

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Impactos de *Procambarus clarkii* na comunidade de
macrófitas de charcos temporários mediterrânicos – uma
abordagem experimental**

Bruno Martins Carreira

Mestrado em Biologia da Conservação

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Impactos de *Procambarus clarkii* na comunidade de
macrófitas de charcos temporários mediterrânicos – uma
abordagem experimental**

Bruno Martins Carreira

Dissertação orientada por:

Prof. Doutor Rui Rebelo

Mestrado em Biologia da Conservação

2010

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Financiamento Plurianual da FCT a Rui Rebelo e foi realizado nas instalações da Herdade da Ribeira Abaixo, na Estação de Campo do Centro de Biologia Ambiental.

Agradeço à Prof. Doutora Ana Isabel Correia pela identificação das macrófitas estudadas neste trabalho.

A realização deste projecto envolveu fins-de-semana de trabalho “escravo”, perda de férias de Carnaval e perda de férias semestrais. Agradeço a todos os que me ajudaram, foram muitos e trabalharam harduamente bem sabemos. Sem a ajuda de todos vós este trabalho teria sido impossível, acreditem que não esqueço.

Agradeço aos alunos de Biologia e aos professores que estiveram na herdade pela companhia e pela boa comida.

Ao Fernando, à Luciana e ao João tenho a agradecer não só a companhia, mas também algumas saídas de campo para espairecer.

Um agradecimento especial ao Eng. Carradinha, pela rapidez dos serviços prestados e pela disponibilidade e amabilidade que demonstrou.

Muito obrigado ao professor Rui Rebelo. Aprendi imenso e isso vale muito para mim. Mas mais do que isso, conta a forma exemplar como fui tratado, todo o empenho que teve para garantir a minha segurança e bem-estar, a ajuda indispensável durante o tempo em que estive no campo e o profissionalismo demonstrado.

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos todo o apoio que me deram, não só no tempo em que estive no campo, mas e, principalmente, ao longo destes cinco anos. Não foi fácil, mas está a acabar. Foram vocês que me deram pernas e força para chegar até aqui. Obrigado.

RESUMO

As espécies invasoras são actualmente uma das principais causas de perda de biodiversidade, especialmente nos ecossistemas das zonas húmidas. Os lagostins de água doce encontram-se entre as espécies invasoras com mais impactos em vários níveis tróficos. A importância e a extensão destes impactos têm sido estudadas com experimentação no laboratório e na natureza. As metodologias utilizadas para testar as preferências alimentares são várias e têm por base diferenças no conceito de preferência. Neste trabalho estudaram-se os impactos de *Procambarus clarkii* sobre a comunidade de macrófitas dos charcos temporários mediterrânicos. Fizeram-se testes de palatibilidade e de preferência em laboratório, medindo a biomassa consumida e o número de fragmentos em que as amostras foram fragmentadas para estudar as preferências alimentares de *P. clarkii* sobre cinco espécies de macrófitas comuns no Sudoeste da Península Ibérica. Em charcos naturais fizeram-se experiências de inclusão/exclusão de lagostim, comparando a biomassa, o número de talos e o número de talos flutuantes em áreas delimitadas com e sem lagostim. Os consumos diários observados em laboratório variaram entre 4 e 8 % do peso húmido dos lagostins (correspondendo a 1,17 g de peso fresco), tendo-se registado diferenças entre sexos apenas no total de biomassa consumida no teste de preferência. Foi identificado um consumo diário mínimo de cerca de 2% do peso húmido. Verificou-se uma preferência clara por *J. heterophyllus* e uma rejeição das espécies *C. divisa* e *R. peltatus*. A selectividade demonstrada por *P. clarkii* teve por base várias características das plantas, preferindo as espécie mais filamentosas e com maior peso seco (mais nutritivas) e rejeitando as espécies mais duras ou, possivelmente, que apresentassem metabolitos secundários inibidores de consumo. A comparação entre as duas abordagens demonstrou que esta espécie se apropria de uma porção significativa da produção primária dos charcos temporários, podendo mesmo levar ao desaparecimento completo da vegetação e alterando drasticamente estes ecossistemas.

Palavras-chave: espécie invasora, *Procambarus clarkii*, herbivoria, preferência, macrófitas, charcos temporários Mediterrânicos

ABSTRACT

Invasive species are currently one of the main causes of biodiversity loss, especially in freshwater ecosystems. Crayfish are among the invasive species with most impacts on multiple trophic levels. The importance and extent of these impacts have been studied by experimenting in the laboratory and in nature. The methods used to test food preferences are varied, depending of differences in the concept of preference. In this work we studied the impact of *Procambarus clarkii* on the macrophyte community of Mediterranean temporary ponds. We performed palatability and preference tests in laboratory, measuring the consumed biomass and the number of fragments in which the samples were fragmented to study the food preferences of *P.clarkii* among five species of macrophytes that are common in the southwest of the Iberian Peninsula. In natural ponds we performed crayfish inclusion/exclusion experiences, comparing the biomass, the number of stems and number of floating stems in delimited areas with and without crayfish. The daily food intake observed in laboratory ranged from 4 to 8% of crayfish wet weight (corresponding to 1.17 g plant fresh weight). There were consumption differences between sexes (females showing higher intakes) only when accounting for the total biomass consumed in the preference test. We identified a minimum daily intake of about 2% of crayfish wet weight. There was a clear preference by *J. heterophyllus* and a rejection of *C. divisa* and *R. peltatus*. The selectivity shown by *P.clarkii* was based on various plant traits, preferring filamentous species with high dry weight (presumably more nutritious) and rejecting the tough species or, possibly, species with secondary metabolites that inhibit crayfish consumption. The comparison between the two approaches showed that this species may consume a substantial amount of the primary production of temporary ponds and may even lead to the complete elimination of macrophytes, dramatically changing these ecosystems.

Keywords: invasive species, *Procambarus clarkii*, herbivory, preference, macrophytes, Mediterranean temporary ponds

ÍNDICE

Introdução	7
Charcos temporários	9
Procambarus clarkii – historial da sua introdução, aspectos da sua biologia e impactos	11
i) Efeitos em indivíduos e populações	13
ii) Efeitos nas comunidades	14
iii) Efeitos nos ecossistemas	15
Avaliação experimental dos impactos de várias espécies de lagostim	16
Métodos	19
Testes de Palatibilidade e Preferência	19
Espécies estudadas e locais de recolha	19
Estimativa da biomassa das macrófitas	21
Desenho experimental	22
Testes de palatibilidade (fase 1)	23
Teste de preferência (fase 2)	24
Tratamento estatístico	25
Monitorização do consumo de macrófitas em charcos naturais	27
Área de estudo	27
Aparato experimental	27
Amostragem de macrófitas	30
Tratamento estatístico	32
Comparação entre as duas abordagens	32

Resultados	33
Testes de palatibilidade (fase 1)	33
Teste de preferência (fase 2)	34
Teste de preferência- Sobreconsumo	36
Actividade de fragmentação	38
Relações consumo/fragmentação	40
Monitorização do consumo de macrófitas em charcos naturais	42
Início da experiência	42
Final da experiência	42
Comparação entre as duas abordagens	44
Discussão	45
Referências bibliográficas	55
Anexos	64

INTRODUÇÃO

A globalização económica a que hoje se assiste resultou num aumento exponencial do movimento de espécies, decorrente da multiplicidade de vias de comunicação criadas e do seu uso intenso (Poorter, 2007). Consequentemente, verificou-se um aumento drástico do ritmo de invasão de novas áreas por espécies exóticas, alterando substancialmente os padrões geográficos de invasão natural (Mooney, 2005). As invasões biológicas e o seu efeito negativo nas comunidades nativas e no funcionamento dos ecossistemas são já reconhecidos como a segunda maior causa de perda de biodiversidade a nível global (Cambray, 2003; Kats e Ferrer, 2003; García-Berthou *et al.*, 2005; Poorter *et al.*, 2007; Poorter, 2007). Os impactos nos ecossistemas ocorrem por diferentes mecanismos e há estudos que implicam as espécies exóticas no declínio de populações, extinção de espécies nativas e perda de serviços de ecossistema por competição com as espécies autóctones, transmissão de doenças, hibridação e redução da diversidade genética, predação directa (Kats & Ferrer, 2003; García-Berthou *et al.*, 2005; Poorter, 2007; Lockwood *et al.*, 2007).

Os problemas causados pelas espécies exóticas são particularmente graves em sistemas isolados geográfica e evolutivamente, como ilhas e ecossistemas de água doce (Saunders *et al.*, 2002). Os ecossistemas de água doce são especialmente vulneráveis a invasões biológicas, comparativamente com os ecossistemas terrestres, devido essencialmente a dois factores. O primeiro prende-se com a elevada afinidade que as populações humanas têm para com os habitats aquáticos por razões estéticas, recreativas, comerciais ou de transporte (Lodge *et al.*, 1998; Devin *et al.*, 2001). Esta afinidade potencia o transporte de espécies para fora da sua área de distribuição por meio de diversos vectores (águas de balastro, cascos de barcos, uso de iscos vivos, etc.) que não existem nos ecossistemas terrestres. O segundo factor prende-se com a grande capacidade de dispersão das espécies de água doce, devido à elevada conectividade entre os habitats aquáticos, ao movimento da água, à alteração dos regimes sazonais de temperaturas, à elevada perturbação humana e à existência de menos barreiras à dispersão (Lodge *et al.*, 1998). Assim, os ecossistemas de água doce são mais vulneráveis à colonização por espécies exóticas (Lodge *et al.*, 1998), o que se traduz actualmente por um declínio de biodiversidade a um ritmo mais acelerado do que aquele que se verifica nos ecossistemas terrestres (Ricciardi & Rasmussen, 1999). Nos cenários

de alteração de biodiversidade desenvolvidos para o ano de 2100 por Sala *et al.* (2000), as invasões bióticas são indicadas como um dos principais impulsionadores de mudança de biodiversidade nos ecossistemas de água doce e nos ecossistemas mediterrânicos. Ao nível da região mediterrânica, tendo em consideração a riqueza específica dos ecossistemas de água doce e o número de espécies ameaçadas, a Península Ibérica destaca-se como uma das regiões mais ameaçadas (Cuttleod *et al.*, 2008).

Charcos temporários

As zonas húmidas são consideradas um dos tipos de habitat mais ameaçados na União Europeia (Vives, 1996; Rosseló-Graell *et al.*, 2000). Neste contexto, os charcos temporários mediterrânicos foram incluídos no Anexo II da Directiva Habitats (92/43/CEE) como habitats prioritários (Vives, 1996) e reconhecidos como um tipo de zona húmida de importância internacional pela Convenção de Ramsar (VIII.33) (Oertli *et al.*, 2005). Os charcos temporários mediterrânicos são pequenos corpos de água doce com 1 m² a 2 ha de área e uma profundidade máxima inferior a 8 m, permitindo às plantas aquáticas a colonização de quase toda a área do charco (Oertli *et al.*, 2005). Estes charcos entram em períodos cíclicos de cheia e seca, que promovem a existência de uma fauna e flora particulares. Podem ter uma origem natural ou ter sido criados pela acção humana (Campos *et al.*, 2008) e encontram-se em todas as regiões de clima mediterrânico do mundo (Rhazi *et al.*, 2004). Recentemente demonstrou-se que estes habitats suportam mais espécies, mais espécies únicas e mais espécies raras que os outros tipos de corpos de água (Oertli *et al.*, 2005), tanto a uma escala local, como regional (European Pond Conservation Network, 2007). São também importantes habitats para espécies mais comuns, algumas delas com populações cada vez mais ameaçadas (Nicolet *et al.*, 2007). Embora os charcos temporários tenham funções ecológicas importantes, um reconhecido valor social, económico, cultural e estético, estejam protegidos por várias directivas europeias e a consciência da sua importância para a biodiversidade e da sua vulnerabilidade à degradação ambiental tenha aumentado nos últimos anos, estes habitats continuam em perigo (Nicolet *et al.*, 2007). As principais ameaças prendem-se com actividades humanas tais como: alteração do funcionamento hidrológico, do uso do solo e da paisagem envolvente; intensificação da agricultura; sobrepastoreio; fogo; expansão urbana; poluição; gestão inapropriada; introdução de espécies exóticas. Esta situação é agravada pelas alterações climáticas

(Rhazi *et al.*, 2004; Oertli *et al.*, 2005; Nicolet *et al.*, 2007; European Pond Conservation Network, 2007; Campos *et al.*, 2008;). A invasão de ecossistemas de água doce por espécies exóticas de lagostins ocorreu um pouco por todo o mundo e, por isso, este grupo constitui um bom exemplo no estudo dos impactos de espécies exóticas neste tipo de ecossistema. Actualmente, são responsáveis por elevadas perdas de biodiversidade nos ecossistemas aquáticos (Lodge *et al.*, 2000), pela extinção global de pelo menos uma espécie (*Pacifastacus nigrescens*) e por numerosas extinções locais (Hirsh, 2009). Os lagostins ocupam uma posição central na cadeia trófica, actuando como predadores e como presas (Charlebois & Lamberti, 1996; Lodge *et al.*, 2000; Correia *et al.*, 2005; Geiger *et al.*, 2005) e constituindo uma parte importante, ou mesmo dominante, da biomassa de invertebrados (Hirsh, 2009). Os lagostins de água doce são considerados espécies-chave (Geiger *et al.*, 2005; Hirsh, 2009) e o seu estabelecimento pode ser favorecido por perturbações, muitas vezes desfavoráveis para as espécies nativas, como a poluição orgânica, o cultivo de arroz e o aumento da salinidade da água (Lodge *et al.*, 2000; Snyder & Evans, 2006). Os seus efeitos nos ecossistemas aquáticos são complexos, uma vez que os lagostins são omnívoros e actuam também como modificadores do substrato (Lodge *et al.*, 2000). A magnitude das alterações causadas pela sua actividade bentónica levou Creed e Reed (2004) a classificarem os lagostins de água doce como engenheiros dos ecossistemas, pois podem criar, modificar e manter habitats e/ou alterar a disponibilidade dos recursos para as outras espécies. Os efeitos físicos e biológicos dos lagostins na estrutura bentónica dependem do seu tamanho, pois os juvenis são principalmente carnívoros e os adultos herbívoros (Correia, 2002). Contudo sabe-se que a alimentação bentónica destes animais provoca alterações significativas na qualidade da água, particularmente em ecossistemas aquáticos de baixa profundidade como os das zonas húmidas Mediterrânicas (Angeler *et al.*, 2001). Podem ainda ter um papel importante no processamento da matéria orgânica (Charlebois & Lamberti, 1996; Creed & Reed, 2004).

Como omnívoros oportunistas, os lagostins incluem na sua dieta macrófitas, algas, detritos, invertebrados e pequenos vertebrados (Charlebois & Lamberti, 1996; Lodge *et al.*, 2000; Creed & Reed, 2004; Geiger *et al.*, 2005; Flinders & Magoulick, 2007). Segundo alguns estudos, os lagostins consomem principalmente detritos, mas a maior parte da biomassa incorporada provém de artrópodes aquáticos e de algas verdes

filamentosas (Geiger *et al.*, 2005). O consumo de detritos prende-se com a sua riqueza energética, dado que, depois de mortas, as plantas ficam cobertas por uma camada de fungos e bactérias muito rica em proteínas (Geiger *et al.*, 2005; Flinders & Magoulick, 2007). Por outro lado, alimentam-se directamente de muitas espécies de invertebrados, reduzindo a sua abundância e a sua diversidade (Charlebois & Lamberti, 1996; Creed & Reed, 2004; Geiger *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2005; Flinders & Magoulick, 2007). Foi também demonstrado que a presença de lagostins restringe a acumulação de perifíton, embora aumente o conteúdo de clorofila e a produtividade das algas presentes (Charlebois & Lamberti, 1996). Por outro lado, os lagostins removem os tapetes de macrófitas, alterando características do ecossistema como a heterogeneidade dos habitats bênticos ou a composição da fauna de invertebrados associada às macrófitas (Charlebois & Lamberti, 1996; Creed & Reed, 2004; Geiger *et al.*, 2005).

Procambarus clarkii – *historial da sua introdução, aspectos da sua biologia e impactos*

Procambarus clarkii (Girard, 1852), denominado lagostim-vermelho-americano ou lagostim-vermelho-do-Louisiana, invadiu com sucesso muitas regiões do globo, proporcionando oportunidades para o estudo dos efeitos ecológicos das espécies exóticas nas comunidades de água doce (Correia & Anastácio, 2008). Esta espécie é nativa do noroeste do México e do centro-sul dos E.U.A. e na Europa foi primeiramente introduzida em aquaculturas no sudoeste de Espanha, em 1973 (Habsburgo-Lorena, 1983). Posteriormente, as populações expandiram-se para o resto de Espanha e para outros países Europeus. Até 2006, a espécie já foi encontrada nos seguintes países: Alemanha, Áustria, Bélgica, Chipre, França, Holanda, Inglaterra, Itália (incluindo Sicília e Sardenha), Península Ibérica (incluindo os Açores, as Baleares e as Canárias), Malta e Suíça (Lodge *et al.*, 2000; Geiger *et al.*, 2005; Gherardi, 2008). Esta rápida dispersão pela região Mediterrânica e pela Europa Ocidental em 3 décadas deveu-se à comercialização *in vivo* e às repetidas translocações por razões económicas ou lúdicas (Geiger *et al.*, 2005). Esta espécie foi também introduzida noutras regiões do mundo, encontrando-se em países da América do Norte, da América Central, da América do Sul, de África e da Ásia, tendo-se tornado em quase todos a espécie dominante de lagostim (Correia, 2002; Gherardi, 2008). Em Portugal, *P. clarkii* foi detectado em 1979, em Elvas, como resultado de uma introdução ocasional ou proveniente dos afluentes dos rios de Espanha (Ramos & Pereira, 1981). Actualmente distribui-se pelo

centro e sul do país, em sistemas lóticos, zonas húmidas pouco profundas, habitats aquáticos semi-naturais e arrozais (Correia, 2002; Correia *et al.*, 2005). Esta espécie tem um ciclo de vida relativamente curto, atingindo a maturidade sexual com um tamanho corporal muito variável (45-125 mm de comprimento total (Huner, 2002)), apresentando taxas de crescimento e fecundidade elevadas (Paglianti & Gherardi, 2004) e, na natureza, a sua longevidade raramente excede os 12-18 meses (Huner, 2002). Em latitudes baixas, e particularmente em zonas inundadas durante muito tempo, existem pelo menos dois períodos de reprodução (Outono e Primavera) (Scalici & Gherardi, 2007). A fecundidade é proporcional ao tamanho da fêmea, que pode produzir até 600 ovos em cada episódio reprodutor (Geiger *et al.*, 2005), dos quais cuida durante cerca de 8 semanas (Aquiloni & Gherardi, 2008).

Esta espécie ocorre em águas doces, tolerando alguma salinidade, assim como períodos de seca de até 4 meses, águas com temperaturas elevadas e baixas concentrações de oxigénio e habitats com elevada perturbação humana (Henttonen & Huner, 1999). A sobrevivência em condições ambientais extremas prende-se com a sua capacidade de se enterrar no solo (Huner & Barr, 1991). O comportamento e a fisiologia de *P. clarkii* permitem a ocupação de um conjunto variado de habitats, desde águas subterrâneas, prados húmidos, charcos temporários, pântanos, pequenas linhas de água e lagos e corpos de água permanentes (Southy-Grosset *et al.*, 2006). Este lagostim está ainda bem adaptado a sistemas artificiais como açudes, valas de irrigação e campos de arroz, sendo a altitude do terreno, a temperatura da água e a velocidade da corrente dos sistemas lóticos as principais barreiras ao estabelecimento de novas populações na Europa (Southy-Grosset *et al.*, 2006; Cruz & Rebelo 2007).

P. clarkii é uma espécie generalista e politrófica (Gherardi & Barbaresi, 2008), comportando-se como uma espécie-chave nos ecossistemas aquáticos (Hunner & Barr, 1991; Correia, 2002; Geiger *et al.*, 2005;), não se registando geralmente diferenças nas preferências alimentares entre machos e fêmeas (Geiger *et al.*, 2005). Os detritos podem constituir um recurso alimentar importante, disponibilizando assim esta espécie os recursos contidos neste nível da cadeia trófica para níveis mais elevados (Ilhéu e Bernardo, 1993). Os animais formam uma parte importante da dieta dos estádios juvenis de *P. clarkii* (Geiger *et al.*, 2005), que se alimenta de anfíbios (posturas e larvas) (Cruz *et al.*, 2006 a, Cruz *et al.*, 2006 b), alguns peixes e invertebrados aquáticos, com uma

clara preferência por gastrópodes e artrópodes (Correia *et al.*, 2005), embora possa adaptar a sua dieta à disponibilidade de invertebrados aquáticos (Correia, 2002). Nesta espécie foram também registados comportamentos de canibalismo e necrofagia, como forma de colmatar a necessidade de proteína animal em habitats pobres em invertebrados. Ao longo do seu desenvolvimento, *P. clarkii* altera gradualmente a sua dieta no sentido da herbivoria (Correia, 2002). Os adultos são maioritariamente herbívoros, podendo incorporar até 75% de macrófitas na sua dieta (Geiger *et al.*, 2005). As espécies consumidas variam de acordo com o local e a estação do ano, em função das espécies dominantes em cada habitat (Gherardi & Barbaresi, 2008), e com as preferências alimentares do lagostim, baseadas em características das plantas como o valor nutritivo, a digestibilidade, a morfologia e a composição química (Cronin *et al.*, 2002). As macrófitas com defesas químicas ou estruturais são evitadas, sendo preferidas as ricas em azoto (Cronin *et al.*, 2002).

Quando introduzido em áreas sem equivalentes ecológicos nativos, *P. clarkii* afecta todos os níveis da cadeia trófica e os seus impactos podem variar entre pequenas alterações no comportamento das espécies residentes e grandes alterações nos fluxos de energia e de nutrientes do ecossistema. O seu impacto pode ser particularmente forte se sofrer pouca predação ou competição por parte dos predadores nativos e se as suas presas não possuírem defesas eficientes (Gherardi, 2007). A maior densidade e/ou o maior tamanho corporal aliados à plasticidade trófica aumentam a intensidade dos impactos directos (consumo) e indirectos (competição) de *P. clarkii* sobre as restantes espécies e, em particular, sobre outros lagostins, peixes bentónicos, moluscos e macrófitas (Gherardi, 2007).

Devido às particularidades da sua biologia e da sua fisiologia, os impactos de *P. clarkii* nas regiões invadidas sentem-se a vários níveis:

i) Efeitos em indivíduos e populações

Vários estudos focam a predação de *P. clarkii* sobre espécies nativas de invertebrados ou vertebrados sem estratégias de defesa contra este novo predador (Gamradt & Kats, 1996; Cruz & Rebelo, 2005). Os efeitos letais ou sub-letais verificados devem-se à curta coevolução destas espécies e do lagostim, que não permitiu o desenvolvimento de comportamentos, estruturas morfológicas ou repelentes

químicos anti-predatórios (Gamradt & Kats, 1996). Ao nível da competição, o impacto mais documentado é a dominância de *P. clarkii* sobre as espécies nativas de lagostins, que se traduz numa capacidade superior de competir por recursos vitais, como abrigos, e resulta numa maior predação e mortalidade das espécies nativas (Gherardi & Daniels, 2004). Os efeitos populacionais nas espécies nativas também podem ser causados por impactos indirectos como a transmissão de agentes patogénicos (Diéguez-Uribeondo & Söderhäll, 1993).

ii) Efeitos nas comunidades

A omnivoria de *P. clarkii* pode alterar profundamente a estrutura das comunidades por depleção dos recursos disponíveis, pela sua voracidade e pela capacidade de alterar a sua dieta (Correia, 2002). Esta espécie tem efeitos negativos na flora e fauna nativas, alterando a distribuição das espécies de anfíbios (Cruz *et al.*, 2006 *a*) e tendo impactos significativos nos invertebrados, algas e macrófitas aquáticas (Kerby *et al.*, 2005). Ao nível dos macroinvertebrados os efeitos negativos na biomassa e riqueza específica resultam principalmente da carnivoria dos juvenis (Correia & Anastácio, 2008), através de vários mecanismos: consumo, afugentamento e remoção accidental de presas durante a actividade exploratória, e inibição da colonização do substrato (Correia *et al.*, 2005). Estes mecanismos provocam mortalidade directa e exclusão dos macroinvertebrados, e uma consequente alteração da comunidade (Correia *et al.*, 2005). *P. clarkii* pode também afectar o perifíton positivamente, por redução da abundância de invertebrados algívoros e/ou fertilização resultante dos seus dejectos, ou negativamente, por consumo e remoção, decorrentes das actividades de alimentação, movimento e escavação, e/ou consumo ou destruição das macrófitas que suportam o perifíton (Charlebois & Lamberti, 1996). O seu impacto na comunidade de macrófitas depende do tipo de macrófita (espécie, abundância, forma de crescimento, palatibilidade), do lagostim (sexo, tamanho individual e tipo de actividade), e da abundância de presas alternativas (Geiger *et al.*, 2005). A redução da biomassa de macrófitas resulta não só do consumo, mas também dos danos mecânicos provocados pela actividade exploratória. A remoção das macrófitas em locais eutróficos é, geralmente, acompanhada por uma aumento da turbidez da água, proliferação de microalgas de superfície e diminuição da produção primária por macrófitas e perifíton devido à reduzida penetração da luz na água (Rodríguez *et al.*, 2003).

iii) Efeitos nos ecossistemas

A forma como adquire os recursos, a capacidade de desenvolver relações tróficas novas e a bioturvação que causa podem provocar, directa ou indirectamente, efeitos dramáticos nos ecossistemas. O lagostim pode alterar os fluxos de matéria e energia de duas formas: através da ligação de vários níveis tróficos e através do aumento da disponibilidade de carbono (como presa) para predadores de níveis tróficos mais elevados (Geiger *et al.*, 2005). A alimentação bentónica de *P. clarkii* reduz a qualidade da água, pois liberta nutrientes dos sedimentos para a coluna de água, alterando também as características do sedimento por reciclagem da matéria orgânica, e aumentando a turbidez da água e a concentração total de fósforo e azoto (Angeler *et al.*, 2001).

O impacto de *P. clarkii* nas comunidades dos charcos temporários mediterrânicos é pouco conhecido e só recentemente surgiram alguns estudos sobre os impactos desta espécie na comunidade de anfíbios e na comunidade de macrófitas. Cruz *et al.* (2006 a) documentaram a capacidade de *P. clarkii* para excluir espécies de anfíbios dos seus habitats de reprodução por predação directa ou por alteração das características dos corpos de água, tornando-os inadequados para a oviposição. O impacto de *P. clarkii* ao nível da comunidade vegetal dos charcos mediterrânicos pode ser bastante severo. Em Espanha há vários exemplos de alteração da comunidade de macrófitas após a chegada de *P. clarkii*: Laguna de El Portil, Huelva (Enríquez *et al.*, 1987); lago Carucedo, El Bierzo (Dpt. Ecologia Univ. Autónoma de Madrid, dados não publicados); Lago Chozas, León (Palacios & Rodríguez, 2002). Neste último, Rodríguez *et al.* (2003) documentaram o desaparecimento das macrófitas causado pela herbivoria de *P. clarkii*, que condicionou a distribuição das plantas nas várias regiões do lago. Assim, nas áreas de baixa profundidade, expostas no Verão, os propágulos vegetais sobreviveram devido à humidade retida no solo, mas nas áreas permanentemente submersas as plantas da família Characeae (preferidas por *P. clarkii* (Cronin *et al.*, 1996)), assim como as restantes espécies de macrófitas existentes sofreram uma herbivoria intensa durante 6-7 meses, desaparecendo por completo, não se verificando sequer a ocorrência de propágulos vegetativos assexuados. Após o desaparecimento das macrófitas registou-se um aumento significativo da concentração de nutrientes no lago (Rodríguez *et al.*, 2003). Este aumento pode, em parte, ser explicado pela translocação de nutrientes, pelo consumo e processamento da matéria orgânica decorrentes da actividade bentónica dos

lagostins (Angeler *et al.*, 2001). O excesso de nutrientes acumulados, a bioturvação do sedimento e a ressuspensão de partículas sólidas induzida pela forte acção do vento causaram a mudança de um lago de águas transparentes, dominado por macrófitas, para um lago de águas turvas dominado por fitoplâncton (Rodríguez *et al.*, 2003).

Avaliação experimental dos impactos de várias espécies de lagostim

No estudo dos impactos das espécies invasoras sobre as comunidades invadidas tem-se recorrido muito à experimentação, desde abordagens puramente laboratoriais a manipulações no campo. A maioria das experiências em Ecologia é de curta duração e de área reduzida, face à escala temporal e espacial dos fenómenos que estas pretendem representar. No entanto, as experiências em pequena escala permitem inferir quais os mecanismos e os processos que influenciam os padrões que ocorrem a grande escala (Greathouse *et al.*, 2006). A importância e a extensão dos impactos de diferentes espécies de lagostim têm sido avaliadas com recurso a experimentação em laboratório ou no campo (Lodge & Lorman, 1987; Charlebois & Lamberti, 1996; Lodge *et al.*, 2000; Correia, 2002; Cronin *et al.*, 2002; Creed & Reed, 2004; Correia *et al.*, 2005; Helms & Creed, 2005; Kerby *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2006 *a*; Flinders & Magoulick, 2007; Correia & Anastácio, 2008). A experimentação e a recolha de dados no campo podem revelar-se bastante difíceis por diversas razões, como a elevada variabilidade das condições ambientais, a dificuldade em isolar variáveis, limitações logísticas, etc. (Ellrott *et al.*, 2007). Em laboratório é mais fácil planear e controlar as experiências e, por isso, esta abordagem já foi utilizada para testar interações entre diferentes espécies de lagostim (Clocker & Strayer, 2004), testar a predação de lagostins sobre bivalves (Klocker & Strayer, 2004), testar a influência da temperatura na actividade predatória dos lagostins sobre ovos de peixe (Fitzsimons *et al.*, 2006; Ellrott *et al.*, 2007), modelar a predação de lagostins sobre ovos de peixe (Fitzsimons *et al.*, 2006), para estimar a produção e o ritmo de crescimento de lagostim (Gutiérrez-Yurrita & Montes, 2001),

Os métodos de inclusão/exclusão são há muito utilizados em experiências ecológicas na natureza, servindo para manipular a presença, ausência ou a densidade de predadores e herbívoros móveis, com o objectivo de avaliar interacções biológicas (Miller & Gaylord, 2007). Por exemplo, Greathouse *et al.* (2006) documentaram a

capacidade de experiências de inclusão/exclusão de curta duração (1 – 4 semanas) e pequena escala ($< 2 \text{ m}^2$) preverem o sentido e a magnitude dos efeitos de camarões de água doce nos recursos bênticos em barragens. Esta abordagem já foi utilizada para testar o impacto da herbivoria de lagostins (Lodge & Lorman, 1987), os seus efeitos nos macroinvertebrados bentónicos (Charlebois & Lamberti, 1996; Helms & Creed, 2005; Inoue & Miyayoshi, 2006) e no perifíton (Charlebois & Lamberti, 1996; Inoue & Miyayoshi, 2006), a sua acção como engenheiros dos ecossistemas (Creed & Reed, 2004), assim como os efeitos na abundância de algas, na biomassa de macroinvertebrados (Flinders & Magoulick, 2007) e nas alterações do sedimento (Helms & Creed, 2005; Flinders & Magoulick, 2007). A combinação de métodos de inclusão e de exclusão permite atribuir as diferenças entre tratamentos à variável em estudo (Walde & Davies, 1984). Contudo, as gaiolas quase sempre utilizadas neste tipo de experiência podem alterar algumas variáveis ambientais (Miller & Gaylord, 2007), como a velocidade da água, o oxigénio dissolvido, as taxas de sedimentação, e o movimento de organismos, criando artefactos mesocósmicos (Greathouse *et al.*, 2006; Miller & Gaylord, 2007).

A determinação de preferências alimentares tem sido uma das questões centrais da Ecologia e foi abordada com recurso a várias metodologias, incluindo experiências de inclusão/ exclusão, com o objectivo de clarificar o processo de selecção da dieta em diferentes contextos (Larrinaga, 2010). A literatura contém algumas noções acerca de preferências alimentares, mas é de consenso geral que é necessária uma clarificação das definições (Taplin, 2007). Para Manly (2006) qualquer diferença entre o consumo de diferentes presas, mesmo quando oferecidas isoladamente e na ausência de outras escolhas possíveis, é uma preferência. Neste tipo de testes, os resultados podem reflectir preferências, mas também podem estar enviesados. Um exemplo é o aumento do consumo de presas menos preferidas para suplementar as necessidades nutricionais, demonstrando comportamentos pouco representativos do comportamento na natureza (Larrinaga, 2010). Segundo outra perspectiva, a preferência apenas pode ser demonstrada com a realização de testes em que todos os tipos de presa são oferecidos simultaneamente (Taplin, 2007). No entanto, neste tipo de testes algumas presas podem ser preferidas simplesmente porque as outras são rejeitadas, estando assim a interpretação dos resultados dependente do contexto. A análise do consumo dos vários

tipos de presa em testes singulares e num teste em que todas são oferecidas simultaneamente providenciará uma melhor indicação acerca das preferências do consumidor (Underwood *et al.*, 2004). Assim, Underwood e Clarke (2005) indicam que só se pode demonstrar uma preferência se o consumo dos vários tipos de presa apresentados em simultâneo diferir das taxas de consumo verificadas quando apenas um tipo de presa foi oferecido (Underwood & Clarke, 2007).

Neste trabalho propomo-nos a estudar o consumo de diferentes espécies de macrófitas, características dos charcos temporários do Sudoeste da Península Ibérica, por *Procambarus clarkii*. Utilizando testes laboratoriais e experiências de inclusão/exclusão de lagostins em charcos naturais, pretendemos averiguar se existe uma apropriação significativa da biomassa de macrófitas destes ecossistemas pelo lagostim e identificar quais as espécies mais vulneráveis à herbivoria por esta espécie.

Tendo em conta os objectivos definidos optou-se por uma abordagem mista, testando as preferências do lagostim e os seus impactos em várias macrófitas com uma bateria de testes laboratoriais e com uma experiência de inclusão/exclusão em charcos naturais.

Para testar em laboratório o consumo de diferentes macrófitas por *P. clarkii* foram usados testes de tempo fixo realizados em duas fases: Fase 1 (testes de palatibilidade) - forneceu-se aos lagostins apenas uma espécie de macrófita, não existindo escolha possível; Fase 2 (teste de preferência) - forneceram-se todas as espécies em estudo aos lagostins em simultâneo, existindo assim possibilidade de escolha. Esta abordagem é semelhante à utilizada por Jackson e Underwood (2007), permitindo atribuir uma ordem de preferência dos vários tipos de presa que é independente da situação em que são apresentados.

Para testar o consumo de macrófitas em condições naturais, foram criados compartimentos em charcos localizados na Estação de Campo do Centro de Biologia Ambiental onde, a partir de uma abordagem de inclusão/exclusão de lagostins, se

avaliou a vulnerabilidade da comunidade de macrófitas a *P. clarkii*, tendo em conta os impactos decorrentes do consumo e da destruição mecânica causada pela actividade desta espécie.

Finalmente, foi testada a possibilidade de utilização dos resultados obtidos em laboratório para prever os impactos provocados por *P. clarkii* sobre as macrófitas estudadas em condições naturais.

MÉTODOS

Testes de Palatibilidade e de Preferência

Espécies estudadas e locais de recolha

A escolha das espécies de macrófitas teve por base três critérios: i) a presença nos charcos monitorizados numa das partes referentes a este trabalho; ii) a presença regular neste tipo particular de habitat; iii) a inclusão de diferentes tipos fisionómicos, representativos da diversidade de macrófitas presentes no sudoeste de Portugal. Assim, seleccionaram-se algumas das espécies mais comuns e com mais ampla distribuição nos charcos temporários desta região:

Cariço-dividido, *Carex divisa* Huds., é um geófito existente em relvados de sítios húmidos ou arenosos e pertence à família Cyperaceae. Em Portugal distribui-se, sobretudo no Sul e no Leste do país. A sua distribuição mundial ocupa toda a área compreendida entre o Oeste e Centro da Ásia, a Europa, o Norte de África e a Macaronésia.

Poêjo, *Mentha pulegium* L., é um proto-hemicriptófito da família Labiatae (Lamiaceae), característico de relvados húmidos, zonas ruderais e zonas ripícolas. Em Portugal está distribuído de Norte a Sul do país e a sua área de distribuição engloba o Sul, Oeste e Centro da Europa, o Noroeste de África e o Próximo Oriente.

Junco-de-folhas-variadas, *Juncus heterophyllus* Dufour, é uma espécie hidrófita ou helófita da família Juncaceae existente em águas paradas, margens de cursos de água ou em terrenos temporariamente alagados. Em Portugal esta espécie distribui-se por

quase todo o país à exceção do extremo Sul, do Nordeste e do Litoral centro. A nível mundial distribui-se pelo Sudoeste da Europa e pelo Noroeste de África.

Baldélia-ranunculada, *Baldellia ranunculoides* (L.) Parl., é uma espécie helocriptófita ou hidrófita que pertence à família Alismataceae, sendo característica de habitats ripícolas. Em Portugal distribui-se por quase todo o país, exceptuando-se algumas regiões do Nordeste e do extremo Sul. A nível mundial esta espécie ocupa toda a Europa (com exceção do extremo Norte), o Norte de África e a Macaronésia.

Ranúnculo-aquático, *Ranunculus peltatus* Schrank subsp. *baudotii* (Godr.) C. D. K. Cook, é um hidrófita ou helófito pertencente à família Ranunculaceae que ocorre em habitats ripícolas. No nosso país esta espécie distribui-se no Centro Oeste e no Sudoeste e a nível mundial distribui-se pelo Este e Oeste da Europa e pela Região Mediterrânica.

As macrófitas foram recolhidas em charcos temporários e linhas de água temporárias da Serra de Grândola, na Herdade da Ribeira Abaixo ou próximo desta, no dia de início de cada teste (Tabela 1). As macrófitas foram recolhidas com raíz, tendo sido mantidas ao ar livre e em solo encharcado proveniente do seu local de origem, de forma a conservarem-se frescas o maior tempo possível.

Os exemplares de *P. clarkii* foram capturados com recurso a armadilhas de funil e a passagens de camaroeiro. As capturas decorreram entre 29 de Março e 2 de Maio de 2010, maioritariamente, nos arrozais de S. Romão e de Rio de Moinhos, junto ao rio Sado. A identificação do sexo dos animais capturados fez-se pela verificação da presença de um órgão copulador formado por modificação do primeiro e segundo par de pleópodes, que identifica os machos (Dawes, 1981). Foi também medido o comprimento do cefalotórax sem rostro (CEF) até aos 0,01 mm. Foi escolhida esta medida biométrica, poissegundo Adão (1991) é a que apresenta maiores repetibilidades e está fortemente correlacionada com o comprimento total.

Os lagostins foram colocados individualmente em recipientes de plástico (12,5 x 12,5 x 9 cm), e mantidos nas instalações do Centro de Biologia Ambiental na Herdade da Ribeira Abaixo (local onde decorreram também as experiências de laboratório) sob luz artificial, com um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Durante a sua permanência nas instalações foram alimentados *ad libitum* de cinco em cinco dias com comida comercial para peixe Biogranulat Sera Pond (Humidade 6,4%, Proteína

32,0%, Gordura 7,2%, Fibra 5,6%, Cinza 9,3 %), sendo a água dos recipientes mudada regularmente. A água utilizada nas experiências proveio de furo hertziano, não sendo por isso sujeita a qualquer tratamento.

Estimativa da biomassa das macrófitas

O consumo de macrófitas é comumente expresso em peso seco (Otto e Svensson, 1980; Rodríguez *et al.*, 2003). Para tal, o teor em água das cinco espécies de macrófitas foi determinado a partir do peso fresco (obtido após a remoção da água em excesso com papel absorvente) de nove talos de cada espécie. Os talos foram depois secos em estufa a 40 °C durante cinco dias, após os quais foram de novo pesados. Posteriormente, calculou-se o teor em água de cada espécie pela fórmula: $1 - (\text{peso seco}/\text{peso fresco})$.

A não existência de diferenças no teor em água das espécies em estudo foi testada com ANOVA univariada, tendo-se verificado diferenças significativas ($F_{4, 40} = 46,943$; $p < 0,001$) (Fig. 1).

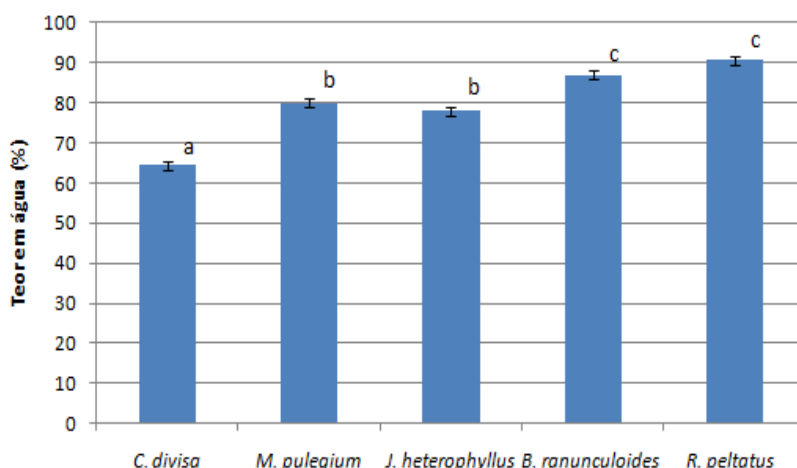


Figura 1- Teor médio de água (%) das espécies *C. divisa*, *M. pulegium*, *J. heterophyllus*, *B. ranunculoides* e *R. peltatus*. As barras de erro representam 1 desvio padrão e as letras *a*, *b* e *c* representam os grupos formados pelo teste *a posteriori* de Tukey.

É possível que o factor de conversão de peso fresco em peso seco acima estimado, diferente para cada espécie, varie com o volume da planta. A linearidade desta relação para as várias espécies foi testada com regressões lineares entre o peso fresco e o peso seco de nove talos por espécie, representativas dos utilizados nos testes. Foi verificado um bom ajustamento para todas as espécies (Tabela 1- Anexo 1).

Os valores utilizados nas análises referem-se a biomassas consumidas pelo lagostim (peso seco) e ao número de fragmentos em que os talos foram cortados. Para ambos os tipos de dados verificou-se a existência de correlações positivas entre os seus valores médios e as suas variâncias. Assim, os dados foram transformados, por logaritmização no caso da biomassa consumida e pela radiciação no caso do número de fragmentos.

O consumo diário de biomassa definiu-se a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Biomassa consumida} = \text{Log}_{10} [([(P_i * C - P_f)] * P_s) + 1],$$

onde:

P_i = peso fresco inicial das amostras;

C = valor médio (peso fresco final/peso fresco inicial) dos controlos;

P_f = peso fresco final das amostras;

P_s = factor de conversão para peso seco = valor médio de (1- teor específico em água).

Desenho experimental

As experiências decorreram em aquários de 38,5 x 26,5 x 28,0 cm, com cerca de 4 L de água e um abrigo (tubo de PVC). A temperatura da água foi registada diariamente em 4 aquários, distribuídos aleatoriamente no laboratório, com uma precisão de 0,5 °C, tendo a temperatura média variado entre os 15°C e os 20 °C durante as experiências. Os tratamentos (sexo e lagostim/controlo) foram distribuídos de forma aleatória em estantes metálicas no centro do laboratório (Fig. 2). Os testes decorreram entre 7 de Abril de e 29 de Maio de 2010 (Tabela 1).

Tabela 1- Datas de início e de conclusão dos testes de palatibilidade das 5 espécies de macrófitas e do teste de preferência. Nas colunas referentes a *P. clarkii* é indicado o número de lagostins de cada sexo que completaram os respectivos testes sem efectuar a muda.

Macrófita (Palatibilidade)	Período de teste	<i>P. clarkii</i> Nº de machos	<i>P. clarkii</i> Nº de fêmeas
<i>R. peltatus</i>	07 a 12 de Abril	13	13
<i>B. ranunculoides</i>	14 a 19 de Abril	12	15
<i>M. pulegium</i>	21 a 26 de Abril	14	13
<i>J. heterophyllus</i>	05 a 10 de Maio	14	15
<i>C. divisa</i>	22 a 27 de Maio	15	14
Preferência	12 a 17 de Maio	15	14



Figura 2- Fotografia ilustrativa da disposição dos aqários experimentais.

Para os testes foram considerados aptos os lagostins sem feridas visíveis, com a última muda conhecida realizada há mais de 14 dias, e com CEF superior a 32,00 mm e inferior a 40,00 mm (a classe de tamanho mais frequente entre os lagostins adultos capturados). Não se registaram diferenças de tamanho entre os lagostins utilizados nos vários testes (ANOVA, $F_{5, 156} = 1,56$; $p > 0,1$) assim como entre os sexos (ANOVA, $F_{1, 156} = 2,69$; $p > 0,1$).

Testes de palatibilidade (fase 1)

Em cada bloco experimental foi testado o consumo por parte de machos ($n = 15$) e fêmeas ($n = 15$), tendo também sido realizados controlos ($n = 15$) repartidos igualmente pelos três dias em que se efectuaram registos (5+5+5). Os talos referentes aos controlos

foram colocados em aquários que continham apenas água, de forma a avaliar a variação da massa das amostras não causada por herbivoria (p. ex. por crescimento ou necrose).

Foram usados lagostins diferentes em todos os testes, alimentados *ad libitum* com comida comercial para peixe na noite anterior ao início de cada experiência, com o fim de homogeneizar a fome dos animais e evitar consumos anormalmente elevados durante os ensaios. Foi fornecido a cada lagostim um único talo de macrófita, tendo em atenção que este teria de ter tamanho suficiente para alimentar o lagostim *ad libitum* e não constituir, assim, um factor limitante no ensaio. Os talos foram previamente preparados (remoção de raízes, peças florais, partículas de solo e vermes) e pesados até aos 0,1 mg (peso fresco). Foram escolhidos talos com volume aproximadamente igual, para que a probabilidade de interacção do lagostim com o talo fornecido fosse semelhante em todos os aquários. Permitiu-se o consumo dos talos durante 24 h, após as quais estes foram substituídos por novos e repetiu-se este procedimento ao longo de cinco dias. Os primeiros dois dias constituíram um período de habituação, durante o qual não foram efectuados registos. Nos três dias seguintes a substituição dos talos foi acompanhada da substituição total da água de cada aquário e foram registados em cada dia:

- i) o peso fresco final da biomassa não consumida (talos e seus fragmentos), da mesma forma que o peso fresco inicial;
- ii) o número de fragmentos em que os talos foram cortados.

Após os três dias de registos, os lagostins foram mantidos nos aquários durante dois dias para despistar eventuais situações de muda iniciada durante os testes. Nos casos em que os lagostins efectuaram a muda descartaram-se os dados relativos aos indivíduos em questão. De modo a obter amostras de dimensões iguais e a eliminar possíveis situações de muda não detectadas ao fim dos dois dias, foram seleccionados para as análises apenas os 10 lagostins de cada tratamento que apresentaram consumos mais elevados no total dos 3 dias.

Teste de preferência (fase 2)

O procedimento utilizado no teste de preferência foi muito semelhante ao dos testes de palatibilidade. Neste teste foram fornecidos a cada lagostim um talo de cada uma das cinco espécies de macrófita, tendo sido colocado também um talo de cada espécie nos aquários-controlo. Como nos testes de palatibilidade, permitiu-se a alimentação dos lagostins durante 24 h, após as quais se renovaram os talos. Este

processo repetiu-se também ao longo de cinco dias, tendo os primeiros dois dias constituído um período de habituação, apenas se efectuando registos e troca total da água dos aquários nos últimos três dias. Os talos e fragmentos foram separados por espécie de macrófita e registou-se para cada espécie:

- i) o peso fresco final das amostras (talos e seus fragmentos);
- ii) o número de fragmentos em que os talos foram cortados.

Após o término do teste, os lagostins foram mantidos nos aquários durante mais dois dias de forma a detectar eventuais situações de início de muda durante o teste. Do mesmo modo, foram seleccionados para a análise apenas os 10 lagostins de cada sexo que apresentaram consumos mais elevados no total dos três dias.

Tratamento estatístico

Os testes foram construídos para que os dados obtidos pudessem ser facilmente analisados com recurso a ANOVAS. Porém, apesar das transformações efectuadas não foi sempre verificada a homogeneidade de variâncias entre os vários tratamentos, um dos pressupostos para a utilização da ANOVA. No entanto, segundo Underwood (1997) a validade do teste e a probabilidade associada à distribuição de F não são muito afectadas por esta violação, particularmente em experiências equilibradas, com 5 ou mais tratamentos de n igual ou superior a 6. Tendo em consideração o facto de que o conjunto de dados relativo à bateria de testes efectuados se encaixa nos parâmetros anteriormente mencionados, optou-se por fazer as análises com ANOVAS.

Os valores de consumo utilizados nos testes correspondem ao somatório dos consumos efectuados nos três dias de registos. Nos poucos casos em que o valor estimado do consumo foi negativo, o consumo foi considerado nulo. Uma vez que não se registou nenhum crescimento das macrófitas durante os testes nos aquários controlo, um consumo negativo pode apenas ser explicado por um consumo muito baixo, ou mesmo inexistente, aliado ao erro das pesagens, legitimando a atribuição do valor “zero” nestas situações.

Para os testes de palatibilidade, os consumos de biomassa de todas as espécies de macrófita, assim como o número de fragmentos em que cada espécie foi cortada, por lagostins dos dois sexos foram comparados com recurso a uma ANOVA factorial, considerando os factores: “macrófita” (5 níveis) e “sexo” (2 níveis).

Para o teste de preferência, o consumo de um tipo de alimento não pode ser considerado independente do consumo dos outros tipos de alimento fornecidos em simultâneo, o que invalida a utilização de testes estatísticos paramétricos. Desta forma, para analisar o consumo de biomassa e o número de fragmentos de cada espécie produzidos pelos lagostins neste teste, foram realizados testes de permutação aleatória para cada combinação espécie de macrófita/sexo de lagostim. As permutações foram repetidas 1000 vezes; como estatística de teste utilizou-se o percentil do valor observado na distribuição de valores assim gerada. Esta análise foi realizada utilizando o software estatístico R, versão 2.6.

A biomassa total consumida, assim como o número total de fragmentos produzidos no teste de preferência foram comparados entre os dois sexos com um teste-t. Utilizando desenhos experimentais semelhantes, foi já descrito por outros autores um fenómeno de sobreconsumo de biomassa em testes de preferência, quando comparado com os consumos máximos nos testes de palatibilidade (Leberfinger e Bohman, 2010). Para testar a existência de sobreconsumo foi realizada uma ANOVA univariada para cada sexo comparando a biomassa total consumida no teste de preferência com a biomassa consumida em cada um dos testes de palatibilidade. O mesmo tipo de análise foi realizado para testar a existência de diferenças na actividade de fragmentação entre os dois tipos de teste.

Testou-se a existência de correlação entre os resultados obtidos fase 1 e na fase 2 para com o teste de correlação de Pearson, utilizando-se também uma abordagem gráfica.

As relações entre o consumo de biomassa e o número de fragmentos originados foram testadas com um teste de correlação de Spearman, tendo sido também utilizada uma abordagem gráfica.

Com a excepção do teste de permutação, as restantes análises foram realizadas recorrendo aos programas Microsoft Office Excel 2007 e Statistica 7.

Monitorização do consumo de macrófitas em charcos naturais

Área de estudo

A região da Serra de Grândola é caracterizada por um clima do tipo sub-húmido, mesotérmico, com acentuada deficiência de água no Verão, excesso de água no Inverno e nula ou pequena concentração de eficiência térmica (Santos-Reis & Correia, 1999). Este regime leva a que no Inverno se formem charcos de diversas dimensões que duram, normalmente, até ao final da Primavera, altura em que secam devido à subida das temperaturas. Nestes charcos ocorrem sucessões cíclicas, com a germinação de várias espécies de plantas com as primeiras chuvas, seguido de um crescimento rápido no Inverno e da floração na Primavera. Posteriormente, com a seca dos charcos no início do Verão as plantas morrem e os charcos ficam despidos de vegetação até ao Outono seguinte.

Os dois charcos temporários onde os estudos se realizaram foram escavados em 2002. A área do fundo de cada charco é de aproximadamente 40 m² e a profundidade máxima é de cerca de 2 m. Estes charcos são alimentados por linhas de água temporárias e secam a meio da Primavera, normalmente no final de Maio. No que respeita à vegetação, são dominados por macrófitas, essencialmente *R. peltatus*, *J. heterophyllus*, *B. ranunculoides*, e por outras espécies características de arrelvados húmidos. Estes charcos têm sido monitorizados desde a sua escavação e a presença de *P. clarkii* tem sido registada com alguma regularidade (mas não todos os anos) no charco A (Alt. 150 m); no charco B (Alt. 175 m) foram encontrados indivíduos isolados de *P. clarkii* em dois anos diferentes, nunca tendo sido verificada a sua reprodução (R. Rebelo, *com. pess*).

Aparato experimental

No final de Novembro de 2009 o perímetro dos charcos foi vedado com rede ovelheira de 90 cm de altura, para impedir o acesso de animais de médio e grande porte. Antes do início das chuvas, em Dezembro de 2009, ambos os charcos foram divididos a meio com manga plástica dupla suportada por estacas (Fig. 3). Foram assim criados dois compartimentos distintos em cada charco, sem circulação de água entre eles – o

compartimento “Lagostim”, onde seriam mais tarde introduzidos os exemplares de lagostim, e o compartimento “Controlo”, onde não se efectuou nenhuma manipulação.



Figura 3- A- Fotografia do aparato experimental do charco A (vista frontal). B- Representação esquemática da divisória colocada nos charcos de forma a criar dois compartimentos experimentais (vista fronto-lateral). As estacas de madeira enterradas no solo (à esquerda) serviram de suporte à manga plástica, estendida e fixa ao longo das estacas e também ela enterrada no solo. A imagem mostra apenas um dos compartimentos, à direita das estacas.

Tendo como suporte a vedação que rodeia os charcos, colocou-se junto ao chão uma segunda barreira de rede de malha fina, com cerca de 20 cm de altura, com os objectivos de impedir a colonização dos charcos por lagostins provenientes do exterior, a passagem por via terrestre dos lagostins utilizados na experiência entre os compartimentos e a saída dos lagostins utilizados na experiência para os habitats circundantes. Em ambos os compartimentos de cada charco colocaram-se, perpendicularmente à margem, cordas de sisal marcadas com fita sinalizadora de 50 em

50 cm (Fig. 4). Assim, obtiveram-se faixas destinadas à amostragem de vegetação aquática e alguns corredores de acesso ao interior do charco, em cada um dos quais se colocou dois tijolos, que serviram de abrigo aos lagostins.

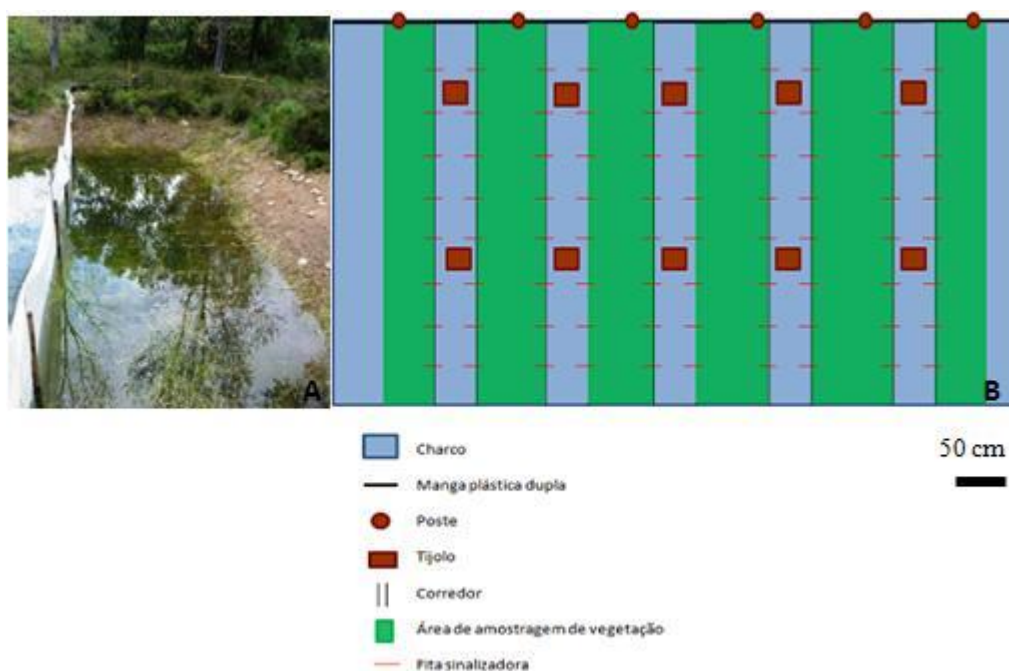


Figura 4- A- Fotografia de um compartimento experimental no charco A (vista frontal). B- Representação esquemática de um dos dois compartimentos experimentais do charco A (vista lateral). A verde a área do charco onde se realizou a amostragem da vegetação, intercalada por corredores de acesso ao interior do charco. Os corredores foram marcados a cada 50 cm com fita sinalizadora e em cada um deles colocaram-se 2 tijolos que serviram de abrigo para os lagostins.

Antes do início da experiência os charcos foram armadilhados durante duas noites, com duas armadilhas de funil por compartimento, iscadas com sardinha, com o objectivo de detectar alguma colonização prévia por lagostim.

Os lagostins introduzidos nos charcos foram também capturados nos arrozais de S. Romão e de Rio de Moinhos e mantidos nas mesmas condições que os lagostins utilizados nos testes de laboratório. Foram utilizados apenas lagostins machos com CEF entre 32,00 e 40,00 mm, todos eles previamente marcados com um furo e um recorte triangular nos urópodes conforme a metodologia utilizada por Guan (1997) (Fig. 5). A 3 de Maio de 2010 foram colocados 20 lagostins (densidade $\approx 1 \text{ ind/m}^2$) no compartimento “Lagostim” do charco B que à data tinha uma profundidade máxima de cerca de 1,05 m (Vol. total $\approx 70 \text{ m}^3$). A 6 de Maio de 2010 colocaram-se 100 lagostins

(densidade ≈ 5 inds/m²) no compartimento “Lagostim” do charco A, com uma profundidade máxima de 0,95 m (Vol. total ≈ 70 m³). A escolha destas densidades teve por base outros trabalhos (Gherardi e Acquistapace, 2004) e as densidades observadas por outros autores na área de estudo (Cruz, *com. pess.*).

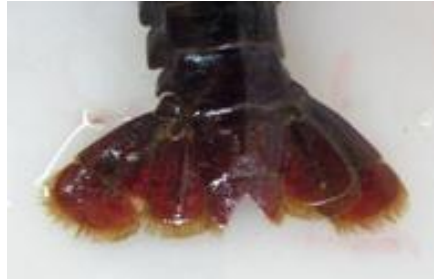


Figura 5- Fotografia representativa das marcações efectuadas nos urópodes dos lagostins.

As experiências foram dadas por concluídas quando o nível da água desceu abaixo dos 40 cm de altura. Os lagostins foram retirados do charco A a 26 de Maio de 2010 quando este apresentava uma profundidade máxima de cerca de 0,4 m (Vol. total ≈ 28 m³); e do charco B a 3 de Junho de 2010, quando a profundidade máxima era de cerca de 0,75 m (Vol. total ≈ 50 m³). Sensivelmente a meio da experiência foram realizadas duas sessões de armadilhagem nocturna nos compartimentos “Controlo” para detectar e remover eventuais lagostins que pudessem ter aí entrado.

Após o término da experiência procedeu-se à recaptura dos lagostins introduzidos nos charcos utilizando o mesmo tipo de armadilhas. No charco A foram realizadas cinco noites de armadilhagem com cinco armadilhas/noite, ao passo que no charco B foram realizadas três noites de armadilhagem com oito armadilhas/noite. Os lagostins recapturados foram mortos por congelamento a -18 °C e, mais tarde, sujeitos a dissecação para a remoção dos estômagos, seguindo as indicações de Kükenthal *et al.* (1986). Os conteúdos estomacais foram vistos ao microscópio, em preparação simples, com vista à detecção de material vegetal que comprovasse o consumo de macrófitas.

Amostragem de macrófitas

A amostragem das macrófitas presentes nos dois charcos, assim como a medição de alguns parâmetros físico-químicos da água (temperatura, condutividade, salinidade e pH) foi realizada pouco antes do início da experiência, nos dias 2 e 4 de Maio de 2010 (charco A) e no dia 28 de Abril (charco B). Dada a relativamente pequena dimensão dos

compartimentos experimentais, os parâmetros físico-químicos foram apenas medidos em dois locais em cada compartimento com um medidor multiparamétrico YSI (556 MPS).

A cobertura das macrófitas presentes nos charcos antes do início da experiência foi estimada a partir de fotografia digital. Usando os corredores de acesso ao interior dos charcos, fotografou-se toda a superfície do charco a que foi possível aceder. As fotografias foram tiradas num plano perpendicular à vegetação, e de modo a que o campo de visão contivesse um único quadrado de 250 cm². Posteriormente, recorrendo ao sistema de referenciação das marcas de fita sinalizadora, delimitaram-se quadrados de 50 cm de lado em cada fotografia, que foram divididos em 4 sub-unidades. A estimativa da frequência de ocorrência das macrófitas mais comuns foi obtida a partir da verificação da presença/ausência de cada espécie em cada uma das sub-unidades. Esta análise foi efectuada com recurso ao programa Microsoft Office Power Point 2007.

No fim da experiência, os parâmetros físico-químicos da água foram de novo amostrados utilizando o método anteriormente descrito. Relativamente às macrófitas, procedeu-se à remoção da vegetação presente em quadrados de 25 cm de lado distribuídos aleatoriamente pelos dois compartimentos de cada charco. Foi recolhida a vegetação de nove quadrados em cada um dos compartimentos do charco A e de sete quadrados em cada um dos compartimentos do charco B. As amostras foram triadas enquanto frescas, identificando-se as espécies presentes e contando-se o número de talos de cada espécie. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa e pesadas até aos 0,01 g.

Procedeu-se também à amostragem dos talos cortados que flutuavam à superfície dos charcos; resultantes provavelmente da destruição mecânica causada pela actividade dos lagostins. Esta amostragem fez-se isolando áreas de de 250 cm² da superfície dos charcos com recurso a uma “box-trap” de 50 cm de lado, recolhendo depois todos os talos flutuantes. Foram realizados cinco replicados em cada compartimento de cada charco. Os talos foram depois contados e identificada a espécie de macrófita a que pertenciam.

Tratamento estatístico

Os parâmetros físico-químicos da água nos compartimentos “controle” e “lagostim” não foram comparadas com testes estatísticos devido à reduzida amostragem, tendo-se verificado apenas a existência de disparidades acentuadas entre os dois compartimentos.

Para comparar a vegetação presente inicialmente nos compartimentos “lagostim” e “controle” em cada um dos charcos, recorreu-se a tabelas de contingência, descartando-se a informação relativa às espécies com menos de cinco ocorrências em qualquer um dos compartimentos.

Após o fim da experiência, a vegetação presente no fundo dos charcos foi comparada com duas análises distintas: na primeira foram comparadas a biomassa total e o número total de talos de macrófitas entre os dois compartimentos; na segunda foram comparados os mesmos parâmetros, mas separadamente para cada espécie de macrófita. Ambas as comparações foram feitas recorrendo a testes-t.

O número total e de cada espécie de talos flutuantes foi comparado entre os dois compartimentos de cada charco recorrendo a testes de Mann-Whitney, devido à ausência de normalidade nos dados.

As análises foram realizadas recorrendo aos programas Microsoft Office Excel 2007 e Statistica 7.

Comparação entre as duas abordagens

Para comparar as estimativas de preferências alimentares de *P. clarkii* utilizando as duas abordagens (laboratorial e de inclusão/exclusão de lagostim nos charcos naturais), foram utilizados os resultados obtidos no teste de preferência relativos aos machos. Estes foram usados para calcular o consumo diário médio de biomassa, total e específica, correspondente ao consumo de: i) todos os 15 lagostins (15); ii) os 5 lagostins com consumos mais elevados (5+); iii) os 5 lagostins com consumos mais baixos (5-). Utilizaram-se estas estimativas de consumo diário para calcular a biomassa que os lagostins poderiam consumir num período de 21 dias (duração das experiências

realizadas e correspondente a uma invasão de curta duração de um charco temporário) e num período de 90 dias (duração máxima prevista para a invasão de um charco temporário por *P. clarkii* durante a Primavera). Esta ocupação de longa duração já foi verificada noutros anos na área de estudo (Cruz *et al.*, 2004) e acontece quando os lagostins colonizaram os charcos no Outono, estando assim presentes em Fevereiro, quando a temperatura da água sobe acima dos 10 °C, permitindo o início da sua actividade (Rodríguez *et al.*, 2003). Estas estimativas foram calculadas assumindo uma densidade de 5 lagostins/m². Finalmente, os consumos estimados foram comparados com a biomassa de macrófitas efectivamente colhida nos compartimentos “controlo” do charco experimental A.

RESULTADOS

Testes de palatibilidade (fase 1)

Registaram-se diferenças significativas entre os consumos das diferentes macrófitas ($F_{4, 90} = 14,36$; $p < 0,001$), mas não entre os consumos de machos e de fêmeas ($F_{1, 90} = 1,72$; $p > 0,05$), não existindo interacção significativa entre os factores “sexo” e “macrófita”. *J. heterophyllus* foi a espécie mais consumida (Fig. 6), com cerca do dobro da biomassa das outras espécies, cujos consumos foram semelhantes.

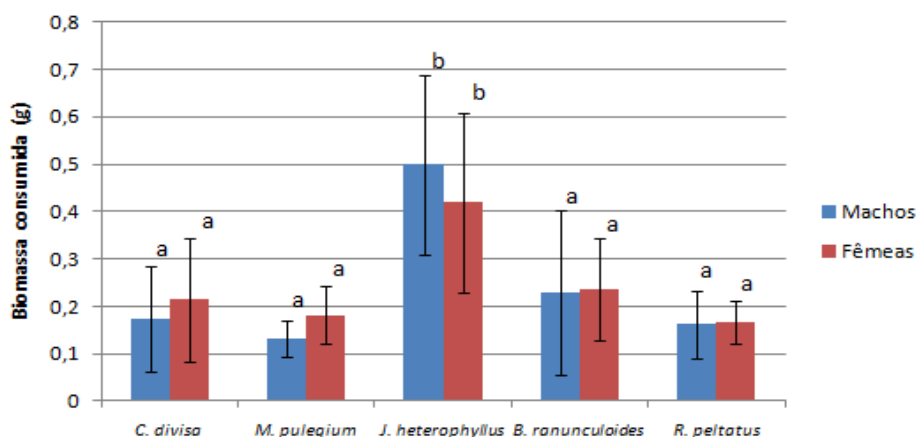


Figura 6- Biomassa (g) consumida por machos e fêmeas de *P. clarkii* nos testes de palatibilidade (fase 1). As barras de erro representam um desvio padrão e as letras *a* e *b* indicam os dois grupos formados pelo teste *a posteriori* de Tukey.

Quanto ao número de fragmentos produzidos por *P. clarkii* verificaram-se diferenças significativas entre as macrófitas ($F_{4, 90} = 54,38$; $p < 0,001$), mas não entre machos e por fêmeas ($F_{1, 90} = 0,22$; $p > 0,05$) e também não se verificou uma interação significativa entre os factores “macrófita” e “sexo”. As macrófitas podem ser divididas em três grupos: *R. peltatus* e *B. ranunculoides*, que registaram o maior número de fragmentos, seguidas de *J. heterophyllus*, com um número de fragmentos intermédio, e *C. divisa* e *M. pulegium*, com um número de fragmentos muito baixo (Fig. 7).

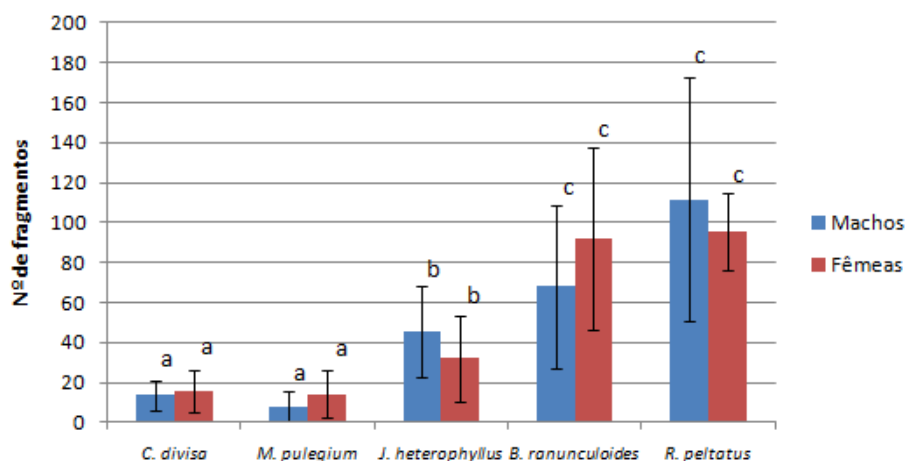


Figura 7- Número de fragmentos em que os talos foram cortadas por machos e fêmeas de *P. clarkii* nos testes de palatibilidade (fase 1). As barras de erro representam um desvio padrão e as letras *a*, *b* e *c* indicam os grupos formados pelo teste *a posteriori* de Tukey.

Teste de preferência (fase 2)

Os testes de permutação mostraram a existência de diferenças significativas no consumo das espécies de macrófita (Fig. 8). Os resultados foram semelhantes entre machos e fêmeas, observando-se uma clara preferência por *J. heterophyllus* ($p < 0,001$, para machos e fêmeas). Neste teste, contrariamente ao que se verificou nos testes de palatibilidade, verificaram-se diferenças significativas entre o consumo das restantes espécies: *C. divisa* ($p < 0,001$, para machos e fêmeas) e *R. peltatus* ($p < 0,01$; $p < 0,001$, machos e fêmeas respectivamente) foram notoriamente rejeitadas; enquanto *M. pulegium* e *B. ranunculoides* foram consumidas de forma intermédia, não se verificando preferência nem rejeição destas espécies (Fig. 8).

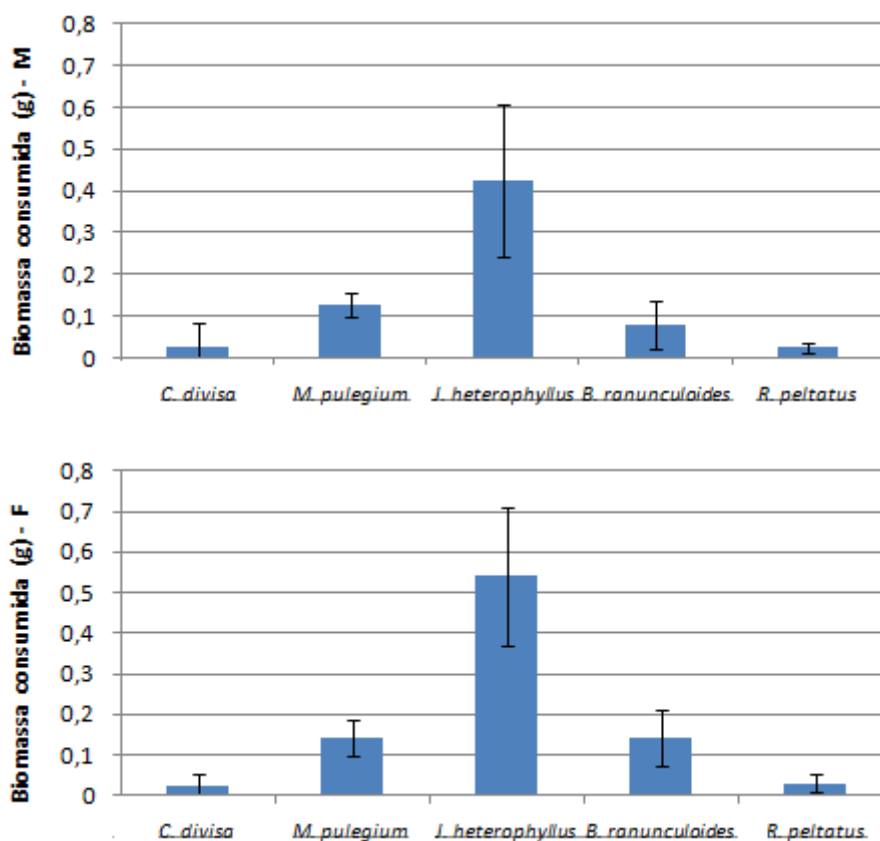


Figura 8- Biomassa (g) consumida por machos (M) e fêmeas (F) de *P. clarkii* no teste de preferência (fase 2). As barras de erro representam um desvio padrão.

Quanto ao número de fragmentos em que *P. clarkii* cortou os talos de cada espécie, os testes de permutação mostraram a existência de diferenças significativas em ambos os sexos. Verificou-se uma preferência pelas espécies *J. heterophyllum* ($p < 0,05$, para machos e fêmeas) e *R. peltatus* ($p < 0,001$, para machos e fêmeas) e uma rejeição das espécies *C. divisa* ($p < 0,01$; $p < 0,001$, machos e fêmeas respectivamente) e *M. pulegium* ($p < 0,001$; $p < 0,01$, machos e fêmeas respectivamente) (Fig. 9). Não houve preferência nem rejeição de *B. ranunculoides*.

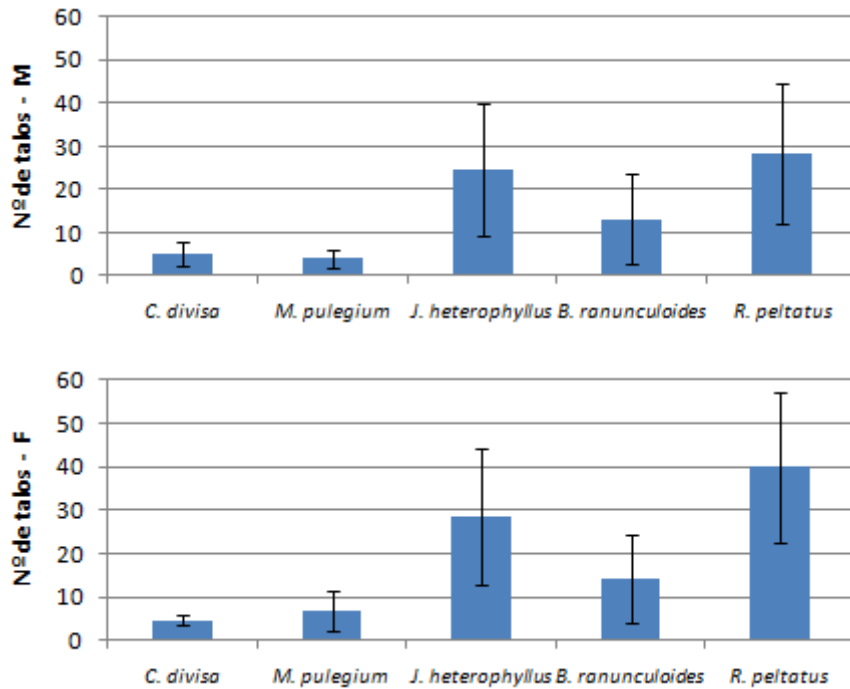


Figura 9- Número de fragmentos em que os machos (M) e as fêmeas (F) de *P. clarkii* cortaram os talos no teste de preferência (fase 2). As barras de erro representam um desvio padrão.

Teste de preferência - Sobreconsumo

Comparando o consumo total na fase 2 com o consumo de cada uma das espécies na fase 1 verificou-se, em ambos os sexos, a existência de “sobreconsumo” ($F_{5, 54} = 15,75$; $p < 0,001$ e $F_{5, 54} = 25,70$; $p < 0,001$). Verificou-se também que na fase 2 as fêmeas consumiram mais biomassa que os machos ($t_{18} = -2,30$, $p < 0,05$). Para os machos, o consumo total na fase 2 foi mais elevado que o consumo individual de cada uma das espécies na fase 1, à exceção de *J. heterophyllus* (Fig. 10). Para as fêmeas o consumo na fase 2 foi mais elevado que o consumo individual de cada espécie na fase 1, mesmo no caso de *J. heterophyllus* (Fig. 10).

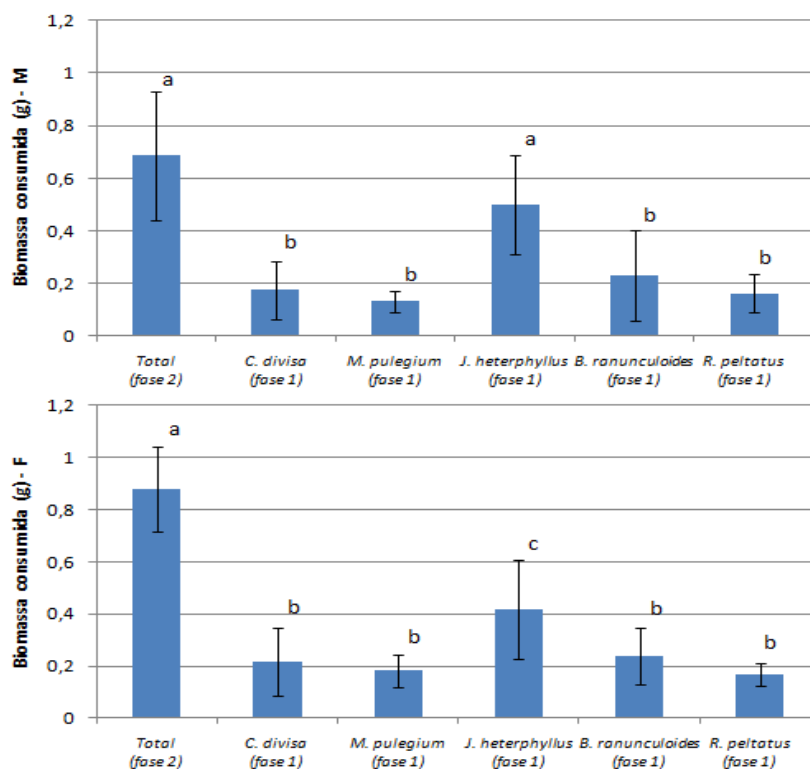


Figura 10- Comparação entre o consumo total de biomassa (g) no teste de preferência e o consumo de cada macrófita nos testes de palatibilidade para os machos (M) e para as fêmeas (F). As barras de erro representam um desvio padrão e as letras *a*, *b* e *c* representam os grupos formados pelo teste *a posteriori* de Tukey.

Comparando os consumos de biomassa nos testes de palatibilidade e no teste de preferência verificou-se que os resultados foram semelhantes entre machos e fêmeas e que existiram correlações significativas entre a biomassa consumida na fase 1 e na fase 2 ($r = 0,93$ e $r = 0,95$; $p < 0,05$, machos e fêmeas respectivamente) (Fig. 11). Os consumos de *J. heterophyllum* foram os mais elevados em ambas as fases, verificando-se uma redução do consumo de *R. peltatus* e *C. divisa* na fase 2.

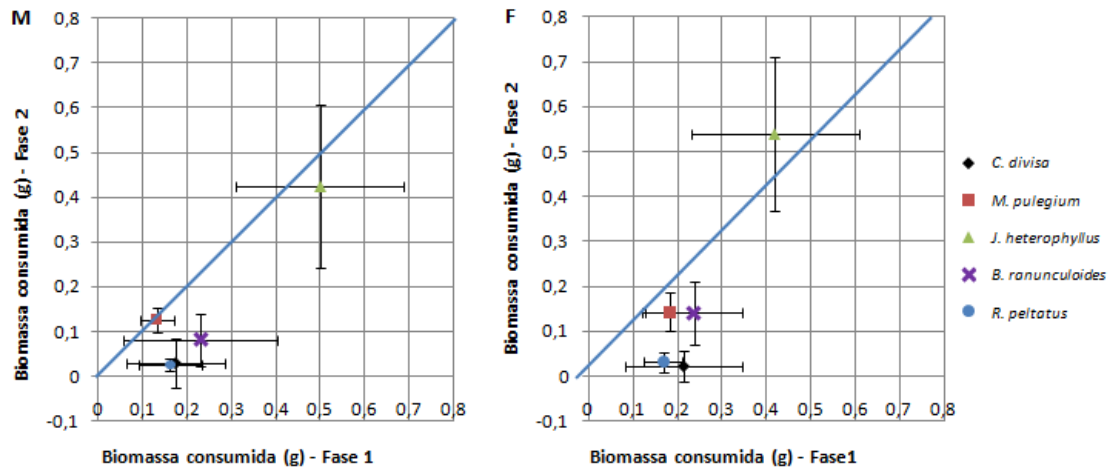


Figura 11- Comparação entre a biomassa média (g) das diferentes macrófitas consumida por machos (M) e por fêmeas (F) de *P. clarkii* nos testes de palatibilidade (fase 1) e no teste de preferência (fase 2). As barras de erro representam um desvio padrão. A recta a azul indica um consumo igual nas duas fases.

Actividade de fragmentação

O número total de fragmentos originados por machos e fêmeas na fase 2 foi semelhante ($t_{18} = -1,22$; $p > 0,05$). Houve diferenças significativas entre o número total de fragmentos produzidos na fase 2 com os produzidos na fase 1 para cada uma das espécies, para ambos os sexos ($F_{5, 54} = 22,16$; $p < 0,001$ e $F_{5, 54} = 29,94$; $p < 0,001$, para machos e fêmeas respectivamente) (Fig. 12). O número de fragmentos produzidos por machos na fase 2 foi semelhante ao registado na fase 1 para as macrófitas *B. ranunculoides*, *R. peltatus* e *J. heterophyllum* e foi mais elevado para *C. divisa* e *M. pulegium*. Nas fêmeas, o número de fragmentos obtidos na fase 2 foi semelhante ao registado para *B. ranunculoides* e *R. peltatus*, na fase 1, e superior ao das restantes espécies .

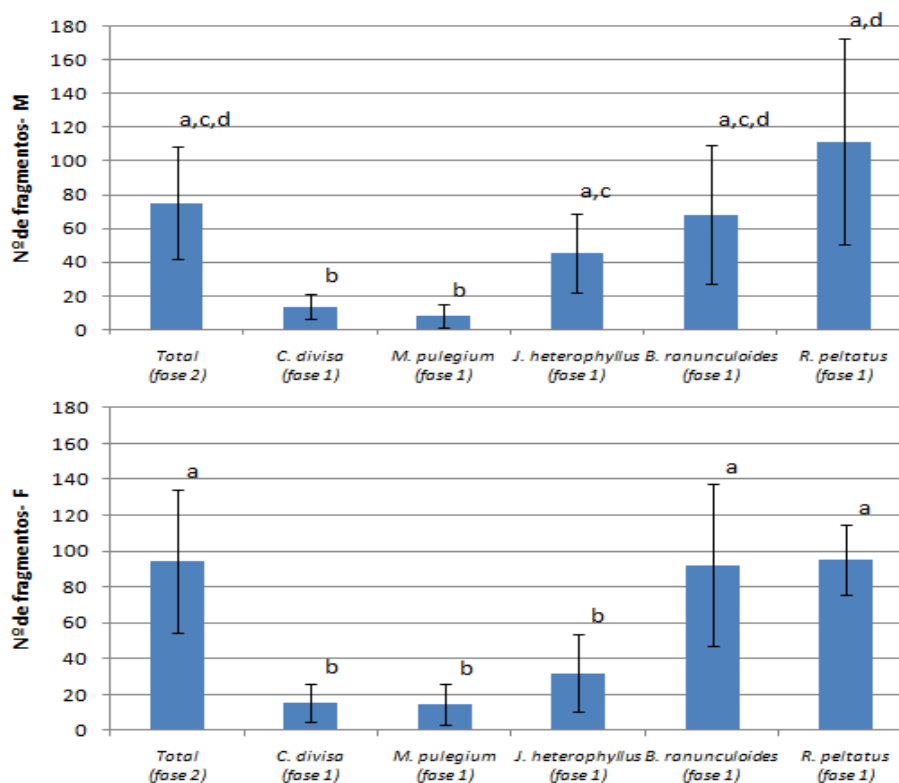


Figura 12- Comparação entre o número total de fragmentos produzidos por machos (M) e por fêmeas (F) na fase 2 e nos vários testes da fase 1. As barras de erro representam um desvio padrão e as letras *a*, *b*, *c* e *d* representam os grupos formados pelo teste *a posteriori* de Tukey.

Não foram encontradas correlações significativas entre o número de fragmentos de cada espécie produzidos nos testes de palatibilidade e no teste de preferência para nenhum dos sexos ($r = 0,83$ e $r = 0,61$; $p > 0,05$ machos e fêmeas respectivamente). De um modo geral, todas as espécies foram menos fragmentadas na fase 2 (Fig. 13). *R. peltatus* foi a espécie mais fragmentada nas duas fases, embora o número de fragmentos tenha diminuído para menos de metade na fase 2. *B. ranunculoides* seguiu um padrão semelhante, mas com uma redução ainda maior na fase 2. O número de fragmentos de *J. heterophyllum* produzido nas duas fases foi relativamente semelhante, especialmente para as fêmeas. *M. pulegium* e *C. divisa* apresentaram um baixo número de fragmentos em ambas as fases, contudo foram mais fragmentadas na fase 1.

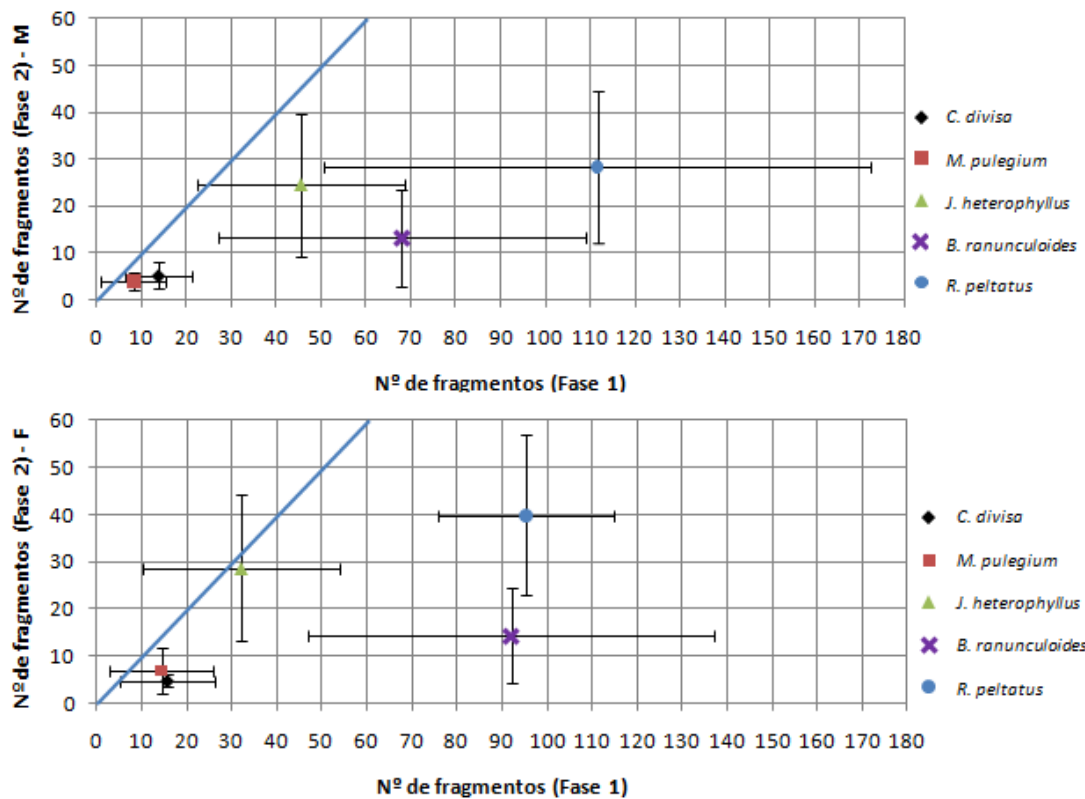


Figura 13- Comparação entre o nº médio de fragmentos originados por machos (M) e por fêmeas (F) nos testes das fases 1 e 2. As barras de erro representam um desvio-padrão e a recta a azul indica um número de fragmentos igual nas duas fases.

Relações consumo/ fragmentação

Nos testes da fase 1 verificou-se uma correlação positiva, embora fraca, entre o consumo de cada espécie e o número de fragmentos em que os talos foram cortados ($r = 0,46$ e $r = 0,28$; $p < 0,05$; para machos e fêmeas respectivamente). *J. heterophyllum* destacou-se por apresentar o consumo mais elevado e valores intermédios no número de fragmentos (Fig. 14). As restantes espécies podem ser divididas em dois grupos: as que apresentaram consumos e números de fragmentos baixas (*C. divisa* e *M. pulegium*), e as que apresentaram consumos baixos e que foram muito fragmentadas (*R. peltatus* e *B. ranunculoides*) (Fig. 14).

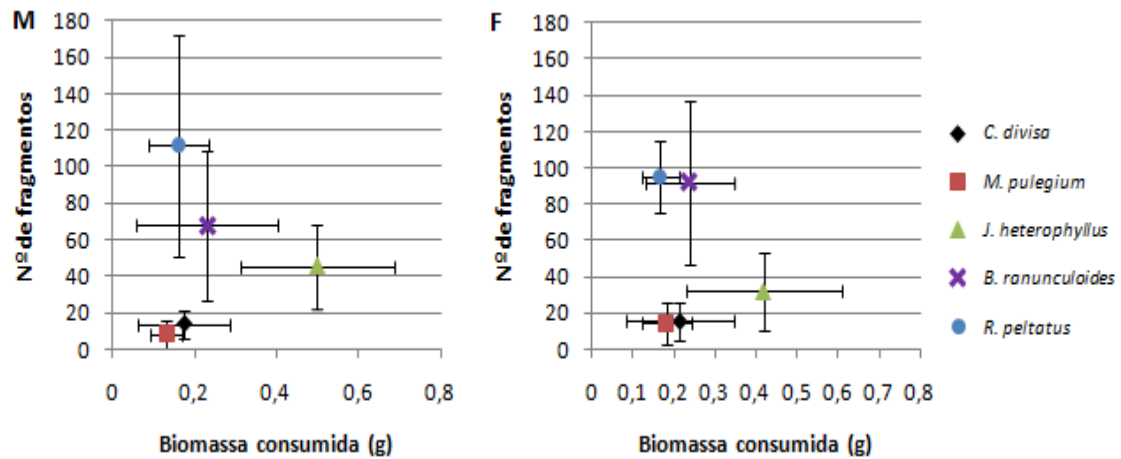


Figura 14- Comparação entre a biomassa consumida (g) e o número de fragmentos produzidos por machos (M) e por fêmeas (F) nos testes da fase 1. As barras de erro representam um desvio padrão.

Na fase 2 detectou-se uma correlação positiva entre a biomassa consumida e o número de fragmentos de cada macrófita apenas nas fêmeas ($r = 0,31$, $p < 0,05$), e não nos machos ($r = 0,28$; $p > 0,05$). Nesta fase, destacou-se a acentuada redução do número de fragmentos de *B. ranunculoides* e *R. peltatus*, mas também a diminuição no consumo de todas as espécies, com exceção de *J. heterophyllum* (Fig. 15).

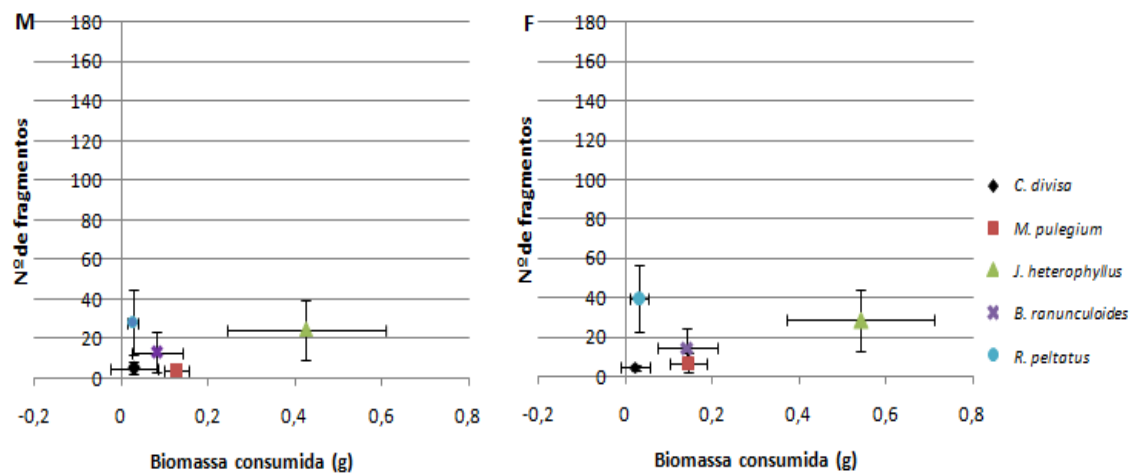


Figura 15- Comparação entre a biomassa média consumida (g) e o número médio de fragmentos produzidos por machos (M) e por fêmeas (F) nos testes da fase 2. As barras de erro representam um desvio padrão.

Monitorização do consumo de macrófitas em charcos naturais

Início da experiência

No charco A a comunidade de macrófitas do compartimento “lagostim” era inicialmente semelhante à do compartimento “controlo” ($\chi^2 = 8,862$; $p < 0,783$) (Fig. 16). No entanto, o mesmo não aconteceu no charco B ($\chi^2 = 20,676$; $p < 0,014$), principalmente devido à maior frequência de *J. heterophyllus* no compartimento “controlo” (Fig. 16).

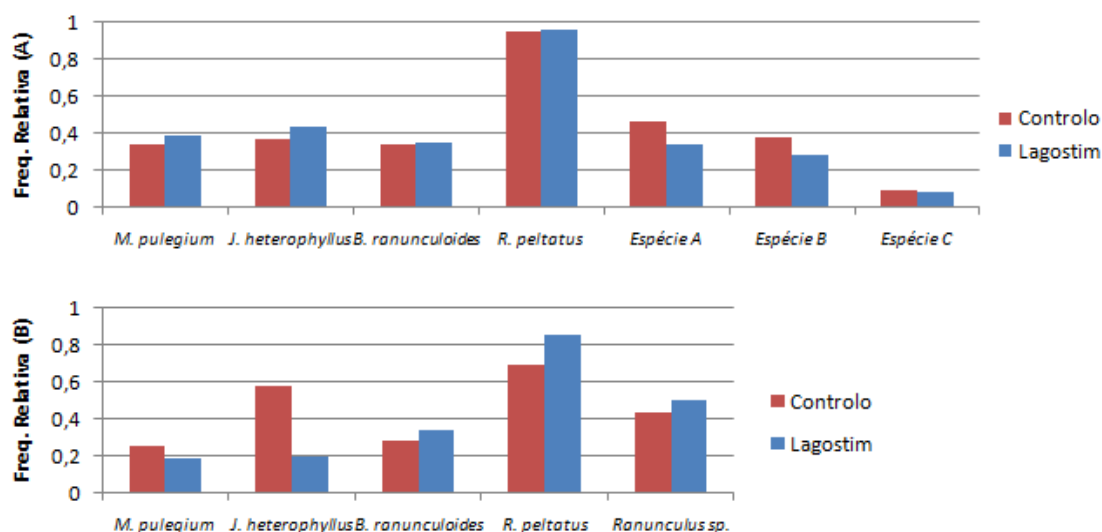


Figura 15- Comparação entre a frequência relativa das macrófitas mais comuns nos dois compartimentos experimentais do charco A (A) e do charco B (B).

No decorrer da experiência, e como resultado de um episódio de chuva intensa, alguns lagostins do compartimento “lagostim” do charco B conseguiram passar para o compartimento controlo, pelo que os resultados deste charco foram descartados.

Final da experiência

As propriedades da água do charco A não sofreram alterações significativas devido à presença dos lagostins, apresentando valores muito semelhantes nos dois compartimentos (Tabela 2).

Tabela 2 Resultados da amostragem das propriedades da água (temperatura (°C), condutividade (S.m/mm2), salinidade (‰) e pH) no fundo e na margem dos tratamentos “controle” e “lagostim”, antes do início e após o término da experiência no charco A.

Charco A	Início				Final			
	Controlo		Lagostim		Controlo		Lagostim	
	Margem	Fundo	Margem	Fundo	Margem	Fundo	Margem	Fundo
Temperatura (°C)	22,56	21,2	22,9	21,63	21,24	21,94	21,1	21,01
Condutividade (S.m/mm2)	17,74	17,37	17,52	17,27	21,6	21,84	20,88	21,55
Salinidade (‰)	11,04	11,13	10,8	10,95	14,1	14,04	13,63	14,1
pH	7,84	7,79	7,62	7,76	8,17	8,62	7,85	7,96

No charco A, os lagostins causaram decréscimos significativos na biomassa total ($t_{16} = 2,247$; $p < 0,05$) e na biomassa de *J. heterophyllus* ($t_{16} = 3,382$; $p < 0,05$) (Fig. 17 e Tabela 1- Anexo 2), assim como um decréscimo significativo do número total de talos ($t_{16} = 2,611$; $p < 0,05$) e marginalmente significativo no número de talos de *J. heterophyllus* ($t_{16} = 2,029$; $p = 0,059$) (Fig. 17 e Tabela 2- Anexo 2).

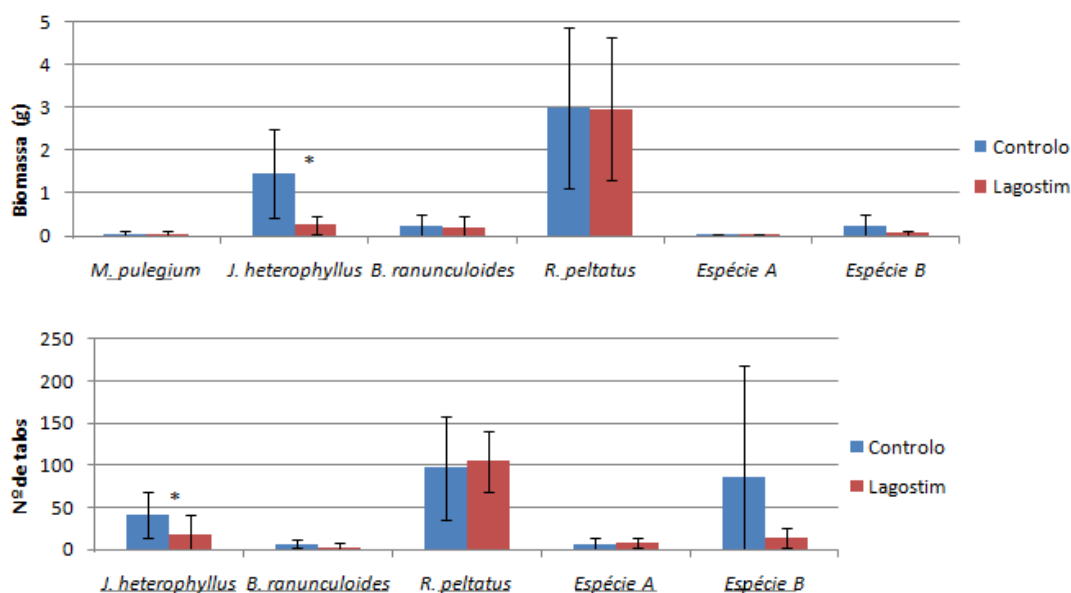


Figura 17- Comparação da biomassa (g) vegetal e do número de talos de cada espécie, amostrados no fundo dos compartimentos “controle” e “lagostim” no charco A após o término da experiência. As barras de erro representam um desvio padrão. * Assinala as diferenças significativas ($p < 0,05$).

A comparação do número de talos flutuantes cortados por *P. clarkii* no charco A revelou um número significativamente maior de fragmentos de *J. heterophyllus* ($Z = -2,611$; $p < 0,05$), *R. peltatus* ($Z = -2,611$; $p < 0,05$), espécie A ($Z = -2,611$; $p < 0,05$) e

espécie B ($Z = -1,984$; $p < 0,05$) no compartimento “lagostim” (Fig. 18 e Tabela 3-Anexo 2).

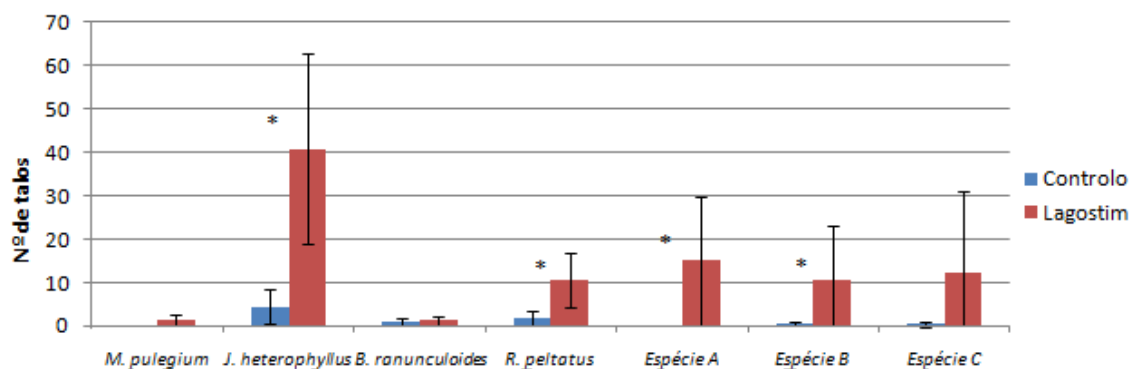


Figura 18- Comparação entre o número de talos flutuantes de cada espécie, nos compartimentos “controlo” e “lagostim” do charco A. As barras de erro representam um desvio padrão. * Assinala as diferenças significativas ($p < 0,05$).

Após o final da experiência foram recapturados cerca de 70 lagostins no compartimento “lagostim” do charco A e na análise dos conteúdos estomacais foram encontrados vestígios de matéria vegetal.

Comparação entre as duas abordagens

Numa invasão de curta duração (21 dias), e assumindo uma densidade de 5 lagostins/ m^2 , o impacto poderá ser significativo em todas as espécies de macrófita, para todas as intensidades de consumo testadas, à excepção de *R. peltatus* que sofrerá consumos pouco importantes em qualquer situação (Fig. 19 A). Tendo em consideração uma invasão de longa duração (até 3 meses) a magnitude dos resultados sofreria grandes alterações. À excepção da espécie *R. peltatus*, todas as outras espécies seriam consumidas em quantidades semelhantes às existentes naturalmente no charco, para todas as intensidades de consumo testadas (Fig. 19 B).

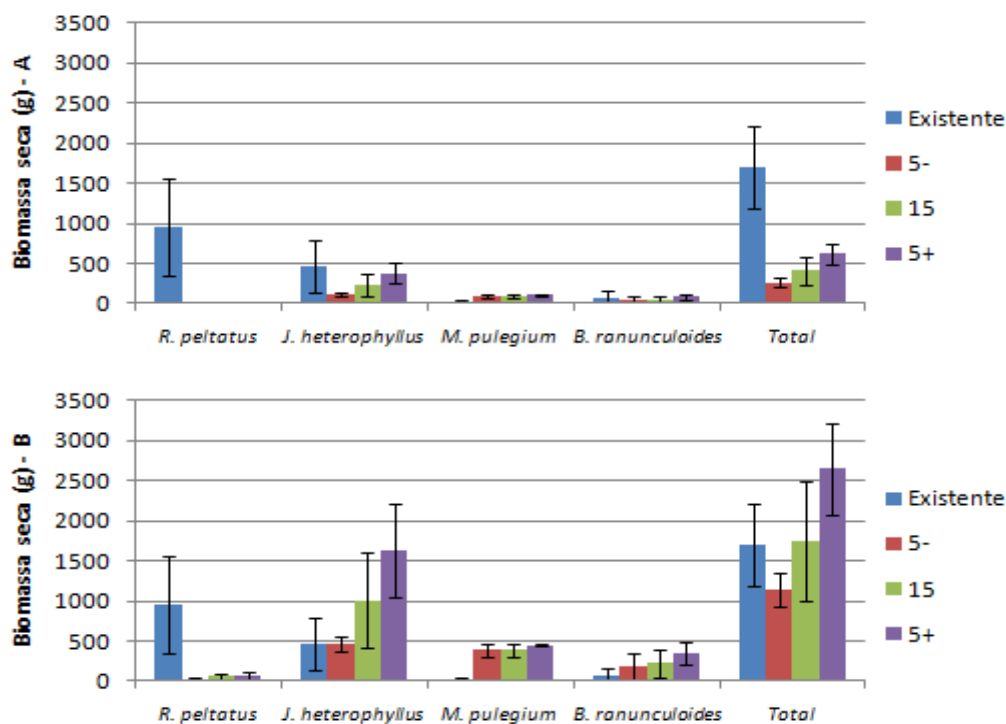


Figura 19- Comparação entre a estimativa da biomassa existente no compartimento “controle” do charco A no final da experiência e a estimativa da biomassa das espécies *R. peltatus*, *J. heterophyllus*, *M. pulegium* e *B. ranunculoides*, e total, consumida por *P. clarkii* com uma densidade de 5 indivíduos/m² durante 21 dias (A) e durante 90 dias (B) tendo em conta as intensidades de consumo 5-, 15 e 5+ (ver texto). As barras de erro representam um desvio padrão.

DISCUSSÃO

Este trabalho evidenciou que *P. clarkii* demonstrou uma preferência clara por uma das espécies estudadas enquanto rejeita outras duas, e que essa seleção poderá ter como base um compromisso entre várias propriedades das macrófitas (morfologia, dureza, valor nutritivo e presença de metabolitos secundários), pelo que as preferências alimentares desta espécie não podem ser previstas com base apenas numa destas características. De uma forma geral as preferências e os consumos não variaram com o sexo, embora as fêmeas tenham apresentado um consumo mais elevado que os machos quando tiveram possibilidade de escolha entre as diferentes espécies de macrófita. Com recurso a uma experiência de inclusão/ exclusão em condições naturais, verificou-se uma apropriação significativa da biomassa de macrófitas por *P. clarkii*, e ainda que os efeitos da destruição mecânica também podem ser importantes. Finalmente,

comprovou-se que testes em laboratório podem ser utilizados para prever os impactos de *P. clarkii* sobre as comunidades de macrófitas de charcos temporários.

De uma forma geral, os consumos brutos observados são semelhantes aos relatados por outros autores. A biomassa fresca média consumida diariamente por *P. clarkii* no teste de preferência foi 1,17 g. Este valor foi um pouco mais elevado que o valor de consumo diário obtido por Cronin *et al.* (2002) (0,44 g). A diferença de valores pode dever-se a diferenças nos tamanhos dos lagostins utilizados nas experiências e/ou a diferenças no jejum dos lagostins. O peso húmido dos lagostins utilizados nos testes variou entre 14-27 g (Carreira, *obs. pess.*), correspondendo assim, o consumo médio diário a 4-8% do peso total dos lagostins. Avault *et al.* (1981), em trabalhos sobre a produção e exploração de *P. clarkii* alimentaram os indivíduos desta espécie com ração correspondente a 3% do seu peso total, ao passo que, segundo Ilhéu e Bernardo (1993), 7% do peso húmido total de um indivíduo é suficiente para o alimentar *ad libitum*. Os limites destas estimativas (3-7%) são assim muito semelhantes aos obtidos no teste de preferência do presente trabalho. Nos testes de palatibilidade a biomassa média consumida das espécies preteridas foi muito semelhante em todos os tratamentos ($\approx 0,067$ g/dia). Este valor pode representar o consumo mínimo necessário de matéria vegetal para *P. clarkii* satisfazer as suas necessidades nutricionais mais básicas, uma vez que corresponde a cerca de 2% do peso médio dos lagostins utilizados, um valor próximo do fornecido a *P. clarkii* por Avault *et al.* (1981).

Tal como nos trabalhos de Cronin *et al.* (2002), *P. clarkii* demonstrou uma clara preferência alimentar entre as espécies de macrófitas testadas, seleccionando neste estudo *J. heterophyllus*, e rejeitando *C. divisa* e *R. peltatus*. Sabe-se pouco acerca das propriedades das macrófitas que determinam as preferências alimentares dos herbívoros dos ecossistemas de água doce; porém algumas características, tais como a estrutura (morfologia, dureza), o valor nutritivo e a presença de metabolitos secundários foram já referidos. É provável que *P. clarkii*, tal como outros herbívoros generalistas e omnívoros, tenha por base das suas escolhas alimentares várias propriedades das plantas. Cronin *et al.* (2002) referem uma preferência de *P. clarkii* por macrófitas que apresentam morfologias filamentosas ou com ramificações finas como *Oedogonium*,

Chara e *Ceratophyllum*, dado que são mais fáceis de manipular e consumir. Nenhuma das espécies estudadas neste trabalho pertence a estes géneros; no entanto a morfologia de *R. peltatus*, *B. ranunculoides* e *J. heterophyllus* é semelhante à dos géneros acima referidos. Sheldon (1987) demonstrou que, em habitats aquáticos, as plantas de crescimento rápido são mais saborosas que as de crescimento lento, o que pode estar relacionado com o pouco ou nulo investimento em metabolitos secundários para defesa por parte da planta, e com a própria dureza da planta (caules e folhas mais tenros). *B. ranunculoides*, *J. heterophyllus* são hidrófitas ou helófitas de crescimento rápido, não apresentam metabolitos secundários conhecidos que possam actuar como inibidores do consumo por parte do lagostim e, usando principalmente a água como meio de suporte, são menos duras que as restantes espécies. Cronin *et al.* (2002) referem também que elevadas concentrações de proteínas e azoto e elevado peso seco estarão relacionados positivamente com o valor nutritivo das plantas. Tendo em conta o peso seco das espécies estudadas como indicador do seu valor nutritivo, as mais nutritivas seriam *C. divisa*, *J. heterophyllus* e *M. pulegium*. Esta última espécie contém um composto tóxico, o mentofurano, que contudo parece não ter afectado o consumo por *P. clarkii*, uma vez que na fase 1 o seu consumo foi semelhante ao de outras três espécies e na fase 2 o seu consumo decresceu apenas ligeiramente.

Entre todas as espécies estudadas, *J. heterophyllus* reúne todas as características favoráveis mencionadas antes: apresenta uma morfologia filamentosa, tem crescimento rápido, é uma planta “tenra”, não se conhecem metabolitos secundários inibidores de consumo nesta espécie e apresenta o segundo peso seco mais elevado. Nenhuma das outras espécies reúne todas estas características. *C. divisa*, apesar de apresentar o peso seco mais elevado entre todas as espécies, é a macrófita menos ramificada e com estrutura mais rígida, pelo que a selecção negativa desta espécie era já esperada. Já a selecção negativa de *R. peltatus* constituiu uma surpresa. Os talos desta espécie (a mais filamentosa de todas as oferecidas nas experiências) foram bastante fragmentados na fase 1, mas esta foi outra espécie claramente rejeitada na fase 2. A presença de metabolitos secundários como alcalóides ou glicósidos é conhecida entre as ranunculáceas (Núñez & Castro, 1991), mas desconhecida nesta espécie em particular. Supomos no entanto que esta razão, assim como o baixo teor nutritivo possam ter contribuído para a sua rejeição por *P. clarkii*. Assim, é provável que a estrutura e o teor

nutritivo sejam determinantes na palatibilidade das macrófitas para *P. clarkii* e ainda que as preferências alimentares desta espécie sejam também influenciadas por outras propriedades das macrófitas, como a presença de metabolitos secundários.

Vários trabalhos (Rodríguez *et al.* 2003; Geiger *et al.*, 2005) referem a ocorrência de impactos de *P. clarkii* sobre macrófitas de charcos temporários não causados directamente pelo seu consumo. Neste trabalho quantificou-se, pela primeira vez em laboratório, a destruição mecânica das macrófitas resultante da actividade de *P. clarkii*. Esta destruição pode ser bastante séria, mesmo nas macrófitas onde se verificou menor consumo, como *R. peltatus*. A característica que mais parece potenciar este comportamento é a estrutura da planta. Cronin *et al.* (2002) documentaram uma preferência deste lagostim por macrófitas com morfologias filamentosas ou com ramificações finas, devido à maior facilidade de manipulação e consumo; no entanto, após a remoção das barreiras estruturais das outras espécies, as preferências de *P. clarkii* alteraram-se. Esta alteração indica que a estrutura pode ser determinante e que as macrófitas podem sofrer impactos significativos apenas por apresentarem uma estrutura mais favorável à fragmentação pelo lagostim. Contudo, as experiências realizadas neste trabalho mostraram que podendo escolher, e na presença de espécies que constituam um melhor recurso alimentar, a destruição mecânica das macrófitas diminui de forma significativa. Um exemplo disto foi a acentuada redução do número de fragmentos de *B. ranunculoides* e *R. peltatus* no teste de preferência em comparação com os testes de palatibilidade. A experiência realizada em condições naturais apoia esta conclusão, dado que o maior número de talos cortados pertenceu a *J. heterophyllus*, tendo sido também esta a espécie mais consumida. Assim, espera-se que na natureza os impactos de *P. clarkii* sejam notórios primeiramente nas espécies preferidas, com impactos pouco significativos nas restantes, embora após uma depleção das macrófitas preferidas possam ocorrer impactos significativos também nas outras espécies.

Tal como Leberfinger e Bohman (2010), também neste trabalho detectámos um fenómeno de sobreconsumo no teste de preferência, ou seja, a biomassa total, das 5 espécies em estudo, consumida no teste de preferência foi superior à biomassa consumida em cada um dos testes de palatibilidade. Considerando que a biomassa total consumida no teste de preferência pode aproximar-se do consumo máximo (Leberfinger & Bohman, *op. cit.*), nas fêmeas o consumo nos testes de palatibilidade foi

significativamente mais baixo que o consumo máximo, qualquer que fosse a macrófita considerada, e nos machos apenas *J. heterophyllus* foi consumido com valores semelhantes ao máximo. Podendo escolher, as fêmeas exploraram assim os recursos mais intensamente, indicando que os requisitos alimentares destas serão maiores que os dos machos. Outros autores não encontraram diferenças significativas entre as preferências alimentares de machos e fêmeas (Geiger *et al.* 2005). Contudo, sabe-se que a baixas latitudes esta espécie pode reproduzir-se no Outono e na Primavera (Scalici & Gherardi 2007). Uma vez que os lagostins utilizados nos testes foram capturados maioritariamente durante o mês de Abril pouco depois da época de reprodução da Primavera (Cruz *et al.*, 2004), a maior voracidade das fêmeas pode representar a reposição das reservas energéticas dispendidas durante esse período.

Não ocorreu um fenómeno equivalente de “sobrefragmentação” na fase 2 - o número total de fragmentos originados nesta fase foi superior ao número de fragmentos produzidos nos testes de palatibilidade apenas para as espécies *C. divisa* e *M. pulegium* (e *J. heterophyllus* no caso das fêmeas).

Os resultados dos testes de palatibilidade indicaram uma preferência clara por *J. heterophyllus*. Além do elevado consumo, esta foi também uma das espécies mais fragmentadas. Na fase 2 acentuou-se a preferência por *J. heterophyllus*, essencialmente por se verificar uma maior rejeição das outras espécies, uma vez que tanto o consumo como o número de fragmentos de *J. heterophyllus* foram muito semelhantes em ambas as fases. Contrariamente ao que ocorreu na fase 1, verificaram-se diferenças significativas entre os consumos das restantes espécies e ainda uma redução acentuada do número de fragmentos de *B. ranunculoides* e *R. peltatus*, as espécies com maior número de fragmentos na fase 1. Desta forma, os resultados da fase 2 sugerem que, quando teve possibilidade de escolha, *P. clarkii* manteve a preferência por *J. heterophyllus* e rejeitou *C. divisa*, e *R. peltatus*. Em termos de consumo, a rejeição de *B. ranunculoides* e *M. pulegium* não foi tão acentuada como nas espécies anteriores. Assim, podendo escolher e tendo acesso a recursos variados, *P. clarkii* ter-se-á comportado de forma a equilibrar a sua dieta e a conseguir todos os nutrientes necessários. Este comportamento manifestou-se pelo consumo de macrófitas com elevado teor nutritivo, mas também pelo consumo, em menor quantidade, de outras espécies de forma a complementar a sua dieta. Os resultados indicam também que a

destruição mecânica das macrófitas por *P. clarkii* é uma actividade exploratória, que se reduz significativamente na presença de espécies que constituam um melhor recurso alimentar.

A fase 2 foi determinante para demonstrar a selectividade de *P. clarkii* e identificar as macrófitas preferidas e as rejeitadas e os factores que influenciaram este comportamento. No entanto, esta interpretação esteve dependente da realização dos testes da fase 1. Desta forma, este trabalho reforça a opinião de Underwood *et al.* (2004) de que apenas através de um desenho experimental que englobe testes de palatibilidade e preferência se pode demonstrar a existência de preferências alimentares. Contudo, segundo Leberfinger e Bohman (2010) a estatística empregue por Underwood *et al.* (2004) poderá levar à perda de informação. Deste modo, para extrair a maior quantidade de informação possível das experiências efectuadas, compararam-se os consumos absolutos das várias espécies em cada uma das fases separadamente (Leberfinger & Bohman, 2010).

Na experiência em condições naturais voltou a confirmar-se a selecção positiva de *J. heterophyllus* por *P. clarkii* - no compartimento “lagostim”, verificou-se uma redução significativa da biomassa e do número de talos apenas desta macrófita. Este comportamento indica que a depleção de recursos nos charcos pode ocorrer por fases, ou seja, que *P. clarkii* consome principalmente as espécies preferidas e só depois as restantes, representando uma maior ameaça para as espécies que selecciona de forma positiva como é o caso de *J. heterophyllus*. Verificou-se uma diferença significativa no número de talos cortados que flutuavam à superfície da água das espécies *J. heterophyllus*, *R. peltatus*, Espécie A e Espécie B. O corte destes talos foi provavelmente o resultado da actividade exploratória de *P. clarkii* e é concordante com o que ocorreu nas experiências de laboratório, sendo expectáveis a fragmentação de *J. heterophyllus* (a espécie mais consumida) e de *R. peltatus* (a espécie mais fragmentada). As espécies A e B não foram testadas em laboratório. A sua fragmentação em condições naturais deveu-se provavelmente à morfologia destas espécies, uma vez que ambas eram filiformes, muito ramificadas e tenras, sendo, portanto, fáceis de cortar durante a actividade exploratória do lagostim.

Neste trabalho, as experiências realizadas em laboratório corroboraram a importância e a extensão dos impactos de *P. clarkii* sobre as macrófitas de charcos temporários numa experiência realizada em condições naturais. Os resultados dos testes efectuados nas duas abordagens foram essencialmente os mesmos, e foram coerentes entre si em ambas as abordagens. Outros autores já demonstraram a transitividade dos resultados obtidos em laboratório para situações na natureza em estudos com algumas espécies de lagostim (Charlebois & Lamberti; Creed & Reed, 2004). Contudo, esta transitividade está certamente dependente da complexidade dos fenómenos em análise e do ecossistema que se pretende replicar. No nosso caso, as experiências foram realizadas em charcos temporários que apresentam uma estrutura relativamente simples e fortemente hierarquizada (Geiger *et al.*, 2005) e testámos apenas dois tipos de resposta por parte de *P. clarkii*- o consumo directo e a fragmentação, o que pode ter facilitado a comparação entre as duas abordagens.

A ocorrência desta transitividade permitiu um pequeno exercício de modelação em que se considerou a igualdade de comportamentos dos lagostins no teste de preferência e no charco e, independentemente da vegetação que tivessem à disposição e do tempo de permanência no charco. Os resultados deste exercício mostraram que, em apenas 21 dias, se terá verificado uma apropriação significativa da produção primária no charco “A” por parte de *P. clarkii* e que, numa situação de invasão de longa duração (90 dias, ver texto), esta espécie terá uma significativa capacidade de remoção da vegetação dos charcos. No entanto, não foi quantificada a capacidade de regeneração e de crescimento das macrófitas em condições naturais, que poderá compensar algum do consumo, pois muitas destas espécies têm um crescimento rápido.

A principal crítica ao desenho experimental das experiências de inclusão/exclusão é a inexistência de replicados. A colocação das vedações, a construção dos compartimentos experimentais e todos os restantes preparativos envolveram um esforço muito significativo, quer em mão de obra, quer financeiro, e seria impraticável a preparação e a amostragem dos vários parâmetros num maior número de charcos. Visto que as experiências decorreriam apenas em 2 charcos, tentou-se maximizar a obtenção de informação biologicamente relevante, introduzindo densidades diferentes de lagostim nos dois charcos.

As experiências na natureza são sempre complexas devido à multiplicidade de factores envolvidos e, muitas vezes, surgem situações imprevistas. Apesar da barreira física entre os compartimentos “controlo” e “lagostim”, a passagem de lagostins entre os dois compartimentos do charco B inviabilizou a experiência neste charco. Por outro lado, foi impossível garantir a manutenção das densidades de lagostim ao longo de toda a experiência, dada a morte de alguns indivíduos ou a predação por mamíferos (sete casos confirmados). Contudo, apesar de todos estes constrangimentos, obtiveram-se resultados concordantes com os obtidos em laboratório, o que demonstra a viabilidade da metodologia aplicada, que certamente poderá sofrer alterações e ser melhorada.

As experiências realizadas nos charcos envolveram, ainda, a amostragem das comunidades de anfíbios e de macroinvertebrados, com o objectivo de avaliar o impacto de *P. clarkii* nestes grupos. Outros parâmetros como a turbidez da água, o fitoplâncton, o zooplâncton, o crescimento de perifíton ou a taxa de decomposição da folhada foram também estudados. Os resultados relativos a estas variáveis serão objecto de um futuro trabalho.

Os charcos temporários mediterrânicos são dominados por organismos autotróficos e apresentam uma cadeia trófica com uma estrutura simples, muito hierarquizada, onde as macrófitas ocupam uma posição central (Geiger *et al.*, 2005). As principais consequências da colonização destes habitats por *P. clarkii* são a redução do número de níveis tróficos, o decréscimo da importância das macrófitas, herbívoros e carnívoros primários, a existência de mais energia disponível para os predadores de topo (Geiger *et al.*, 2005) e a mudança de corpos de águas claras para águas turvas, onde a produção primária é, sobretudo realizada pelo fitoplâncton (Rodríguez *et al.* 2003).

Estas alterações na estrutura funcional da teia trófica têm, certamente, implicações para as várias comunidades presentes nos charcos temporários mediterrânicos. Assim, e com base no presente trabalho, prevê-se que nas zonas recentemente colonizadas ocorra uma diminuição drástica das macrófitas com características semelhantes às de *J. heterophyllus*, ou seja, que constituam um recurso alimentar facilmente acessível pelo lagostim, com pesos secos elevados, cujo consumo não seja limitado pela dureza ou inibido pela presença de metabolitos secundários. As macrófitas de crescimento rápido

poderão sofrer impactos muito significativos, uma vez que devido à sua estratégia de vida normalmente não apresentam defesas contra a herbivoria e, a nível morfológico, apresentam uma dureza reduzida e ramificações finas. Nas zonas em que a colonização é mais antiga pode até já ter ocorrido o desaparecimento total ou quase total das macrófitas com um compromisso teor nutritivo/estrutura semelhante ao de *J. heterophyllus*. É também expectável um aumento da destruição mecânica das macrófitas menos preferidas à medida que a abundância das macrófitas seleccionadas diminui. Na ausência de macrófitas preferidas, é expectável que o impacto por destruição mecânica seja bastante elevado, e que possa também ocorrer o desaparecimento de macrófitas menos preferidas. Algumas observações pessoais parecem suportar estes cenários: nas ribeiras junto à área de estudo em que a colonização por *P. clarkii* foi confirmada, *R. peltatus*, uma das macrófitas menos consumidas nos testes de laboratório, ainda é abundante, não parecendo ter sofrido um impacto da presença do lagostim, ao passo que nas valas de escoamento de água dos arrozais, onde a colonização é mais antiga e as abundâncias de *P. clarkii* mais elevadas, não foi encontrado qualquer tipo de vegetação aquática flutuante, apenas canas, *Phragmites australis*, suficientemente duras para evitar o ataque por *P. clarkii*.

Dado o carácter central da comunidade de macrófitas na cadeia trófica dos charcos temporários mediterrânicos, é previsível que um impacto sério nesta comunidade se propague e afecte as comunidades desta dependentes. Assim, nos charcos temporários do Sudoeste da Península Ibérica, as comunidades mais seriamente afectadas pelo desaparecimento das macrófitas serão a dos herbívoros e a dos consumidores primários. Alguns herbívoros, gastrópodes e larvas de anfíbios essencialmente, podem não se alimentar directamente das macrófitas, mas sim do perifíton que cresce sobre estas. Embora se tenha demonstrado que a presença de lagostins pode aumentar o conteúdo de clorofila e a produtividade do perifíton (Charlebois & Lamberti, 1996), com o desaparecimento das macrófitas a superfície de fixação é drasticamente reduzida, o que causa uma diminuição na biomassa de perifíton. Deste modo, a herbivoria de *P. clarkii* e a destruição mecânica das macrófitas causam uma alteração significativa na disponibilidade de alimento para os herbívoros e, possivelmente uma diminuição da sua abundância. Consequentemente, os consumidores primários serão afectados pela diminuição das suas presas e porque, devido ao seu

tamanho, não conseguem explorar *P. clarkii* como recurso alimentar. A alteração das comunidades dos charcos temporários pode ter outras consequências além dos impactos causados pela complexificação da teia trófica. Por exemplo, quase todas as espécies de anfíbios (*Triturus* sp.; *Pelodytes ibericus*, *Rana perezi*, *Hyla* sp., etc) utilizam a vegetação aquática para prender as suas posturas e o desaparecimento das macrófitas pode reduzir a qualidade e a quantidade de locais apropriados para a oviposição. Assim, a alteração na estrutura dos charcos pode contribuir para a exclusão dos anfíbios por parte de *P. clarkii* documentada em Cruz *et al.* (2006 a, b).

A metodologia empregue para estudar os impactos de *P. clarkii* sobre macrófitas dificilmente pode ser usada a larga escala, devido aos custos e ao trabalho envolvidos. Contudo, é possível monitorizar charcos naturais com e sem *P. clarkii* e verificar quais as alterações que ocorrem na comunidade de macrófitas, assim como estudar quais as consequências, ao nível do ecossistema, da remoção das macrófitas. Por outro lado, de forma a compreender melhor os processos associados à selecção e ao uso dos recursos por *P. clarkii* ao longo do tempo, podem também comparar-se comunidades de macrófitas de locais com diferentes tempos de colonização por parte deste lagostim.

P. clarkii é uma espécie invasora de sucesso em praticamente todos os locais em que foi introduzido, proporcionando uma boa oportunidade para estudar as interacções entre uma espécie exótica e as comunidades nativas dos ecossistemas invadidos. Esta espécie pode alterar drasticamente o funcionamento dos ecossistemas de água doce que invade e, na Europa, tem potencial para se tornar uma das espécies dominantes nestes ecossistemas (Gherardi & Acquistapace, 2004). Esta espécie está relativamente bem estudada e a informação disponível permite afirmar que representa uma ameaça séria à biodiversidade nas zonas húmidas da Europa. Embora, a maior parte dos habitats com condições adequadas já tenham sido colonizados, é urgente impedir a invasão das restantes áreas. *P. clarkii* distribui-se por diversos países na Europa e, portanto, seria muito vantajosa a criação de um programa europeu no sentido de, por um lado, identificar as áreas vulneráveis e impedir a invasão por este lagostim, e por outro, gerir as populações de *P. clarkii* nas áreas colonizadas para que causem menos impactos (Geiger *et al.*, 2005). Uma das hipóteses passa por explorar o lagostim como recurso (Anastácio *et al.* 1999 a, b; Nielsen *et al.*, 1999), uma vez que, tendo em conta a elevada plasticidade e resiliência desta espécie, muito dificilmente poderá ser erradicada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Adão, M. H. S. M. 1991. *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda, Cambaridae) espécie exótica em Portugal. Considerações sobre a ecobiologia e aspectos da sua biologia populacional na barragem de Monte Novo (Alentejo, Portugal). *Provas de aptidão pedagógica e científica. Universidade de Évora*, 134 pp.
- Anastácio, P. M. S. G. 1993. Ciclo Biológico e produção do lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*, Girard) na região do baixo Mondego. *Provas de Mestrado em Ecologia Animal*. 119 pp.
- Anastácio, P.M., Nielsen, S.N., Marques, J.C. 1999 a. CRISP (crayfish and rice integrated system of production): 2. Modelling crayfish (*Procambarus clarkii*) population dynamics. *Ecological Modelling* **123**:5–16.
- Anastácio, P.M., Nielsen, S.N., Frias, A.F., Marques, J.C. 1999 b. CRISP (crayfish and rice integrated system of production): 4. Modelling water, algae and oxygen dynamics. *Ecological Modelling* **123**:29–40.
- Angeler, D. G., Sánchez-Carrillo, S., García, G., Alvarez-Cobelas, M. 2001. The influence of *Procambarus clarkii* (Cambaridae, Decapoda) on water quality and sediment characteristics in a Spanish floodplain wetland. *Hydrobiologia* **464**:89–98.
- Aquiloni, L., & Gherardi, F. 2008. Extended mother-offspring relationships in invasive crayfish. *Ethology* **114**:946-954.
- Avault, J. W., Jr., Romaine, R. P., Miltner, M. R. 1981. Feeds and forages for red swamp crawfish, *Procambarus clarkii*,: 15 years research at Louisiana State University.
- Cambray, J. A. 2003. Impact on indigenous species biodiversity caused by the globalization of alien recreational freshwater fisheries. *Hydrobiologia* **500**:217–230.
- Campos, M., Grillas, P., Fernández, J., Camacho, A., Guimarães, A. 2008. *Management of Natura 2000 habitats-Mediterranean temporary ponds*. European Commission, 23 pp.

- Charlebois, P. M., & Lamberti, G. A. 1996. Invading Crayfish in a Michigan Stream: Direct and Indirect Effects on Periphyton and Macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* **15**:551-563.
- Correia, A. M. 2002. Niche breadth and trophic diversity: feeding behaviour of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal). *Acta Oecologica* **23**:421–429.
- Correia, A. M., Bandeira, N., Anastácio, P. M. 2005. Predator–prey interactions of *Procambarus clarkii* with aquatic macroinvertebrates in single and multiple prey systems. *Acta Oecologica* **28**:337–343.
- Correia, A. M., & Anastácio, P. M. 2008. Shifts in aquatic macroinvertebrate biodiversity associated with the presence and size of an alien crayfish. *Ecological Research* **23**:729 – 734.
- Creed, R. P. Jr. & Reed, J. M. 2004. Ecosystem engineering by crayfish in a headwater stream community. *Journal of the North American Benthological Society* **23**:224–236.
- Cronin, G., Lodge, D. M., Hay, M. E., Miller, M., Hill, A. M., Horvath, T., Bolser, R. C., Lindquist, N., Wahl, M. 2002. Crayfish feeding preferences for freshwater macrophytes: the influence of plant structure and chemistry. *Journal of Crustacean Biology* **22**:708–718.
- Cruz, M.J., Andrade, P., Pascoal, S., Rebelo, R., 2004. Colonização anual de charcos temporários pelo lagostim-vermelho-americano, *Procambarus clarkii*. *Revista de Biologia (Lisboa)* **22**:79-90.
- Cruz, M. J., & Rebelo, R. 2005. Vulnerability of Southwest Iberian amphibians to an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*. *Amphibia-Reptilia* **26**:293–303.
- Cruz, M. J., Rebelo, R., Crespo, E. G. 2006 *a*. Effects of an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, on the distribution of south-western Iberian amphibians in their breeding habitats. *Ecography* **29**:329-338.

- Cruz, M. J., Pascoal, S., Tejedo, M., Rebelo, R. 2006 *b*. Predation by an exotic crayfish, *Procambarus clarkii*, on natterjack toad, *Bufo calamita*, embryos: it's role on the exclusion of this amphibian from its breeding ponds. American Society of Ichthyologists and Herpetologists **2**:274–280.
- Cuttelod, A., García, N., Malak, D.A., Temple, H., Katariya, V. 2008. The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. In: J.-C. Vié, C. Hilton-Taylor and S.N. Stuart (eds). The 2008 Review of The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN Gland, Switzerland.
- Dawes, A. J. 1981. The Louisiana Red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) – a crustacean suitable for classroom use. Journal of Biological Education **15**:25-30.
- Devin, S., Beisel, J. -N., Bachmann, V., Moreteau, J. C. 2001: *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda: Gammaridae): another invasive species newly established in the Moselle River and French hydrosystems. Annales de Limnologie – International Journal of Limnology **37**: 21–27.
- Diéguez-Uribeondo, J., & Söderhäll, K. 1993. *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. Aquaculture and Fisheries Management **24**:761–765.
- European Pond Conservation Network 2007. Developing the Pond Manifesto. Annual Limnology- International Journal of Limnology **43**:221-232.
- Ellrott, B. J., Marsden, J. E., Fitzsimons, J. D., Jonas, J. L., Claramunt, R. M. 2007. Effects of temperature and density on consumption of trout eggs by *Orconectes propinquus* and *O. rusticus*. Journal of Great Lakes Research **33**:7-14.
- Enríquez, S., García-Murillo, P., Montes, C., Amat, J. A. 1987. Macrófitos acuáticos de la laguna costera de El Portil (Huelva). IV Congreso Español De Limnología. Sevilla.
- Fitzsimons, J., Williston, B., Williston, G., Bravener, G., Jonas, J. L., Claramunt, R. M., Marsden, J. E., Ellrott, B. J. 2006. Laboratory estimates of salmonine egg predation by round gobies (*Neogobius melanostomus*), sculpins (*Cottus cognatus* and *C. bairdi*), and crayfish (*Orconectes propinquus*). Journal of Great Lakes Research **32**:227–241.

- Flinders, C. A., & Magoulick, D. D. 2007. Effects of depth and crayfish size on predation risk and foraging profitability of a lotic crayfish. *Journal of the North American Benthological Society* **26**:767–778.
- Gamradt, S. C. & Kats, L. B. 1996. Effect of introduced crayfish and mosquito fish on California newts (*Taricha torosa*). *Conservation Biology* **10**:1155–1162.
- García-Berthou, E., Alcaraz, C., Pou-Rovira, Q., Zamora, L., Coenders, G., Feo, C. 2005. Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**:453–463.
- Geiger, W., Alcorlo, P., Baltanás, A., Montes, C. 2005. Impact of an introduced Crustacean on the trophic webs of Mediterranean wetlands. *Biological Invasions* **7**:49 – 73.
- Gherardi, F., & Daniels, W. H. 2004. Agonism and shelter competition between invasive and indigenous crayfish species. *Canadian Journal of Zoology* **82**:1923–1932.
- Gherardi, F., & Acquistapace, P. 2004. Exotic invasions in European inland waters: a case study of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Conference presentation
- Gherardi, F. 2007. Understanding the impact of invasive crayfish. In: Gherardi F, editor. *Biological invaders in inland waters: profiles, distribution, and threats*. Dordrecht: Springer, 507–542.
- Gherardi, F. 2008 pp. 38-49 in *Environmental impacts of alien species in aquaculture*, S. Gollasch, I. G. Cowx, A.D. Nunn, Eds, 150 pp.
- Gherardi, F., & Barbaresi, S. 2008. Feeding opportunism of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, an invasive species. *Freshwater Crayfish* **16**:77-85.
- Greathouse, E. A., Pringle, C. M., McDowell, W. H. 2006. Do small-scale exclosure/enclosure experiments predict the effects of large-scale extirpation of freshwater migratory fauna? *Oecologia* **149**:709–717.
- Guan, R. Z. 1997. An improved method for marking crayfish. *Crustaceana* **70**:641-652.

- Gutierrez-Yurrita, P. J., & Montes, C. 2001. Bioenergetics of juveniles of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **130**:29-38.
- Habsburgo-Lorena, A. S. 1983. Socioeconomic aspects of the crawfish industry in Spain. *Freshwater Crayfish* **5**: 552–554.
- Helms, B. S., & Creed, R. P. 2005. The effects of 2 coexisting crayfish on an Appalachian river community. *Journal of the North American Benthological Society* **24**:113-122.
- Henttonen, P., & Huner, J.V. 1999. The introduction of alien species of crayfish in Europe: a historical introduction. In: Gherardi F, Holdich DM, editors. *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* Rotterdam: A.A. Balkema, 13–30.
- Hirsch, P. E. 2009. Freshwater crayfish invasions: former crayfish invader Galician crayfish hands title “invasive” over to new invader spiny-cheek crayfish. *Biological Invasions* **11**:515–521.
- Huner, J.V., & Barr, J.E. 1991. *Red swamp crayfish: biology and exploitation*. 3rd ed. Baton Rouge, Louisiana, Louisiana Sea Grant College Program, Centre for Wetland Resources, Louisiana State University.
- Huner, J. V. 2002. *Procambarus*. In: Holdich DM, editor. *Biology of freshwater crayfish*. Oxford: Blackwell, 541–584.
- Ilhéu, M., & Bernardo, J. M. 1993. Experimental evaluation of food preference of redswamp crayfish, *Procambarus clarkii*: vegetal versus animal. *Freshwater Crayfish* **9**:359–364.
- Inoue, M., & Miyayoshi, M. 2006. Fish foraging effects on benthic assemblages along a warm-temperate stream: differences among drift feeders, benthic predators and grazers. *OIKOS* **114**:95-107.
- Jackson, A. C., & Underwood, A. J. 2007. Application of new techniques for the accurate analysis of choice of prey. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **341**:1–9.

- Kats, L. B., & Ferrer, R. P. 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distributions* **9**:99–110.
- Kerby, J. L., Riley, S. P. D., Kats, L. B., Wilson, P. 2005. Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in southern California streams. *Biological Conservation* **126**:402–409.
- Klocker, C. A., & Strayer, D. L. 2004. Interactions among an invasive crayfish (*Orconectes rusticus*), a native crayfish (*Orconectes limosus*), and native bivalves (*Sphaeriidae* and *Unionidae*). *Northeastern Naturalist* **11**:167-178.
- Kükenthal, W., Matthes, E., Renner, M. 1986. Guia de trabalho práticos de Zoologia (19ª edição). Livraria Almedina, Coimbra. 539 pp.
- Larrinaga, A. R. 2010. A univariate analysis of variance design for multiple-choice feeding-preference experiments: A hypothetical example with fruit-eating birds. *Acta Oecologica* **36**:141-148.
- Leberfinger, K., & Bohman, I. 2010. Grass, mosses, algae, or leaves? Food preference among shredders from open-canopy streams. *Aquatic Ecology* **44**:195–203.
- Lodge, D. M., & Lorman, J. G. 1987. Reductions in submersed macrophyte biomass and species richness by the crayfish *Orconectes rusticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**:591-597.
- Lodge, D. M., Stein, R. A., Brown, K. M., Covich, A. P., Bronmark, C., Garvey, J. E., Klosiewski, S. P. 1998. Predicting impact of freshwater exotic species on native biodiversity: Challenges in spatial scaling. *Australian Journal of Ecology* **23**:53-67.
- Lodge, D. M., Taylor, C. A., Holdich, D. M., Skurdal, J. 2000. Nonindigenous crayfishes threaten North American freshwater biodiversity: lessons from Europe. *Fisheries* **25**:7-20.
- Lockwood, J. L., Hoopes, M.F., Marchetti, Mp.P. 2007. *Invasion Ecology*. Blackwell publishing Ltd., Oxford, 304 págs.

- Manly, B. F. J. 2006. Letter to the Editor: on a proposed method for analysing experiments on food choice. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **335**:154–155.
- Miller, L. P., & Gaylord, B. 2007. Barriers to flow: The effects of experimental cage structures on water velocities in high-energy subtidal and intertidal environments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **344**:215–228.
- Mooney, H. A., & Hoobs, A. J. 2000. *Invasive species in a changing world*. Island press, Washington, D.C., 457 pp.
- Mooney, H. A. 2005. Invasive alien species: the nature of the problem. Pp. 1-15 in H.A. Mooney, R. N. Mack, J. A. McNeely, L. E. Neville, P. J. Schei, J.K. Waage, eds. *Invasive alien species: a new synthesis*. Island press, Washington, DC.
- Nicolet, P., Ruggiero, A., Biggs, J. 2007. Second European Workshop: Conservation of pond biodiversity in a changing European landscape. *Annual Limnology-International Journal of Limnology* **43**:77-80.
- Nielsen, S.N., Anastácio, P.M., Frias, A.F. Marques, J.C. 1999. CRISP-crayfish rice integrated system of production. 5. Simulation of nitrogen Dynamics. *Ecological Modelling* **123**:41–52.
- Núñez, D. R., & Castro, C. O. 1991. La Guía de INCAFO de las plantas útiles y venenosas de la Península Ibérica y Baleares. INCAFO, Madrid. 1257 pp.
- Oertli, B., Biggs, J., Céréghino, R., Grillas, P., Joly, P., Lachavanne, J. B. 2005. Conservation and monitoring of pond biodiversity: introduction. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **15**:535-540.
- Otto, C., & Svensson, B. S. 1980. How do macrophytes growing in or close to water reduce their consumption by aquatic herbivores? *Hydrobiologia* **78**:107-112.
- Paglianti, A., & Gherardi, F. 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and survival of YOY crayfish: a comparison between indigenous and invasive species. *Journal of Crustacean Biology* **24**:140–148.
- Palacios, J., & Rodríguez, M. 2002. La provincia de Zamora se queda sin cangrejos de río autóctonos. *Quercus* **192**:50–51.

- Poorter, M. D. 2007. *Invasive alien species and protected areas: global lessons*. Bariloche, Argentina, 12 pp.
- Poorter, M. D., Pagad, S., Ullah, M. I. 2007. Invasive alien species and protected areas – a scoping report. Scoping the scale and nature of invasive alien species threats to protected areas, impediments to IAS management and means to address those impediments. 93 pp.
- Ramos, M. A., & Pereira, T. M., 1981. Um novo Astacidae para a fauna portuguesa: *Procambarus clarkii* (Girard, 1952). Boletim do Instituto Nacional das Pescas **6**:37-44.
- Rhazi, M., Grillas, P., Charpentier, A., Médail, F. 2004. Experimental management of Mediterranean temporary pools for conservation of the rare quillwort *Isoetes setacea*. Biological Conservation **118**:675-684.
- Ricciardi, A., & Rasmussen, J. 1999. Extinction rates of North American freshwater fauna. Conservation Biology **13**:1220-1222.
- Rodríguez, C. L., Bécares, E., Fernández-Aláez, M. 2003. Shift from clear to turbid phase in Lake Chozas (NW Spain) due to the introduction of American red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). Hydrobiologia **506-509**:421–426.
- Rodríguez, C. F., Bécares, E., Fernández-Aláez, M., Fernández-Aláez, C. 2005. Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. Biological Invasions **7**:75–85.
- Rosseló-Graell, A., Draper, D., Gomes, C. T. 2000. Conservation status of Mediterranean temporary ponds in Campo Militar de Santa Margarida (Ribatejo, Portugal). Portugaliae Acta Biológica **19**:191-199.
- Saunders D. L., Meeuwig J. J. and Vincent C. J. 2002. Freshwater protected areas: strategies for Conservation. Conservation Biology **16**.
- Scalici, M., & Gherardi, F. 2007. Structure and dynamics of an invasive population of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in a Mediterranean wetland. Hydrobiologia **583**:309–319.
- Santos-Reis, M. & Correia, A. I. (eds.) 1999. Caracterização da fauna e da flora do Montado da Herdade da Ribeira Abaixo. Centro de Biologia Ambiental 262 págs.

- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noel, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. editors 2006. Atlas of Crayfish in Europe, Museum national d'Histoire naturelle, Paris, 187 págs. (Patrimoines naturels, 64).
- Sheldon, S.P. 1987. The effects of herbivorous snails on submerged macrophytes communities in Minnesota lakes. *Ecology* **68**:1920–1931.
- Snyder, W. E., & Evans, E. W. 2006. Ecological effects of invasive arthropod generalist predators. *Annual Review of ecology, Evolution, and Systematics* **37**:95-122.
- Taplin, R. H. 2007. Experimental design and analysis to investigate predator preferences for prey. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **344**:116 – 122.
- Underwood, A. J. 1997. *Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press, 504 págs.
- Underwood, A. J., Chapman, M. G., Crowe, T.P. 2004. Identifying and understanding ecological preferences for habitat or prey. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **300**:161-187.
- Underwood, A.J., & Clarke, K.R. 2005. Solving some statistical problems in analyses of experiments on choices of food and on associations with habitat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **318**:227–237.
- Underwood, A. J., & Clarke, K. R. 2007. More response on a proposed method for analyzing experiments on food choice. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **344**:113–115.
- Vives, P. T. (ed.) 1996. *Monitoring Mediterranean Wetlands: A Methodological Guide*. MedWet Publication; Wetlands International, Slimbridge, UK and ICN, Lisbon. 150 págs.
- Walde, S. J., & Davies, R. W. 1984. Invertebrate predation and lotic prey communities: evaluation of in situ enclosure/exclosure experiments. *Ecology* **65**:1206-1213.

ANEXOS

Anexo 1.

Tabela 1- Valores de R, R² e p para as rectas de regressão entre a biomassa fresca e a biomassa seca das amostras das espécies em estudo. Todos os valores são significativos (p <0,05).

	<i>C. divisa</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>B. ranunculoides</i>	<i>J. heterophyllus</i>	<i>R. peltatus</i>
R	0,84	0,79	0,82	0,80	0,91
R ²	0,70	0,63	0,67	0,63	0,83
p	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Anexo 2.

Tabela 1- Comparação entre a biomassa média, total e de cada espécie, retirada dos quadrados dos tratamentos controlo e lagostim no charco A. A negrito, os casos em que se detectaram diferenças significativas (*p <0,05).

	Controlo	Lagostim	Teste-t	
	Média (± dp)	Média (± dp)	t	p
Biomassa				
Total*	5,30 (±1,59)	3,66 (±1,49)	2,247	0,039
<i>R. peltatus</i>	2,98 (±1,87)	2,96 (±1,67)	0,029	0,977
<i>M. pulegium</i>	0,05 (±0,05)	0,05 (±0,07)	-0,038	0,970
<i>J. heterophyllus</i> *	1,45 (±1,02)	0,26 (±0,21)	3,382	0,003
<i>B. ranunculoides</i>	0,23 (±0,26)	0,19 (±0,27)	0,279	0,783
Espécie A	0,02 (±0,02)	0,02 (±0,02)	-0,043	0,965
Espécie B	0,21 (±0,28)	0,06 (±0,05)	1,622	0,124

Tabela 2- Comparação entre o número médio de talos, total e específico, retirado dos quadrados dos compartimentos “controlo” e “lagostim” do charco A. A negrito, os os casos em que se detectaram diferenças significativas (*p <0,05) ou marginalmente significativas (*p ≈ 0,05).

	Controlo	Lagostim	Teste-t	
	Média (±dp)	Média (±dp)	t	p
Talos				
Total*	264,88 (±122,32)	156,77 (±21,51)	2,611	0,018
<i>R. peltatus</i>	96,66 (±62,07)	104,55 (±36,04)	-0,330	0,745
<i>J. heterophyllus</i> *	41,66 (±27,04)	16,66 (±25,18)	2,029	0,059
<i>B. ranunculoides</i>	6,77 (±5,49)	2,55 (±4,36)	1,805	0,089
Espécie A	6,88 (±7,00)	7,88 (±5,77)	-0,330	0,745
Espécie B	85,56 (±132,17)	13,88 (±11,25)	1,620	0,124

Tabela 3- Comparação entre o número médio de talos flutuantes, das espécies presentes no charco A, cortados por *P. clarkii* nos compartimentos “controlo” e “lagostim”. A negrito, os casos em que se detectaram diferenças significativas (*p <0,05).

Charco A	Controlo	Lagostim	Mann-Witney	
	Média (± dp)	Média (± dp)	Z	p
<i>J. heterophyllus</i> *	4,40 (± 4,03)	40,80(± 21,98)	-2,611	0,009
<i>R. peltatus</i> *	1,60 (± 1,67)	10,60 (± 6,34)	-2,611	0,009
<i>M. pulegium</i>	0,00 (± 0,00)	1,40 (± 1,34)	-1,566	0,117
<i>B. ranunculoides</i>	0,80 (± 1,09)	1,20 (± 1,09)	-0,522	0,601
Espécie A*	0,00 (± 0,00)	15,00 (± 14,88)	-2,611	0,009
Espécie B*	0,60 (± 0,54)	10,60 (± 12,58)	-1,984	0,047
Espécie C	0,40 (± 0,54)	12,40 (± 18,52)	-1,148	0,250