem estudos específicos, mas acredita-se que se alimente de zooplâncton, detritos e macroinvertebrados aquáticos (Collares-Pereira et al., 2021). É uma espécie que habita preferencialmente rios pouco profundos, com vegetação aquática, ensombramento nas margens e com uma corrente de velocidade moderada (Mesquita et al., 2001; Robalo et al., 2009). À semelhança da espécie anterior, a boga-portuguesa reproduz-se na primavera, entre abril e maio, agregando-se durante a desova (Robalo et al., 2009). Os ovos desta espécie são também adesivos e ficam “colados” nas rochas e, sobretudo, na vegetação aquática (V. Carvalho et al., 2002; Robalo et al., 2009).



Figura A13 - Exemplar de *I. lusitanicum*. Foto: C. Sousa-Santos

Barbo-comum (*Luciobarbus bocagei*, Steindachner, 1865)

O barbo-comum é uma espécie endémica da Península Ibérica, pertencente à família Cyprinidae, que pode atingir os 100 centímetros de comprimento e os 11 anos (Collares-Pereira et al., 2021; Ferreira et al., 1999; Oliveira et al., 2002). Em Portugal está presente na maioria das bacias do norte e do centro do país (Oliveira et al., 2002), do rio Lima ao rio Sado. Pode ser encontrado em rios com correntes de velocidade média ou lenta mas na época de postura, entre Fevereiro e Junho, prefere locais de correntes mais rápidas (Ferreira et al., 1999) nas cabeiras dos rios, para onde migra se não existirem barreiras intransponíveis à sua deslocação para montante (é, por isso, um migrador potamódromo) (Collares-Pereira et al., 2021). Em termos de alimentação, o barbo-comum é uma espécie generalista alimentando-se tanto de vegetação como de pequenos invertebrados, consoante a disponibilidade alimentar, sendo que os peixes maiores podem chegar a preda outros peixes (Collares-Pereira et al., 2021; Magalhães, 1992). A característica mais evidente nesta espécie são os dois pares de barbilhos existentes na mandíbula superior e que funcionam como órgãos sensoriais para deteção de presas bentónicas (Ignacio, 2002).



Figura A14 - Exemplar de *L. bocagei*. Foto: C. Sousa-Santos

Enguia-europeia (*Anguilla*, Linnaeus, 1758)

A enguia-europeia é uma espécie migradora catádroma que está presente ao longo da costa europeia e norte de África e que apresenta um ciclo de vida grande e complexo (Lozano, 2009). Esta espécie migra de águas doces para o Mar dos Sargãos, no Atlântico Norte (viagem que pode levar entre três a sete anos), onde se reproduz e de onde as larvas iniciam a migração de regresso às águas doces europeias e norte africanas (Bevacqua et al., 2006; Doadrio et al., 2011; Lozano, 2009). Em Portugal, esta espécie está presente em todas as bacias hidrográficas, sendo que na Madeira e nos Açores está presente em números muito reduzidos (DGPA et al., 2008). É uma espécie que pode atingir 1,5 metros de comprimento, contudo, o maior registo é de 1,33 metros e 6,5 quilogramas (Collares-Pereira et al., 2021; Doadrio et al., 2011). Em termos de longevidade, acredita-se que esta espécie possa viver mais de 20 anos (Collares-Pereira et al., 2021). As enguias são fortemente afetadas pela construção de barragens e de outros obstáculos que as impedem de usufruir de todo o comprimento do rio até voltarem a migrar para a reprodução (DGPA et al., 2008) e pela pesca ilegal das suas larvas (“meixão”) quando estas, após atravessarem o Oceano Atlântico, são capturadas nas fozes dos rios onde procuram entrar. Além disso, a destruição e degradação de habitat, a sobrepesca e as alterações climáticas também contribuem para que esta espécie esteja criticamente ameaçada e em constante declínio em toda a Europa (Lozano, 2009).



Figura A15 - Exemplar de *A. anguilla*. Foto: C. Sousa-Santos.

Esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus*, Linnaeus, 1758)

O esgana-gata é uma espécie pertencente à mesma família que os cavalos marinhos (Gasterosteidae) está distribuída pelo hemisfério norte e pensa-se que apresenta dois ecótipos distintos: (1) ecótipo residente, que ocorre vive exclusivamente em água doce; e (2) ecótipo migrador anádromo (Collares-Pereira et al., 2021; Stinson, 1983). A nível morfológico, esta espécie apresenta uma grande variação (incluindo variações na forma das barbatanas) e um tamanho reduzido entre 26 e 100 milímetros (Foster, 1994; Swarup, 1958; Taylor et al., 2005; Walker, 1997). O esgana-gata é um peixe que apresenta três espinhos dorsais e que, em vez de escamas, apresenta placas dorsais e laterais (Doadrio et al., 2011). Reproduz-se maioritariamente entre abril e maio (Kitano et al., 2007; Swarup, 1958) e apresenta dimorfismo sexual: os machos são mais pequenos e com tons avermelhados ou laranja-escuro na zona ventral anterior e os olhos azulados durante o período reprodutor (Collares-Pereira et al., 2021). Os machos reprodutores tornam-se agressivos para conseguirem um território para o acasalamento e para atraírem as fêmeas (Kitano et al., 2007). As fêmeas apenas depositam os ovos e são os machos que constroem os ninhos na vegetação ou detritos lenhosos, que as cortejam, através de uma dança “zigzagueante” e uma elaborada parada nupcial e que apresentam cuidados parentais, protegendo os juvenis, uma vez que as fêmeas são expulsas dos ninhos após a postura (Collares-Pereira et al., 2021; Foster, 1994; Kitano et al., 2007).



Figura A16 - Exemplar de *G. aculeatus*. Foto: C. Sousa-Santos

Verdemã (*Cobitis paludica*, de Buen, 1930)

A verdemã é uma espécie endêmica da Península Ibérica, pertencente à família Cobitidae, que pode atingir os 5 anos de idade e os 15 centímetros de comprimento total (Perdices & Doadrio, 1997; Sánchez-Carmona et al., 2008; Soriguer, Vallespín, et al., 2000). A sua alimentação é principalmente à base de larvas de insetos, algas e detritos que obtém filtrando o substrato (Sánchez-Hernández et al., 2018; Soriguer, Vallespín, et al., 2000). Esta espécie apresenta um comportamento bentônico e pode ser encontrada em rios com uma corrente baixa com substrato arenoso ou de cascalho, para se poder enterrar, e com vegetação aquática (Collares-Pereira et al., 2021; Sánchez-Carmona et al., 2008). A verdemã desova entre maio e julho e os machos maduros apresentam uma lâmina circular com um manúbrio curto, o que permite distinguir os dois sexos (Perdices & Doadrio, 1997). A verdemã pode ser afetada de forma negativa pela extração de materiais dos leitos dos rios e pela pesca ilegal visto que ainda é utilizada como isco vivo para a pesca de outras espécies, incluindo a achigã (Collares-Pereira et al., 2021).



Figura A17 - Exemplar de *C. paludica*. Foto: C. Sousa-Santos

Góbio (*Gobio lozanoi*, Linnaeus, 1758)

O góbio é uma espécie de gobionídeo considerado endêmico da Península Ibérica e do sul de França sendo que a sua distribuição natural é nas bacias do Ebro e Bidosa em Espanha e nas bacias do Andour e Nivelles em França (Collares-Pereira et al., 2021; Doadrio et al., 2011). Em Portugal, terá sido introduzido como isco-vivo para a pesca lúdica e desportiva da truta, estando presente nas bacias do Minho, Lima, Cávado, Ave, Leça, Douro, Vouga, Mondego e Tejo, podendo ser abundante em certos locais acabando por competir com as espécies nativas por habitat (Collares-Pereira et al., 2021). Esta espécie é caracterizada pela sua coloração cinzenta/castanha acima da linha lateral e creme na zona do ventre apresentando seis a nove manchas escuras e arredondadas ao longo da linha lateral possuindo um par de barbilhos junto à boca (Collares-Pereira et al., 2021; Doadrio et al., 2011). Esta espécie pode atingir os 16 cm de comprimento e chegar aos 5 anos de idade (Collares-Pereira et al., 2021; Doadrio et al., 2011). A maturidade sexual é atingida quando têm cerca de 7 cm (cerca de 1 ano) sendo que a reprodução ocorre entre maio e agosto em zonas de corrente moderada e com pouca vegetação para que os oócitos sejam depositados em fundos arenosos (Collares-Pereira et al., 2021; Doadrio et al., 2011).



Figura A18 - Exemplar de *C. paludica*. Foto: C. Sousa-Santos

Gastrópodes

Theodoxus baeticus (Lamarck, 1822)

Theodoxus baeticus é uma espécie de gastrópode de água doce que está distribuída ao longo de toda a Península Ibérica, ilhas Baleares, Sicília, Tunísia e Balcãs, podendo ainda ser encontrada na Ásia mas restrita aos sistemas de drenagem do Golfo de Gökova na Turquia (Sands et al., 2020). Esta espécie apresenta muitas variações morfológicas, podendo ser totalmente negra ou branca com várias linhas paralelas (contínuas, interrompidas ou em ziguezague) de cores variáveis (Gasull, 1969; Martínez-Ortí et al., 2009). É possível encontrar esta espécie em colónias numerosas, normalmente com a mesma coloração, sobre as pedras nos cursos de água limpa e lenta (Gasull, 1969).



Figura A19 - Diversos exemplares com características externas diferentes de *T. baeticus*.

***Radix balthica* (Linnaeus, 1758)**

Radix balthica tem sofrido algumas modificações de nomenclatura e já foi conhecido como *Lymnaea ovata/peregra* e *Radix ovata* (Evanno et al., 2006; Hollander et al., 2017). Esta espécie encontra-se distribuída ao longo da Europa Central e do Norte e pode ser encontrada em vários tipos de corpos de água lênticos, como é o caso das lagoas, lagos e dos rios com caudais lentos (Evanno et al., 2006; Hollander et al., 2017). Em termos de reprodução, é um gastrópode hermafrodita capaz de autofecundação (Hollander et al., 2017; Jarne & Delay, 1990).

Esta espécie apresenta uma forte capacidade de dispersão, o que lhe permite uma colonização rápida de novos locais (Hollander et al., 2017). Para além desta capacidade de colonização, *Radix balthica* também é conhecida por apresentar uma alta plasticidade: pode alterar a expressão de características morfológicas (ex: forma da concha) quando está exposta a estímulos químicos de peixes moluscívoros, desenvolvendo uma concha mais arredondada (Brönmark et al., 2012; Lakowitz et al., 2008).



Figura A20 - Exemplar de *R. balthica*.

Oestophora spp.

O género *Oestophora* encontra-se representado por 10 espécies distribuídas pela Península Ibérica, África do Norte e Açores (Quintana et al., 2006). Após a criação deste género em 1907 por Hesse, Ortiz de Zárate & Ortiz de Zárate, em 1961, dividiram-no em três subgéneros (*Oestophora* s. str., *Suboestophora* e *Gasullia*) que mais tarde passaram a géneros (Prieto, 1986 revisto em Ruiz et al., 2008). Este género é caracterizado por apresentar uma concha com verticilos arredondados, angulares ou em quilha, perístomo refletido e espessado e teleoconcha nervurada (Arrébola et al., 2006).

Na Península Ibérica existem várias espécies deste género: *Oestophora barbula* (Rossmässler, 1838; também conhecida nos Açores), *Oestophora lusitanica* (Pfeiffer, 1841), *Oestophora calpeana* (Morelet, 1854), *Oestophora tartieri* (Morelet, 1854), *Oestophora dorotheae* (Hesse, 1930), *Oestophora silvae* (Ortiz de Zárate, 1962), *Oestophora ortizi* (De Winter & Ripken, 1991) e *Oestophora granesae* (Arrébola, 1998) (Ruiz et al., 2008).



Figura A21 - Exemplar de *Oestophora* spp..

***Physa acuta* (Draparnaud, 1805)**

Physa acuta é uma espécie de gastrópode de água doce encontrada em habitats naturais e artificiais (como rios, lagos, charcos) da América do Norte (Bousset et al., 2004; Lydeard et al., 2016). *P. acuta* é uma espécie invasora na Europa, África, Ásia e Austrália, acreditando-se que terá sido primeiro introduzida em França no século XVIII durante o comércio de algodão com os Estados Unidos da América e que depois se terá dispersado para os restantes locais (Lydeard et al., 2016). Como alguns bons invasores (ex: *Procambarus clarkii*), esta espécie é capaz de sobreviver em condições adversas, como as temperaturas extremas e poluição, tem uma taxa de proliferação elevada e apresenta uma alta capacidade de dispersão (Albrecht et al., 2009; Oscoz et al., 2010).

P. acuta é uma espécie utilizada em aquários e acredita-se que este será o motivo atual para as invasões mais recentes e a uma escala global (Albrecht et al., 2009). Nos habitats exóticos, esta espécie ameaça estufas de plantas comerciais e sistemas de filtração das estações de tratamento de águas (Aditya & Raut, 2002; Albrecht et al., 2009). Acredita-se que esta espécie seja responsável pela diminuição da espécie nativa *Physa fontinalis* em Itália e França (Manganelli et al., 2000; Mouthon & Daufresne, 2010).



Figura A22 - Exemplar de *P. acuta*.

Xeroplexa spp.

O género *Xeroplexa* encontra-se distribuído pelo Mediterrâneo Ocidental, com maior presença no Oriente Ibérico onde são conhecidas muitas espécies (Gasull, 1964; Murelaga et al., 2012). As espécies deste género habitam em locais xerófilos, ou seja, são encontradas em terrenos com pouca pluviosidade (Gasull, 1964; Murelaga et al., 2008, 2012) e, em Portugal, foram primeiramente descritas nas colinas costeiras de Setúbal (Gittenberger, 1985). Este género é caracterizado por ter conchas com periferia fortemente inclinada (Gittenberger, 1985) e por apresentar uma coloração branca com nervuras fortes e as primeiras voltas translúcidas, lisas e de cor branca ou creme (Murelaga et al., 2008).

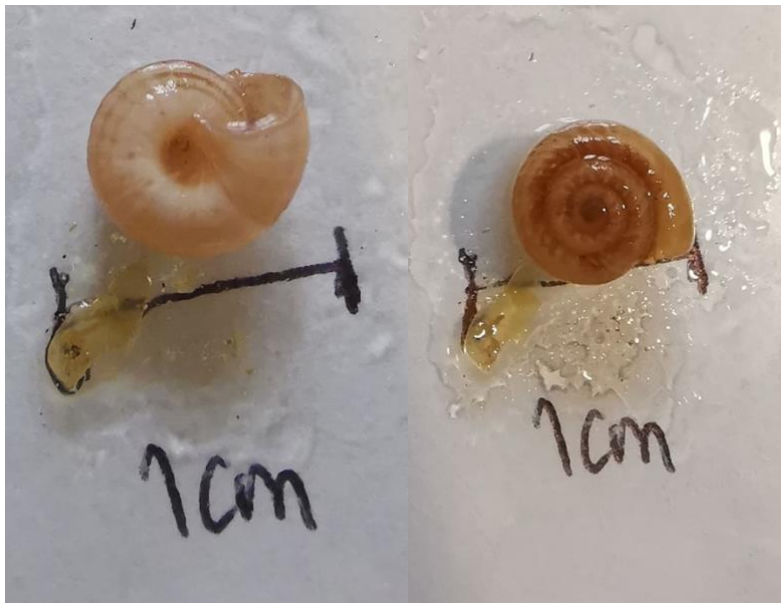


Figura A23 - Exemplar de *Xeroplexa spp.*

Bibliografía

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>
- Abellán, P., & Svenning, J. C. (2014). Refugia within refugia - patterns in endemism and genetic divergence are linked to Late Quaternary climate stability in the Iberian Peninsula. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(1), 13–28. <https://doi.org/10.1111/bij.12309>
- Aboim, M. A., Mesquita, N., Drago, M., Coelho, M. M., & Alves, M. J. (2013). Assessing inter-drainage connections: patterns of genetic diversity in an Iberian cyprinid fish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(3), 656–669. <https://doi.org/10.1111/bij.12059>
- Ackiss, A. S., Magee, M. R., Sass, G. G., Turnquist, K., McIntyre, P. B., & Larson, W. A. (2021). Genomic and environmental influences on resilience in a cold-water fish near the edge of its range. *Evolutionary Applications*, 14(12), 2794–2814. <https://doi.org/10.1111/eva.13313>
- Acuña, V., Muñoz, I., Giorgi, A., Omella, M., Sabater, F., & Sabater, S. (2005). Drought and postdrought recovery cycles in an intermittent Mediterranean stream: Structural and functional aspects. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(4), 919–933. <https://doi.org/10.1899/04-078.1>
- Aditya, G., & Raut, S. (2002). Predation Potential of the Water Bugs *Sphaerodema rusticum* on the Sewage Snails *Physa acuta*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4), 531–534. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000400015>
- Albrecht, C., Kroll, O., Moreno Terrazas, E., & Wilke, T. (2009). Invasion of ancient Lake Titicaca by the globally invasive *Physa acuta* (Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila). *Biological Invasions*, 11(8), 1821–1826. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9360-9>
- Almeida, P. R., Ferreira, M. T., Ribeiro, F., Quintella, B. R., Mateus, C. S., & Alexandre, C. M. (2019). Capítulo 8: Peixes. In M. J. Feio & V. Ferreira (Eds.), *Rios de Portugal: comunidades, processos e alterações* (pp. 171–202). Imprensa da Universidade de Coimbra. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-1624-7>
- Anderson, C. D., Epperson, B. K., Fortin, M.-J., Holderegger, R., James, P. M. A., Rosenberg, M. S., Scribner, K. T., & Spear, S. (2010). Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Molecular Ecology*, 19(17), 3565–3575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04757.x>
- Andeweg, B., De Vicente, G., Cloetingh, S., Giner, J., & Muñoz Martin, A. (1999). Local stress fields and intraplate deformation of Iberia: Variations in spatial and temporal interplay of regional stress sources. *Tectonophysics*, 305(1–3), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0040-1951\(99\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0040-1951(99)00004-9)
- Ankola, K., Mahadevegowda, L. G., Melichar, T., & Boregowda, M. H. (2020). DNA barcoding. In *Advances in Animal Genomics* (pp. 299–308). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820595-2.00018-7>
- Appleyard, S. A., Lynch, T. P., Green, M. A., & Encinas-Viso, F. (2021). Genetic diversity and restricted genetic connectivity in an endangered marine fish (*Brachionichthys hirsutus*) provides a model for conservation management in related and data-deficient species. *Marine and Freshwater Research*, 72(12), 1735–1745. <https://doi.org/10.1071/MF21169>
- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: A brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9–17.
- Arrébola, J. R., Prieto, C. E., Puente, A. I., & Ruiz, A. (2006). *Hatumia*, a new genus for *Oestophora riffensis* Ortiz de Zárate, 1962, *Oestophora cobosi* Ortiz de Zárate, 1962 and *Hatumia pseudogasulli* n. sp. (Pulmonata: Helicoidea: Trissexodontidae). *Journal of Conchology*, 39(2), 119–134.
- Arthington, A. H., Dulvy, N. K., Gladstone, W., & Winfield, I. J. (2016). Fish conservation in freshwater and marine realms: status, threats and management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26(5), 838–857. <https://doi.org/10.1002/aqc.2712>

- Ascensão, T. (2011). *Dispersão de Lagostins Exóticos (Procambarus clarkii e Pacifastacus leniusculus) na Bacia Hidrográfica do Rio Sabor (NE de Portugal): Avaliação do Impacto Ecológico Dispersão de Lagostins Exóticos (Procambarus clarkii e Pacifastacus leniusculus) na* [Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/6802>
- Baguette, M., Blanchet, S., Legrand, D., Stevens, V. M., & Turlure, C. (2013). Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks. *Biological Reviews*, 88(2), 310–326. <https://doi.org/10.1111/brv.12000>
- Balkenhol, N., Gugerli, F., Cushman, S. A., Waits, L. P., Coulon, A., Arntzen, J. W., Holderegger, R., & Wagner, H. H. (2009). Identifying future research needs in landscape genetics: where to from here? *Landscape Ecology*, 24(4), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s10980-009-9334-z>
- Balkenhol, N., Waits, L. P., & Dezzani, R. J. (2009). Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography*, 32(5), 818–830. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.05807.x>
- Beger, M., Selkoe, K. A., Treml, E., Barber, P. H., Von Der Heyden, S., Crandall, E. D., Toonen, R. J., & Riginos, C. (2014). Evolving coral reef conservation with genetic information. *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 159–185. <https://doi.org/10.5343/bms.2012.1106>
- Bevacqua, D., Melià, P., Crivelli, A. J., De Leo, G. A., & Gatto, M. (2006). Timing and rate of sexual maturation of European eel in brackish and freshwater environments. *Journal of Fish Biology*, 69(sc), 200–208. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01265.x>
- Bijlsma, R., & Loeschke, V. (2012). Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications*, 5(2), 117–129. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00214.x>
- Blomqvist, D., Pauliny, A., Larsson, M., & Flodin, L.-Å. (2010). Trapped in the extinction vortex? Strong genetic effects in a declining vertebrate population. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-33>
- Bolotov, I. N., Aksenova, O. V., Bepalaya, Y. V., Gofarov, M. Y., Kondakov, A. V., Paltser, I. S., Stefansson, A., Travina, O. V., & Vinarski, M. V. (2017). Origin of a divergent mtDNA lineage of a freshwater snail species, *Radix balthica*, in Iceland: cryptic glacial refugia or a postglacial founder event? *Hydrobiologia*, 787(1), 73–98. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2946-9>
- Boussarie, G., Momigliano, P., Robbins, W. D., Bonnin, L., Cornu, J., Fauvelot, C., Kiszka, J. J., Manel, S., Mouillot, D., & Vigliola, L. (2022). Identifying barriers to gene flow and hierarchical conservation units from seascape genomics: a modelling framework applied to a marine predator. *Ecography*. <https://doi.org/10.1111/ecog.06158>
- Bousset, L., Henry, P.-Y., Sourrouille, P., & Jarne, P. (2004). Population biology of the invasive freshwater snail *Physa acuta* approached through genetic markers, ecological characterization and demography. *Molecular Ecology*, 13(7), 2023–2036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02200.x>
- Bowman, J., Greenhorn, J. E., Marrotte, R. R., McKay, M. M., Morris, K. Y., Prentice, M. B., & Wehtje, M. (2016). On applications of landscape genetics. *Conservation Genetics*, 17(4), 753–760. <https://doi.org/10.1007/s10592-016-0834-5>
- Branco, P., Segurado, P., Santos, J. M., Pinheiro, P., & Ferreira, M. T. (2012). Does longitudinal connectivity loss affect the distribution of freshwater fish? *Ecological Engineering*, 48, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.05.008>
- Brito, R. M., Briolay, J., Galtier, N., Bouvet, Y., & Coelho, M. M. (1997). Phylogenetic Relationships within Genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese Fresh Waters, Based on Mitochondrial DNA Cytochrome b Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(3), 435–442. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0429>
- Brönmark, C., Lakowitz, T., Nilsson, P. A., Ahlgren, J., Lennartsdotter, C., & Hollander, J. (2012). Costs of

- Inducible Defence along a Resource Gradient. *PLoS ONE*, 7(1), e30467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030467>
- Bunje, P. M. E., & Lindberg, D. R. (2007). Lineage divergence of a freshwater snail clade associated with post-Tethys marine basin development. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.06.026>
- Burrige, C. P., Craw, D., Jack, D. C., King, T. M., & Waters, J. M. (2008). Does fish ecology predict dispersal across a river drainage divide? *Evolution*, 62(6), 1484–1499. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00377.x>
- Burrige, C. P., Craw, D., & Waters, J. M. (2006). River capture, range expansion and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution*, 60(5), 1038. <https://doi.org/10.1554/05-439.1>
- Caldera, E. J., & Bolnick, D. I. (2008). Effects of colonization history and landscape structure on genetic variation within and among threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations in a single watershed. *Evolutionary Ecology Research*, 10(4), 575–598.
- Carvalho, J., Midões, C., Machado, S., Sampaio, J., Costa, A., & Lisboa, V. (2011). *Maciço Calcário Estremenho*.
- Carvalho, J. P., Matias, H., Torres, L., Manupella, G., Pereira, R., & Mendes-Victor, L. (2005). The structural and sedimentary evolution of the Arruda and Lower Tagus sub-basins, Portugal. *Marine and Petroleum Geology*, 22(3), 427–453. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2004.11.004>
- Carvalho, V., Robalo, J. I., & Almada, V. C. (2002). A description of the reproductive behaviour of the endangered Iberian cyprinid *Chondrostoma lusitanicum* Collares-Pereira 1980 in captivity. *Etologia*, 10–11, 23–25.
- Casal-López, M., Perea, S., Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., Torralva, M., Oliva-Paterna, F. J., & Doadrio, I. (2018). Paleobiogeography of an Iberian endemic species, *Luciobarbus sclateri* (Günther, 1868) (Actinopterygii, Cyprinidae), inferred from mitochondrial and nuclear markers. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56(2), 127–147. <https://doi.org/10.1111/jzs.12192>
- Casas-Sainz, A. M., & de Vicente, G. (2009). On the tectonic origin of Iberian topography. *Tectonophysics*, 474(1–2), 214–235. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2009.01.030>
- Clement, M., Snell, Q., Walke, P., Posada, D., & Crandall, K. (2002). TCS: estimating gene genealogies. *Proceedings 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium*, 7 pp. <https://doi.org/10.1109/IPDPS.2002.1016585>
- Coleman, R. A., Gauffre, B., Pavlova, A., Beheregaray, L. B., Kearns, J., Lyon, J., Sasaki, M., Leblois, R., Sgro, C., & Sunnucks, P. (2018). Artificial barriers prevent genetic recovery of small isolated populations of a low-mobility freshwater fish. *Heredity*, 120(6), 515–532. <https://doi.org/10.1038/s41437-017-0008-3>
- Collares-Pereira, M. J., Alves, M. J., Ribeiro, F., Domingos, I., Almeida, P., 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* (1º). Edições Afrontamento.
- Craw, D., Burrige, C., Anderson, L., & Waters, J. M. (2007). Late Quaternary river drainage and fish evolution, Southland, New Zealand. *Geomorphology*, 84(1–2), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2006.07.008>
- Cunha, P. P., & Martins, A. A. (2004). Principais Aspectos Geomorfológicos De Portugal Central , Sua Relação Com O Registo Sedimentar E a Relevante Importância Do Controlo Tectónico. In *Geomorfologia do Noroeste da Península Ibérica* (pp. 151–178).
- Davis, D. J., Wieman, A. C., & Berendzen, P. B. (2015). The influence of historical and contemporary landscape variables on the spatial genetic structure of the rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) in tributaries of the upper Mississippi River. *Conservation Genetics*, 16(1), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0649-1>
- DGPA, AFN, ICNB, IPIMAR, INAG, & EDP, I. de O. e. (2008). *Plano de Gestão da Enguia 2009-2012: Resposta*

do Estado Português ao Regulamento (CE) nº 1100/2007, de 18 de Setembro. 111.

- Dionne, M., Caron, F., Dodson, J. J., & Bernatchez, L. (2008). Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: The interaction of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, *17*(10), 2382–2396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03771.x>
- Doadrio, I. (2002). *Chondrostoma polylepis* (Steindachner, 1864). In I. Doadrio (Ed.), *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España* (pp. 179–181). Dirección General de Conservación de la Naturaleza Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Doadrio, I., & Carmona, J. A. (2003). Testing freshwater Lago Mare dispersal theory on the phylogeny relationships of Iberian cyprinid genera *Chondrostoma* and *Squalius* (Cypriniformes, Cyprinidae). *Graellsia*, *59*(2–3), 457–473. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.260>
- Doadrio, I., Perea, S., Garzón-Heydt, P., & González, J. . (2011). *Ictiofauna continental española. Bases para su seguimiento*. DG Medio Natural y Política Forestal. MARM. https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/01_ictiofauna_tcm30-208043.pdf
- dos Santos, S. L. (2019). *Análise da distribuição e requisitos ecológicos de Arabis sadina no Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros*. Universidade de Aveiro.
- Evanno, G., Castella, E., & Goudet, J. (2006). Evolutionary aspects of population structure for molecular and quantitative traits in the freshwater snail *Radix balthica*. *Journal of Evolutionary Biology*, *19*(4), 1071–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01098.x>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fernández-Delgado, C., & Herrera, M. (1995). Age structure, growth and reproduction of *Leuciscus pyrenaicus* in an intermittent stream in the Guadalquivir river basin, southern Spain. *Journal of Fish Biology*, *46*(3), 371–380. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb05977.x>
- Ferreira, A. P., Teresa Ferreira, M., & Oliveira, J. M. (1999). Contribuição para o estudo da idade e crescimento do barbo (*Barbus bocagei*, Steindachner, 1865) e da boga (*Chondrostoma polylepis*, Steindachner, 1865) no rio Mondego. *Anais Do Instituto Superior de Agronomia*, *47*(January), 153–186.
- Filipe, A. F., Araújo, M. B., Doadrio, I., Angermeier, P. L., & Collares-Pereira, M. J. (2009). Biogeography of Iberian freshwater fishes revisited: The roles of historical versus contemporary constraints. *Journal of Biogeography*, *36*(11), 2096–2110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02154.x>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *3*(5), 294–299.
- Foster, S. A. (1994). Inference of evolutionary pattern: diversionary displays of three-spined sticklebacks. *Behavioral Ecology*, *5*(1), 114–121. <https://doi.org/10.1093/beheco/5.1.114>
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). *A Primer of Conservation Genetics* (First). Cambridge University Press.
- Gandra, M., Assis, J., Martins, M. R., & Abecasis, D. (2021). Reduced Global Genetic Differentiation of Exploited Marine Fish Species. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(4), 1402–1412. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa299>
- Gasull, L. (1964). Las *Helicella* (Xeroplexa) de Baleares. *Gastropoda Pulmonata*. *Bolletí de La Societat d'Història Natural de Les Balears*, *10*(10), 3–88.
- Gasull, L. (1969). Adiciones y rectificaciones a la fauna malacológica terrestre y de agua dulce de las Baleares. *Bolletí de La Societat d'Història Natural de Les Balears*, *15*(15), 59–73.

- Gittenberger, E. (1985). The taxonomic status of *Xeroplexa Monterosato*, 1892 (Pulmonata: Helicidae: Halicellinae), a surprise. *Iberus*, 1892, 59–62.
- Grilo, M. L., Chambel, L., Marques, T. A., Sousa-Santos, C., Robalo, J. I., & Oliveira, M. (2021). Sympatric threatened Iberian leuciscids exhibit differences in *Aeromonas* diversity and skin lesions' prevalence. *PLOS ONE*, 16(8), e0255850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255850>
- Harmon, L. J., & Braude, S. (2010). Conservation of Small Populations: Effective Population Sizes, Inbreeding, and the 50/500 Rule. *An Introduction to Methods and Models in Ecology, Evolution, and Conservation Biology*, 125–138.
- Hinkson, K. M., & Richter, S. C. (2016). Temporal trends in genetic data and effective population size support efficacy of management practices in critically endangered dusky gopher frogs (*Lithobates sevosus*). *Ecology and Evolution*, 6(9), 2667–2678. <https://doi.org/10.1002/ece3.2084>
- Hollander, J., Ahlgren, J., & Brönmark, C. (2017). Rates of gene flow in a freshwater snail and the evolution of phenotypic plasticity. *Biological Journal of the Linnean Society*, 121(4), 764–770. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx028>
- Hughes, J. M., Huey, J. A., & Schmidt, D. J. (2013). Is realised connectivity among populations of aquatic fauna predictable from potential connectivity? *Freshwater Biology*, 58(5), 951–966. <https://doi.org/10.1111/fwb.12099>
- Hughes, J. M., Schmidt, D. J., & Finn, D. S. (2009). Genes in Streams: Using DNA to Understand the Movement of Freshwater Fauna and Their Riverine Habitat. *BioScience*, 59(7), 573–583. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.7.8>
- Ignacio. (2002). *Barbus bocagei* (Steindachner, 1864). In I. Doadrio (Ed.), *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España* (pp. 144–146). Dirección General de Conservación de la Naturaleza Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Jarne, P., & Delay, B. (1990). Inbreeding depression and self-fertilization in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). *Heredity*, 64(2), 169–175. <https://doi.org/10.1038/hdy.1990.21>
- Junge, C., Donnellan, S. C., Huveneers, C., Bradshaw, C. J. A., Simon, A., Drew, M., Duffy, C., Johnson, G., Cliff, G., Braccini, M., Cutmore, S. C., Butcher, P., McAuley, R., Peddemors, V., Rogers, P., & Gillanders, B. M. (2019). Comparative population genomics confirms little population structure in two commercially targeted carcharhinid sharks. *Marine Biology*, 166(2), 16. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3454-4>
- Kats, L. B., Bucciarelli, G., Vandergon, T. L., Honeycutt, R. L., Mattiasen, E., Sanders, A., Riley, S. P. D., Kerby, J. L., & Fisher, R. N. (2013). Effects of natural flooding and manual trapping on the facilitation of invasive crayfish-native amphibian coexistence in a semi-arid perennial stream. *Journal of Arid Environments*, 98, 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.08.003>
- Kitano, J., Mori, S., & Peichel, C. L. (2007). Sexual dimorphism in the external morphology of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Copeia*, 2007(2), 336–349. [https://doi.org/https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2007\)7\[336:SDITEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1643/0045-8511(2007)7[336:SDITEM]2.0.CO;2)
- Lakowitz, T., Brönmark, C., & Nyström, P. (2008). Tuning in to multiple predators: conflicting demands for shell morphology in a freshwater snail. *Freshwater Biology*, 53(11), ???-??? <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02045.x>
- Lean, J., Hammer, M. P., Unmack, P. J., Adams, M., & Beheregaray, L. B. (2017). Landscape genetics informs mesohabitat preference and conservation priorities for a surrogate indicator species in a highly fragmented river system. *Heredity*, 118(4), 374–384. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.111>
- Leclerc, É., Mailhot, Y., Mingelbier, M., & Bernatchez, L. (2008). The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. *Molecular Ecology*, 17(7), 1702–1717. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03710.x>
- Levy, A., Doadrio, I., & Almada, V. C. (2009). Historical biogeography of European leuciscins (Cyprinidae):

- Evaluating the Lago Mare dispersal hypothesis. *Journal of Biogeography*, 36(1), 55–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01969.x>
- Lindenmayer, D., & Burgman, M. (2005). What should be conserved? In D. Lindenmayer & M. Burgman (Eds.), *Practical Conservation Biology* (pp. 27–56). CSIRO PUBLISHING.
- Lozano, C. A. (2009). *Biología y ecología de la anguila (Anguilla anguilla L., 1758) en el estuario del Guadalquivir. Impacto de su pesca*. Universidad de Córdoba.
- Lydeard, C., Campbell, D., & Golz, M. (2016). *Physa acuta* Draparnaud, 1805 Should be Treated as a Native of North America, Not Europe. *Malacologia*, 59(2), 347–350. <https://doi.org/10.4002/040.059.0213>
- Magalhães, M. F. (1992). Feeding ecology of the Iberian cyprinid *Barbus bocagei* Steindachner, 1865 in a lowland river. *Journal of Fish Biology*, 40(1), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02559.x>
- Manganelli, G., Bodon, M., Cianfanelli, S., Favilli, L., & Giusti, F. (2000). Conoscenza e conservazione dei molluschi non marini italiani: lo stato delle ricerche. *Bollettino Malacologico*, 36(1–4), 5–42.
- Marques, J. M. P. T. (2010). *Contributo para a análise da gestão jurídico-administrativa da conservação da natureza em Portugal* [Universidade do Algarve - Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente]. <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/1812/3/3-Tese Impressão.pdf>
- Martínez-Ortí, A., Robles, F., Gómez, B., Bunje, P., & Pujante, A. M. (2009). *Theodoxus baeticus* (Lamarck, 1822). In J. R. Verdú & E. Galante (Eds.), *Atlas de los Invertebrados Amenazados de España (Especies En Peligro Crítico y En Peligro)* (pp. 273–277). Organismo Autónomo Parques Nacionales.
- 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(3), 253–264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00776.x>
- Mora, C., & Vieira, G. (2020). Landscapes and Landforms of Portugal. In G. Vieira, J. L. Zêzere, & C. Mora (Eds.), *World Geomorphological Landscapes*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03641-0>
- Mouthon, J., & Daufresne, M. (2010). Long-term changes in mollusc communities of the Ognon river (France) over a 30-year period. *Fundamental and Applied Limnology*, 178(1), 67–79. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0178-0067>
- Murelaga, X., Larraz, M., Sancho, C., Muñoz, A., & Ortega, L. Á. (2008). Gasterópodos del registro aluvial holoceno en Bardenas Reales de Navarra. *Geogaceta*, 44, 127–130.
- Murelaga, X., Ortega, L., Sancho, C., Muñoz, A., Osácar, C., & Larraz, M. (2012). Succession and stable isotope composition of gastropods in Holocene semi-arid alluvial sequences (Bardenas Reales, Ebro Basin, NE Spain): Palaeoenvironmental implications. *The Holocene*, 22(9), 1047–1060. <https://doi.org/10.1177/0959683612437869>
- Oliveira, J. M., Ferreira, A. P., & Ferreira, M. T. (2002). Intrabasin variations in age and growth of *Barbus bocagei* populations. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(3), 134–139. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00333.x>
- Oscóz, J., Tomás, P., & Durán, C. (2010). Review and new records of non-indigenous freshwater invertebrates in the Ebro River basin (Northeast Spain). *Aquatic Invasions*, 5(3), 263–284. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.3.04>
- Pais, J. (2012). *The Paleogene and Neogene of Western Iberia (Portugal)*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22401-0>
- 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. In *The Paleogene and Neogene of Western Iberia (Portugal)* (pp. 1–138). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22401-0_1

- Paulson, B. L., & Stockwell, C. A. (2020). Density-Dependent Effects of Invasive Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii* on Experimental Populations of the Amargosa Pupfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 149(1), 84–92. <https://doi.org/10.1002/tafs.10213>
- Perdices, A., & Doadrio, I. (1997). Threatened fishes of the world: *Cobitis paludica* (De Buen, 1930) (Cobitidae). *Environmental Biology of Fishes*, 49(3), 360. <https://doi.org/10.1023/A:1007332011514>
- Perea, S., Böhme, M., Zupančič, P., Freyhof, J., Šanda, R., Özuluğ, M., Abdoli, A., Doadrio, I., 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), 265. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-265>
- Perea, S., Cobo-Simon, M., & Doadrio, I. (2016). Cenozoic tectonic and climatic events in southern Iberian Peninsula: Implications for the evolutionary history of freshwater fish of the genus *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 97, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.01.007>
- Perea, S., Sousa-Santos, C., Robalo, J., & Doadrio, I. (2020). Multilocus phylogeny and systematics of Iberian endemic *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *Zoologica Scripta*, 49(4), 440–457. <https://doi.org/10.1111/zsc.12420>
- Perea, S., Sousa-Santos, C., Robalo, J., & Doadrio, I. (2021). Historical biogeography of the Iberian Peninsula: multilocus phylogeny and ancestral area reconstruction for the freshwater fish genus *Squalius* (Actinopterygii, Leuciscidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(4), 858–886. <https://doi.org/10.1111/jzs.12464>
- Pereira, A. M. (2007). *Estudo comparativo do comportamento reprodutor de espécies do género Achondrostoma (Pisces, Cyprinidae)*. Instituto Superior de Psicologia Aplicada.
- Peyroteo, I., Aires, J., & Guedes, J. (2015). *Sistema aquífero: Maciço Calcário Estremenho Uma abordagem para sua caracterização*. Universidade do Minho.
- Pires, A. M., Cowx, I. G., & Coelho, M. M. (2000). Life history strategy of *Leuciscus pyrenaicus* (Cyprinidae) in intermittent streams of the Guadiana basin (Portugal). *Cybium*, 24(3), 287–297.
- Popov, S. V., Rögl, F., Rozanov, A. Y., Steininger, F. F., Shcherba, I. G., & Kovac, M. (2004). Lithological-paleogeographic maps of paratethys. *CFS Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, 250, 1–46.
- Quintana, J., Vicens, D., & Pons, G. X. (2006). A new species of the genus *Oestophora* Hesse 1907 (Gastropoda: Pulmonata: Helicodontidae) from the Upper Pleistocene of Mallorca (Balearic Islands, Western Mediterranean). *Bolleti de La Societat d'Historia Natural de Les Balears*, 49, 51–58.
- Ramos, A. M. (2008). *O pliocénico e o Plistocénico da Plataforma Litoral entre os paralelos do Cabo de Mendego e da Nazaré*. Universidade de Coimbra - Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Robalo, J. I., Almada, V. C., Sousa-Santos, C., Moreira, M. I., & Doadrio, I. (2005). New species of the genus *Chondrostoma* Agassiz, 1832 (Actynopterigii, Cyprinidae) from western Portugal. *Graellsia*, 61(1), 19–29. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2005.v61.i1.3>
- 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., 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. I., Sousa-Santos, C., Almada, V. C., & Doadrio, I. (2006). Paleobiogeography of Two Iberian Endemic Cyprinid Fishes (*Chondrostoma arcasii*-*Chondrostoma macrolepidotus*) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Data. *Journal of Heredity*, 97(2), 143–149. <https://doi.org/10.1093/jhered/esj025>

- Robalo, J. I., Sousa-Santos, C., Levy, A., & Almada, V. C. (2006). Molecular insights on the taxonomic position of the paternal ancestor of the *Squalius alburnoides* hybridogenetic complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(1), 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.08.009>
- Rodeles, A. A., Galicia, D., & Miranda, R. (2020). Barriers to longitudinal river connectivity: Review of impacts, study methods and management for Iberian fish conservation. *Limnetica*, 39(2), 601–619. <https://doi.org/10.23818/limn.39.39>
- Rogado, L., Alexandrino, P., Almeida, P., Alves, J., Bochechas, J., Cortes, R., Domingos, I., Filipe, F., Madeira, J., & Magalhães, F. (2005). *Squalius pyrenaicus* Escalo do Sul. In M. J. Cabral, A. I. Queiroz, J. Palmeirim, J. Almeida, L. Rogado, M. Santos-Reis, M. E. Oliveira, N. F. de Almeida, P. R. de Almeida, & T. Dellinger (Eds.), *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal* (pp. 97–98). Instituto da Conservação da Natureza.
- Ruiz, A., Arrebola, J. R., & Puente, A. I. (2008). *Oestophora Prietoi* n. sp., *O. mariae* n. sr and *O. ebria* (Corbella, 2004), three *Oestophora hesse* species (stylommatophora, trissexodontidae) from the Iberian peninsula. *Journal of Conchology*, 39(5), 21–32.
- Ruppert, J. L. W., James, P. M. A., Taylor, E. B., Rudolfson, T., Veillard, M., Davis, C. S., Watkinson, D., & Poesch, M. S. (2017). Riverscape genetic structure of a threatened and dispersal limited freshwater species, the Rocky Mountain Sculpin (*Cottus* sp.). *Conservation Genetics*, 18(4), 925–937. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0938-6>
- Sánchez-Carmona, R., Encina, L., Rodríguez-Ruiz, A., & Rodríguez-Sánchez, V. (2008). Age, growth and diet of the Iberian loach, *Cobitis paludica* in two different environments. *Folia Zoologica*, 57(4), 420–434.
- Sánchez-Hernández, J., Vieira-Lanero, R., Barca, S., Silva, S., Lago, L., Gómez, P., Cobo, M. D. C., & Cobo, F. (2018). An update on the distribution of *Cobitis paludica* (De Buen, 1930) in the NW Iberian Peninsula. *Limnetica*, 37(2), 181–185. <https://doi.org/10.23818/limn.37.15>
- Sánchez-Pérez, A., & Marín, J. M. Z. (2021). Cacho - *Squalius pyrenaicus*. In P. López, J. Martín, & M. Torralva (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Sands, A. F., Glöer, P., Gürlek, M. E., Albrecht, C., & Neubauer, T. A. (2020). A revision of the extant species of *Theodoxus* (Gastropoda, Neritidae) in Asia, with the description of three new species. *Zoosystematics and Evolution*, 96(1), 25–66. <https://doi.org/10.3897/zse.96.48312>
- Sands, A. F., Sereda, S. V., Stelbrink, B., Neubauer, T. A., Lazarev, S., Wilke, T., & Albrecht, C. (2019). Contributions of biogeographical functions to species accumulation may change over time in refugial regions. *Journal of Biogeography*, 46(6), 1274–1286. <https://doi.org/10.1111/jbi.13590>
- Santos, J., Encina, L., Oliveira, J. M., & Teixeira, A. (2013). Feeding ecology of the Ruivaco *Achondrostoma oligolepis*, a Portuguese endemic cyprinid fish. *Limnetica*, 32(1), 27–38.
- Santos, J., Godinho, F., Ferreira, M. T., & Cortes, R. (2004). The organisation of fish assemblages in the regulated Lima basin, Northern Portugal. *Limnologia*, 34(3), 224–235. [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(04\)80047-1](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(04)80047-1)
- Schmidt, T. R., & Gold, J. R. (1993). Complete Sequence of the Mitochondrial Cytochrome b Gene in the Cherryfin Shiner, *Lythrurus roseipinnis* (Teleostei: Cyprinidae). *Copeia*, 1993(3), 880. <https://doi.org/10.2307/1447258>
- 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>
- Selkoe, K. A., Scribner, K. T., & Galindo, H. M. (2015). Waterscape Genetics - Applications of Landscape Genetics to Rivers, Lakes, and Seas. *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*, 220–246. <https://doi.org/10.1002/9781118525258.ch13>
- Shelkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2011). Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic

- metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 291–305. <https://doi.org/10.3354/meps09238>
- Silva, S. S. R. da. (2017). *Variabilidade espacial e temporal da capacidade natatória de um ciprinídeo ibérico, o ruivaco, Achondrostoma oligolepis (Robalo, Doadrio, Almada & Kottelat, 2005)*. Universidade de Évora.
- Snyder, R. E., Paris, C. B., & Vaz, A. C. (2014). How Much Do Marine Connectivity Fluctuations Matter? *The American Naturalist*, 184(4), 523–530. <https://doi.org/10.1086/677925>
- Soriguer, M. C., Bravo, R., Vallespín, C., Gómez-Cama, C., & Hernando, J. A. (2000). Reproductive strategies of two species of cyprinids in a stream with Mediterranean regimen (SW Spain). *Archiv Fur Hydrobiologie*, 148(1), 119–134. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/148/2000/119>
- Soriguer, M. C., Vallespín, C., Gomez-Cama, C., & Hernando, J. A. (2000). Age, diet, growth and reproduction of a population of *Cobitis paludica* (de Buen, 1930) in the Palancar Stream (southwest of Europe, Spain) (Pisces: Cobitidae). *Hydrobiologia*, 436, 51–58. <https://doi.org/10.1023/A:1026529720060>
- 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., 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(December 2018), 263–285. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.020>
- Sousa-Santos, C., Robalo, J., & Almada, V. (2014). Spawning behaviour of a threatened Iberian cyprinid and its implications for conservation. *Acta Ethologica*, 17(2), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s10211-014-0185-5>
- 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*, 16(6), 462–467. <https://doi.org/10.1080/10425170500356065>
- 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), e1694. <https://doi.org/10.7717/peerj.1694>
- 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>
- Stinson, E. M. (1983). *Threespine sticklebacks (Gasterosteus aculeatus) in Drizzle Lake and its inlet, Queen Charlotte Islands: ecological and behavioural relationships and their relevance to reproductive isolation*. M. Sc. thesis, Department of Zoology, University of Alberta, E.
- Swarup, H. (1958). Stages in the Development of the Stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Development*, 6(3), 373–383. <https://doi.org/10.1242/dev.6.3.373>
- Taylor, E. B., Boughman, J. W., Groenenboom, M., Sniatynski, M., Schluter, D., & Gow, J. L. (2005). Speciation in reverse: morphological and genetic evidence of the collapse of a three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) species pair. *Molecular Ecology*, 15(2), 343–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02794.x>
- Toonen, R. J., Andrews, K. R., Baums, I. B., Bird, C. E., Concepcion, G. T., Daly-Engel, T. S., Eble, J. A., Faucci, A., Gaither, M. R., Iacchei, M., Puritz, J. B., Schultz, J. K., Skillings, D. J., Timmers, M. A., & Bowen, B. W. (2011). Defining Boundaries for Ecosystem-Based Management: A Multispecies Case Study of Marine Connectivity across the Hawaiian Archipelago. *Journal of Marine Biology*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/460173>
- Torralva, M. M., & Oliva-Paterna, F. J. (1997). First record of *Chondrostoma polyplepis* Steindachner, 1865

(Ostariophysi, Cyprinidae) in the basin of the river Segura, S.E. of Spain | Primera cita de *Chondrostoma polylepis* Steindachner, 1865 (Ostariophysi, Cyprinidae) en la cuenca del río Segura, S.E. . *Limnetica*, 13(1), 1–3.

Walker, J. (1997). Ecological morphology of lacustrine threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. (Gasterosteidae) body shape. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1), 3–50. <https://doi.org/10.1006/bijl.1996.9999>

Washburn, B. A., Cashner, M. F., & Blanton, R. E. (2020). Small fish, large river: Surprisingly minimal genetic structure in a dispersal-limited, habitat specialist fish. *Ecology and Evolution*, 10(4), 2253–2268. <https://doi.org/10.1002/ece3.6064>

Zardoya, R., & Doadrio, I. (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, 49(2), 227–237. <https://doi.org/10.1007/PL00006545>