

EDUARDO BRUNO OLIVEIRA ESTEVES

FACTORES QUE INFLUENCIAM A ABUNDÂNCIA E
CONDIÇÃO NUTRICIONAL DAS LARVAS DE PEIXES
NOS RIOS MIRA E GUADIANA



Universidade de Coimbra

1999

EDUARDO BRUNO OLIVEIRA ESTEVES

FACTORES QUE INFLUENCIAM A ABUNDÂNCIA E
CONDIÇÃO NUTRICIONAL DAS LARVAS DE PEIXES
NOS RIOS MIRA E GUADIANA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do
grau de Mestre em Ecologia

Universidade de Coimbra

1999

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
OBJECTIVOS.....	8
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO.....	10
2.1. RIO MIRA.....	10
2.2. RIO GUADIANA.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. METODOLOGIA DE CAMPO.....	13
3.1.1. <i>Estratégia lagrangiana</i>	13
3.1.2. <i>Estratégia euleriana</i>	14
3.2. PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	14
3.2.1. <i>Análise quantitativa</i>	14
3.2.2. <i>Análise da condição nutricional</i>	15
3.2.2.1. <i>Homogeneização e extracção dos ácidos nucleicos</i>	15
3.2.2.2. <i>Quantificação dos ácidos nucleicos</i>	18
3.2.2.3. <i>Quantificação das proteínas</i>	18
3.2.2.4. <i>Índices de condição</i>	19
3.3. ANÁLISE DOS DADOS.....	19
3.3.1. <i>Associação entre ovos e larvas de peixe e parâmetros hidrológicos e biológicos</i>	19
3.3.2. <i>Limite de detecção da técnica fluorimétrica</i>	20
3.3.3. <i>Percentagem de recuperação de ácidos nucleicos e variabilidade das determinações</i>	20
3.3.4. <i>Comparação de métodos para extração e quantificação de ácidos nucleicos</i>	20
3.3.5. <i>Relação entre parâmetros da condição nutricional e factores abióticos/bióticos relevantes</i>	21
3.3.6. <i>Comparação da condição nutricional larvar entre noite/dia e entre bacias</i>	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1. PARÂMETROS HIDROLÓGICOS E DISTRIBUIÇÃO DAS POTENCIAIS PRESAS E PREDADORES/COMPETIDORES.....	23
4.1.1. <i>Variação espacial</i>	23
4.1.2. <i>Variação nictemeral</i>	33
4.2. ASSOCIAÇÕES ENTRE ICTIOPLANCTONTES E RESTANTES PARÂMETROS ABIÓTICOS E BIÓTICOS.....	41
4.2.1. <i>Parâmetros hidrológicos</i>	41

4.2.2. <i>Potenciais presas</i>	42
4.2.3. <i>Potenciais predadores/competidores</i>	44
4.2.4. <i>Análise de regressão</i>	46
4.3. LIMITE DE DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA, PERCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E VARIABILIDADE DAS DETERMINAÇÕES.....	48
4.4. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAR OS ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	48
4.5. CONDIÇÃO NUTRICIONAL.....	52
4.6. RELAÇÃO ENTRE A CONDIÇÃO NUTRICIONAL E FACTORES ABIÓTICOS/BIÓTICOS RELEVANTES.....	59
4.7. COMPARAÇÃO DA CONDIÇÃO NUTRICIONAL LARVAR ENTRE RIOS.....	60
5. DISCUSSÃO.....	63
5.1. CARACTERÍSTICAS HIDROLÓGICAS, ABUNDÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO DO PLÂNCTON.....	63
5.1.1 <i>Parâmetros abióticos</i>	63
5.1.2 <i>Potencias presas</i>	63
5.1.3 <i>Predadores potenciais</i>	64
5.1.4 <i>Ictioplâncton</i>	65
5.2. ASSOCIAÇÕES ENTRE LARVAS DE PEIXES E PARÂMETROS ABIÓTICOS E BIÓTICOS.....	69
5.2.1 <i>Hidrologia</i>	69
5.2.2 <i>Presas potenciais</i>	70
5.2.3 <i>Potenciais predadores/competidores</i>	72
5.2.4 <i>Modelos empíricos</i>	74
5.3. COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	75
5.4. CONDIÇÃO NUTRICIONAL DAS LARVAS DE PEIXE <i>vs.</i> PARÂMETROS HIDROLÓGICOS E BIOLÓGICOS.....	78
5.4.1 <i>Índices de Condição</i>	78
5.4.2 <i>Condição nutricional larvar</i>	79
5.4.3 <i>Condição nutricional vs. parâmetros abióticos e bióticos</i>	82
5.4.4 <i>Comparação entre bacias</i>	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
8. ANEXOS.....	110

AGRADECIMENTOS

O trabalho descrito nesta Tese não teria sido possível sem o apoio, colaboração, auxílio e orientação de algumas pessoas e instituições. Assim, gostaria de agradecer:

- Ao Professor Doutor J. Pedro Andrade por ter aceite a tarefa de co-orientar o trabalho, pelo apoio, auxílio imprescindível e boa-disposição em todas as saídas de campo, pelos "brainstorms", pelos comentários e sugestões ao manuscrito, por me integrar na equipa do "Migra 2000" e proporcionar apoio logístico através deste projecto PRAXIS XXI (ref^a CA/3/3.2/1981/95), e pela amizade.

- Ao Professor Doutor João Carlos Marques, por ter aceite co-orientar este trabalho, e que, apesar da distância, sempre se mostrou disponível para me ajudar e, também, pelos comentários e sugestões ao manuscrito.

- À Professora Doutora Alexandra Teodósio Chícharo por tudo o que me ensinou, corrigiu e sugeriu, e pelo apoio logístico e bibliográfico que me dispensou ao longo de todo o trabalho, assim como pela amizade.

- À Lic. Teresa Pina, minha colega na equipa do "Migra 2000", pela amizade, pelos comentários e correções ao manuscrito e pela ajuda imprescindível nas várias saídas de campo e nos momentos "menos bons" do trabalho;

- Ao programa PRAXIS XXI pelo apoio financeiro concedido, sob a forma de uma bolsa de Mestrado (ref^a BM/8427/96), e ao projecto financiado no âmbito do programa INTERREG II (ref^a 15/REGII/2/96) pela disponibilização das amostras e partilha de informação relativa a parte das colheitas no estuário do rio Guadiana.

- Ao Rogério Peixinho, António Manuel e Clara pelo abrigo que me dispensaram para as estadias em Coimbra (fundamentais para a conclusão da parte curricular do Mestrado) e pela amizade.

- Às Lic. Isabel Gouveia e Rita Nogueira pela triagem e identificação das amostras de mesozooplâncton (estuário do Guadiana) e de microzooplâncton, respectivamente.

- A todos os meus amigos (que espero não se aborreçam por não os mencionar individualmente) que me ajudaram a ultrapassar mais esta prova.

- Por fim, mas não por último, aos meus Pais e Irmã que, como sempre, me ajudaram e apoiaram durante tudo isto...

RESUMO

A investigação sobre os mecanismos que regulam o recrutamento tem sido tema de vários estudos desde o início deste século e várias hipóteses têm sido apresentadas para explicar as flutuações no recrutamento. Entre os contributos mais recentes para a compreensão daqueles mecanismos encontra-se a análise da condição nutricional, sendo que o desenvolvimento de técnicas que possibilitem avaliar a taxa de crescimento das larvas e que permitam distinguir a sua condição nutricional tem sido tema central da investigação recente em ictioplanctonologia. De entre as várias metodologias existentes destaca-se a análise de componentes químicos, designadamente os ácidos nucleicos e proteínas, e o cálculo de índices de condição (razões RNA/DNA, PROT/DNA ou PROT/RNA, por exemplo). A aplicação destes índices ecofisiológicos de condição permitirá esclarecer, embora preliminarmente, a importância relativa de alguns factores que determinam a mortalidade larvar e o recrutamento. Assim, neste trabalho pretendeu-se, por um lado, adaptar, aplicar e comparar técnicas para a determinação de ácidos nucleicos e proteínas às larvas de peixe recolhidas nos rios Mira e Guadiana e, por outro, estudar a influência da temperatura, da salinidade e da abundância de potenciais presas e predadores sobre a distribuição espacial e nictemeral das larvas de peixe (Clupeidae, Engraulidae, Gobiidae, Blennidae e Atherinidae) e a sua condição nutricional.

Entre Março e Setembro de 1997, recolheram-se amostras de micro-, meso- e ictioplâncton e registou-se a temperatura e salinidade superficiais, em 18 estações estabelecidas nos rios Mira ($n=8$, ~30 km do rio) e Guadiana ($n=10$, ~178 km do rio). Complementarmente, foram colhidas amostras durante ciclos de 24 horas de amostragem realizados em Vila Nova de Milfontes e Vila Real de Santo António em Maio, Junho, Julho e Setembro. No laboratório triaram-se as amostras formolizadas e identificaram-se os organismos recolhidos. As larvas de peixe congeladas em azoto líquido foram identificadas e os conteúdos em ácidos nucleicos determinados com duas técnicas fluorimétricas. Compararam-se os resultados obtidos com os dois protocolos e calcularam-se equações para a sua inter-calibração. As proteínas foram determinadas com um método espectrofluorimétrico. Estudaram-se as relações entre a densidade dos ovos e das larvas de peixe (ind. 100 m^{-3}) e a condição nutricional larval (razões RNA/DNA, PROT/DNA, PROT/DNA e Gpi) e os parâmetros abióticos e bióticos considerados através de análise de correlação e regressão múltipla.

Os ovos e larvas de peixe foram relativamente pouco comuns. Os estados larvares ocorreram geralmente em densidades inferiores a $100\text{ ind. }100\text{ m}^{-3}$, excepto nos ciclos de e ocorreram de forma diferente à descrita na literatura. A distribuição espacial e nictemeral dos ictioplânctons parece reflectir, por um lado, o comportamento reprodutivo dos adultos e, por outro, a influência de factores hidrológicos. A anchova, os gobiídeos e os blenídeos parecem incluir-se no primeiro grupo, enquanto os clupeídeos integraram o segundo.

Entre os parâmetros estudados, a temperatura e a abundância de alguns *taxa* de predadores potenciais explicaram parte significativa da variabilidade da densidade ictioplânctónica ($R^2 \leq 0,88$). A temperatura constitui um factor estruturante de *habitats* e biologicamente limitante, enquanto a predação determina a mortalidade larvar.

Os resultados da comparação de metodologias de quantificação de ácidos nucleicos confirmaram a ideia de que os valores obtidos variam com o protocolo

usado. Alguns aspectos das metodologias, designadamente a interferência dos compostos utilizados para purificar os homogeneizados ou a actividade variável da ribonuclease, poderão explicar as diferenças encontradas. Por outro lado, verificou-se que os métodos se aplicam de modo diferente às populações larvares estudadas. No entanto, calcularam-se equações para inter-calibração de resultados entre técnicas. Em função dos aspectos metodológicos discutidos neste estudo, o método de Caldarone & Buckley (1991) apresentou vantagens importantes (simplicidade, rapidez e maior número de larvas analisadas por período de tempo) e que aconselham a sua utilização para estudos de rotina da condição nutricional larvar.

A generalidade das larvas encontravam-se em boas condições nutricionais, sendo que as percentagens de larvas com RNA/DNA < 1,3 ou 1,0 não ultrapassaram 14% (11 - 13% nos blenídeos e < 7,1% nas restantes famílias). Os resultados da análise das percentagens de larvas em estado de inanição através de $G_{pi} < 0\%$ dia⁻¹ confirmaram genericamente os referidos acima.

A condição nutricional larvar correlacionou-se significativamente com a temperatura e com maior número de variáveis indicadores da abundância de potenciais presas relativamente aos predadores potenciais ($R^2 \leq 0,95$). A temperatura influencia o metabolismo das larvas e a disponibilidade de alimento condiciona a sobrevivência larvar.

Apenas se obtiveram diferenças significativas entre rios nos valores médios da razão RNA/DNA para gobiídeos. O número de larvas analisadas, a aplicabilidade das metodologias e o impacte distinto dos factores abióticos e bióticos estudados poderão explicar aqueles resultados. As maiores percentagens de larvas em estado de inanição ($\geq 5,6\%$) verificaram-se no rio Mira, designadamente em clupeídeos e blenídeos. Pelo contrário, os gobiídeos e atherinídeos encontravam-se em piores condições no rio Guadiana ($\geq 2,9\%$). Tendo em consideração que a disponibilidade de alimento foi relativamente semelhante nos dois rios, a temperatura e abundância de predadores parecem ter sido os factores mais determinantes. A temperatura influencia a distribuição e a condição nutricional larvar, através do seu efeito sobre as taxas de crescimento e mortalidade, enquanto os predadores poderão remover as larvas em piores condições.

Em conclusão, a distribuição das larvas de peixe parece condicionada pela temperatura e pela pressão da predação, enquanto a condição nutricional parece depender da temperatura e da disponibilidade de alimento, sendo, no entanto, controlada pela predação, através da sua acção sobre a mortalidade larvar. Os modelos empíricos obtidos para a distribuição da densidade ($R^2 \leq 0,88$) e para análise de condição larvar ($R^2 \leq 0,95$) parecem confirmar estas hipóteses.

ABSTRACT

Research about the mechanisms regulating fish recruitment has been the aim of numerous studies over the past decades and several hypothesis to explain the fluctuations of recruitment have been presented. Recently, larval condition analysis was proposed as a mean to study those mechanisms because of its use studying the growth of fish larvae and assessing their nutritional condition. Among the several methodologies to study the nutritional condition of larvae, the quantification of their chemical composition, namely the nucleic acids and protein contents, and the calculation of condition indices (RNA/DNA, PROT/DNA and PROT/RNA ratios) has been widely used. The use of these ecophysiological indices of condition might clarify the relative importance of the factors determining larval mortality and recruitment. The aims of this study were to: 1) to adapt, to apply and to compare two protocols for determining nucleic acids and proteins contents of fish larvae collected in rivers Mira and Guadiana; and 2) to study the influence of temperature, salinity and abundance of potential predators and prey on the spatial and circadian distribution of fish larvae (Clupeidae, Engraulidae, Gobiidae, Blennidae and Atherinidae) and their nutritional condition.

Between March and September 1997, micro-, meso- and ichthyoplankton samples were collected and temperature and salinity were registered monthly in 18 stations in rivers Mira (n=8, river km ~30) and Guadiana (n=10, river km ~178). Additionally, samples were also collected during four 24 hour sampling eulerian cycles in Vila Nova Milfontes and Vila Real Santo António (May, June, July and September). In the laboratory, formalized samples were sorted and the organisms identified. Fish larvae stored in liquid nitrogen were identified to family level and their contents of nucleic acids and proteins were determined using two fluorimetric techniques. These results were compared and equations for their inter-calibration were calculated. Proteins were determined spectrophotometrically. The relationships between the density of fish eggs and larvae (ind. 100 m⁻³), their nutritional condition (RNA/DNA, PROT/DNA and PROT/RNA ratios) and the abiotic and biotic parameters were studied using correlation analyses and multiple regression.

Fish eggs and larvae were relatively uncommon and occurred differently from descriptions published elsewhere. Generally, their density did not exceed 100 individuals 100 m⁻³, except in 24 hour sampling cycles. Spatial and nictemeral distribution of ichthyoplankton seemed to reflect the influence of adults reproductive behaviour (anchovy, gobiids and blennids) and hydrology (clupeids).

Both temperature and density of some potential predators explained significantly the variability of ichthyoplankton density ($R^2 \leq 0,88$). Temperature is a biologically limiting parameter which in turn structures habitats. On the other hand, predation determines larva mortality.

This study reinforces the idea that different methodologies of nucleic acid extraction can lead to different results making direct comparison of data impossible. Some aspects of the protocols, namely the interference of compounds used to purify homogenates or the variable activity of ribonuclease, could account for the differences found. On the other hand, protocols seem to apply differently to distinct larval populations. Nonetheless, equations for the inter-calibrations of results were calculated. In light of these results, the method of Caldarone & Buckley (1991)

showed important advantages (simplicity; less time-consuming; number of samples processed in the same period) and its use in routine studies of larval nutrition condition is recommended.

Fish larvae were generally in good condition. Starving larvae (RNA/DNA < 1.3 or 1.0) never exceeded 14% of analysed larvae (11 - 13% of blennids and < 7.1% of other families). The results obtained when considering Gpi < 0% day⁻¹ agreed well with those mentioned above.

The nutritional condition of fish larvae correlated significantly with temperature and a relatively larger number of potential prey ($R^2 \leq 0.95$). Temperature influences larval metabolism and food availability controls larval survival.

Only for gobiids the RNA/DNA ratios differed significantly between the two rivers. The number of larvae analysed, the application of the methodologies and the distinct impact of the various abiotic and biotic parameters could explain these results. More larvae from river Mira were starving ($\geq 5.6\%$), namely clupeids and blennids. Inversely, gobiids and atherinids were in poorer condition in river Guadiana ($\geq 2.9\%$). Temperature and the abundance of potential predators, considering that food availability was similar in both rivers, seemed to be the most important factors. The former influences the distribution and nutritional condition of larvae, through its regulating effect on growth and mortality, whereas the later can remove larvae in poorer condition.

In conclusion, distribution of fish larvae seemed controlled by temperature and predation pressure. Their nutritional condition appeared dependent of temperature and food availability, although controlled by predation through its effect over larval mortality. The equations obtained for the density distribution ($R^2 \leq 0.88$) and nutritional condition of fish larvae ($R^2 \leq 0.95$) seem to confirm these hypotheses.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de peixes marinhos produzem ovos e possuem fases larvares planctónicas que constituem o ictioplâncton. Uma das questões mais prementes em estudos de dinâmica dos recursos pesqueiros é a explicação da variabilidade da mortalidade dos estados iniciais do ciclo de vida dos peixes e do recrutamento das espécies. A variabilidade destes parâmetros pode originar grandes variações na biomassa disponível para a manutenção das populações e para a pesca, designadamente no caso de espécies *r*-seleccionadas como a sardinha (Troade, 1978).

A investigação da causalidade dos mecanismos que regulam o recrutamento tem sido tema de vários estudos desde o início deste século (Hjort, 1914, 1926; Marr, 1956; Cushing, 1975; Crecco *et al.*, 1986; Thiel *et al.*, 1995; Fortier & Villeneuve, 1996). Em alguns casos obtiveram-se relações estatisticamente significativas entre alguns dos factores estudados e a mortalidade larvar, e várias hipóteses têm sido apresentadas para explicar aquelas relações (Hjort, 1914, 1926; Cushing, 1975; Lasker, 1975; Sinclair, 1988). No entanto, a maioria dos investigadores parece concordar que as flutuações, mais ou menos erráticas, do recrutamento se devem à variabilidade das taxas de crescimento e mortalidade (Crecco & Savoy, 1987a; Houde, 1989).

Hjort (1914) foi o primeiro autor a referir que a falta de alimento constitui uma das principais causas de mortalidade larvar. Se ocorrer um lapso de tempo entre o período em que as larvas se alimentam externamente pela primeira vez e o momento em que o alimento está disponível, é provável que ocorra elevada mortalidade - "hipótese do período crítico". Alguns anos mais tarde, Hjort (1926) apresentou uma hipótese complementar para explicar a mortalidade larvar - "hipótese da deriva". Aquele autor considerou que as correntes marítimas contribuem para deslocar os estados larvares para zonas desfavoráveis ao seu desenvolvimento, dessa forma contribuindo para as variações interanuais na abundância dos peixes. Vários autores (*e.g.* Hayman & Tyler, 1980; Heufelder *et al.*, 1982; Crecco & Savoy, 1987a; Wroblewski *et al.*, 1989; Edinger *et al.*, 1993; Matsuura & Hewitt, 1995) têm estudado a distribuição espacial e temporal das fases larvares de várias espécies peixes na

perspectiva das hipóteses de Hjort e os seus resultados parecem suportar as explicações daquele autor. Cushing (1975) propôs que a magnitude do recrutamento está relacionada com a correspondência entre o início da produção larvar e o máximo de produtividade do plâncton no meio natural - "hipótese da coincidência". Contudo, factores complementares como o vento, a temperatura e a radiação solar, controlam a produção primária fitoplanctónica, e, indirectamente, a produção secundária, e devem ser integrados nos estudos sobre esta hipótese (Frank & Legget, 1982). Como resultado de um estudo sobre larvas de *Engraulis mordax*, Lasker (1975) propôs que apenas um ambiente hidrológicamente estável permite a agregação de presas nas quantidades necessárias para as larvas de peixe - "hipótese da estabilidade da coluna de água". Recentemente, Sinclair (1988) propôs uma teoria sobre os mecanismos de regulação e de especiação das populações marinhas. Os "membros" de determinada população, retidos em determinado tempo/local pelos efeitos conjuntos de uma estrutura hidrodinâmica particular e de um comportamento adaptativo dos indivíduos, serão "beneficiados" em contraste com os indivíduos "errantes" - "hipótese do membro-errante". Assim, tanto os processos espaciais (e.g. deslocamentos geográficos) como os processos energéticos, que incluem a predação e a inanição, podem determinar variações na mortalidade larvar. Para Bailey & Houde (1989), a predação constitui o factor que mais afecta a sobrevivência das larvas de peixe no seu ambiente natural.

Não existe actualmente consenso sobre qual dos mecanismos (independentes ou dependentes da densidade) ou dos factores (factores hidrológicos, inanição ou predação) determina a mortalidade nos estados iniciais do ciclo de vida dos peixes, pois não parece existir uma resposta inequívoca (Chícharo, 1991). Apesar das condições abióticas e da predação constituírem os factores mais importantes para a regulação da mortalidade larvar (Laurence, 1982; Frank, 1988; Bailey & Houde, 1989; Matsuura & Hewitt, 1995), a falta de alimento contribui tanto directamente para a mortalidade, *i.e.* morte por inanição, como indirectamente, através do aumento da vulnerabilidade à predação e da susceptibilidade às condições abióticas adversas (Houde, 1997).

Entre as abordagens mais recentes para entender os mecanismos que regulam a mortalidade larvar, a análise da condição nutricional permite, por um lado, conhecer o estado da larva no momento da captura, e por outro, estimar um factor de correção

para os cálculos da mortalidade por predação (subtrair as larvas que perecerão por inanição) e estimar indirectamente a mortalidade por predação (por subtração à mortalidade total) (Fortier & Leggett, 1985; Houde, 1987). Complementarmente, a avaliação do estado nutricional de larvas de peixe, pode ultrapassar as dificuldades no estudo *in situ* das implicações dos factores hidrológicos e da predação na mortalidade larvar (Richard *et al.*, 1991), por exemplo através da elaboração de modelos empíricos, da análise dos conteúdos estomacais e de experiências de predação em mesocosmos. Neste contexto, avaliação da condição nutricional de larvas de peixe apresenta-se como uma ferramenta extremamente importante em estudos da mortalidade larvar e recrutamento (Chícharo, 1991).

O desenvolvimento de técnicas que possibilitem avaliar a taxa de crescimento das larvas e que permitem distinguir a sua condição nutricional tem sido tema central da investigação recente em ictioplanctonologia (Mathers *et al.*, 1994). Assim, foram desenvolvidos métodos morfométricos, histológicos e químicos, que proporcionam informação sobre o estado nutricional das larvas de peixe em diferentes fases do seu desenvolvimento (Suthers *et al.*, 1992).

Morfologicamente, os principais aspectos que têm sido utilizados são a robustez física (Shelbourne, 1957), a relação peso-comprimento (*e.g.* Ehrlich *et al.*, 1976) e a morfometria. A avaliação directa da robustez foi um dos primeiros métodos propostos para determinar o estado nutricional das larvas. Esta metodologia nunca se impôs devido à subjectividade das determinações. Preferencialmente, têm sido utilizadas as características morfométricas para a avaliação do estado nutricional das larvas de peixe, pois são mensuráveis. Medidas como a altura da cabeça ou a altura do corpo permitem separar larvas em bom estado nutricional de larvas em condições de inanição, sobretudo em estados larvares mais avançados (Blaxter, 1971; Ehrlich *et al.*, 1976; Reichow *et al.*, 1991). Recentemente, Ré (1986) sugeriu a utilização da informação contida nos otólitos de larvas como ferramenta para avaliar o estado nutricional das larvas, uma vez que variações na disponibilidade alimentar são responsáveis por diferenças na espessura dos anéis diários dos otólitos (Ré *et al.*, 1988). Porém, Geffen (1982) e McGurk (1984) advertem para os efeitos sobre a regularidade de deposição dos anéis que os períodos de escassez de alimento podem produzir.

A histologia das larvas apresenta possibilidades para o desenvolvimento de critérios de determinação do estado nutricional (Strussmann & Takashima, 1990). Os períodos de escassez de alimento produzem alterações na estrutura e integridade das células e dos tecidos. Estas alterações são independentes da idade e não são influenciadas pelas modificações que ocorrem aquando da recolha e fixação das larvas (O'Connell, 1976). Theilacker & Watanable (1989) propuseram a utilização do diâmetro das células do intestino médio de larvas de *Engraulis mordax* como indicador do seu estado nutricional.

A ausência de alimento provoca, em primeiro lugar, alterações a nível celular. Os métodos químicos permitem, assim, detectar precocemente e com maior sensibilidade variações ao nível da composição intracelular. A análise de componentes químicos para a determinação do estado nutricional das fases larvares dos peixes é relativamente recente. Os trabalhos desenvolvidos em larvas de peixes dedicaram-se, inicialmente, apenas a alguns constituintes do organismo, como a água e algumas substâncias inorgânicas, como os carboidratos, as proteínas e os lípidos totais (Ehrlich, 1974). Mais recentemente, componentes como as enzimas (*e.g.* Ueberschar, 1988, 1993) e os ácidos nucleicos (*e.g.* Robinson & Ware, 1988; Richard *et al.*, 1991; Clemmesen, 1993; Canino & Caldarone, 1995; Canino, 1997; Chícharo *et al.*, 1998a) têm merecido particular atenção. A utilização de métodos químicos exige a fixação rápida do material biológico, usualmente por congelamento, por forma a evitar a actuação de enzimas proteolíticas (proteases, lipases e nucleases). Por outro lado, a seleção do(s) índice(s) bioquímico(s) a utilizar necessita de análise preliminar do efeito da privação de alimento sobre a concentração desses compostos. Apesar das dificuldades apresentadas, a quantificação dos ácidos nucleicos (ou o cálculo das relações entre eles, ou da sua relação com as proteínas ou com o conteúdo em carbono) parecem constituir uma das formas mais adequadas para determinar a condição larvar (Chícharo, 1996).

Bulow (1970) foi o primeiro autor a verificar a relação entre o regime alimentar e a razão entre os conteúdos em ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA). O conteúdo celular em RNA está correlacionado com a taxa de síntese proteica, enquanto o conteúdo em DNA, portador da informação genética, é relativamente estável sob condições variáveis do meio e pode ser usado como indicador do número de células (Bulow, 1987). Assim, a razão RNA/DNA

constitui um índice ecofisiológico de condição que reflecte o potencial de proteosíntese das larvas (Chícharo, 1997). Apesar das limitações decorrentes da utilização dos índices baseados nos conteúdos em ácidos nucleicos (*cf.* Bergeron & Bouhlic, 1994; Mathers *et al.*, 1994; Suthers *et al.*, 1996; Bergeron, 1997), estes são ainda uma ferramenta aplicada por diversos autores para avaliar o estado nutricional de larvas de peixe e determinar a sua taxa de crescimento (Buckley, 1979, 1984; Clemmesen, 1987a, b, 1989, 1990, 1993; Robinson & Ware, 1988; Richard *et al.*, 1991; Steinhart & Eckmann, 1992; Mathers *et al.*, 1994; Canino & Caldarone, 1995; Rooker & Holt, 1996; Canino, 1997; Chícharo, 1997, 1998; Chícharo *et al.*, 1998a, b; Garcia *et al.*, 1998).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a concentração dos ácidos nucleicos em larvas de peixe. Inicialmente, os métodos baseavam-se na análise espectrofotométrica da taxa de absorção da luz UV (*e.g.* Buckley, 1979), designadamente o método de Schmidt & Tannhauser (1945) modificado por Munro & Fleck (1966). Este procedimento está limitado a amostras com peso seco superior a 800 µg e, portanto, requer a análise de um conjunto de larvas. Assim, não é possível obter informação relativa à condição nutricional individual. Recentemente, vários autores (*e.g.* Robinson & Ware, 1988; Clemmesen, 1989, 1990, 1993; Caldarone & Buckley, 1991; Mathers *et al.*, 1994; Canino & Caldarone, 1995) adaptaram a técnica fluorimétrica mais sensível de LePecq & Paoletti (1966) e LePecq (1972) modificada por Karsten & Wollenber (1972, 1977) que permite quantificar concentrações mínimas de ácidos nucleicos. Esta metodologia baseia-se no aumento da fluorescência dos ácidos nucleicos quando complexados com corantes específicos - fluóforos (*e.g.* brometo de etídio, Hoechst H33258 ou bisbenzamida), permitindo a análise individual de larvas. A fluorescência do complexo ácidos nucleicos-fluóforo é medida sequencialmente, através da utilização de fluóforos específicos ou pela digestão do RNA pela ribonuclease (Clemmesen, 1988, 1993; Robinson & Ware, 1988). A concentração de RNA obtém-se pela subtração da quantidade de DNA da quantidade total de ácidos nucleicos.

No entanto, metodologias diferentes para quantificar os ácidos nucleicos produzem resultados distintos, impossibilitando a comparação directa de resultados. McGurk & Kusser (1992) compararam três metodologias fluorimétricas para a determinação de ácidos nucleicos em larvas de arenque do Pacífico e obtiveram

diferenças significativas nas concentrações de RNA e nas razões RNA/DNA. Grémare & Vétion (1992) mediram as concentrações de ácidos nucleicos no bivalve *Abra ovata*, utilizando sete métodos espectrofluorimétricos. Os métodos produziram resultados significativamente diferentes e, nesse sentido, os autores realçaram a importância e os efeitos dos vários passos envolvidos nos protocolos estudados. Chícharo (1993) comparou as concentrações de ácidos nucleicos determinadas com dois métodos, espectrofotométrico e fluorimétrico, em larvas de *Clupea harengus*. Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas para a mesma larva. Canino & Caldarone (1995) adaptaram um sistema de análise automatizada de fluxo-injeção (FIA) para análise fluorimétrica convencional (CFA) e compararam os resultados. Estes autores verificaram que as metodologias eram igualmente sensíveis e precisas, e apresentaram parâmetros para a inter-calibração dos resultados. Recentemente, Chícharo (1996) comparou duas técnicas de determinação de ácidos nucleicos, espectrofotométrica de Schmidt & Tannhauser (1945) e fluorimétrica de Clemmesen (1988, 1990), para larvas de *Sardina pilchardus* e não obteve diferenças significativas nas concentrações de DNA e RNA, e nas razões RNA/DNA.

A quantificação das proteínas em amostras biológicas tem sido realizada seguindo vários protocolos, espectrofotométricos, químicos e físicos (Holme & Peck, 1983). Para a análise do conteúdo proteico de larvas de peixe o método mais referido na literatura é o de Lowry (*e.g.* Buckley, 1979, 1984; Bergeron & Bouhlic, 1994; Mathers *et al.*, 1994). Este método baseia-se na detecção dos resíduos de tirosina (com natureza fenólica) pelo reagente de Folin-Ciocalteu. A sensibilidade do método foi consideravelmente melhorada com a utilização de íons cúpricos. Após a combinação do cobre com as proteínas, os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (principais constituintes do reagente de Folin-Ciocalteu) são reduzidos e a solução torna-se azul e espectralmente mensurável a 600 - 800 nm (Holme & Peck, 1983). Contudo, esta metodologia é exigente em termos de protocolo e de tempo. A observação de que a cor de alguns indicadores usados para titulações ácido-base era influenciada pela presença de proteínas em solução, originou o desenvolvimento duma série de métodos baseados nas alterações das características de absorvância desses corantes (*e.g.* metilo laranja, azul brilhante de Coomassie, verde de Bromcresol) (Holme & Peck, 1983). Bradford (1976) descreve um procedimento para a quantificação de proteínas bastante simples e que parece eliminar a maioria dos

problemas de outros métodos. A metodologia baseia-se na detecção espectrofotométrica da alteração de cor do reagente azul brilhante de Coomassie quando ligado a proteínas. Rooker & Holt (1996) adaptaram esta metodologia para quantificação das proteínas solúveis em larvas de peixe (*Sciaenops ocellatus*).

Neste contexto, a aplicação deste conjunto de ferramentas para análise da condição nutricional larvar e da sua relação com alguns parâmetros abióticos e bióticos permitirá esclarecer, embora preliminarmente, a importância relativa de alguns dos factores que determinam a mortalidade larvar e o recrutamento. Assim, neste trabalho pretendeu-se, por um lado, adaptar, aplicar e comparar técnicas para a determinação de ácidos nucleicos e proteínas às larvas de peixe recolhidas nos rios Mira e Guadiana e, por outro, estudar a influência da temperatura, da salinidade e da abundância de potenciais presas e predadores sobre a distribuição espacial e nictemeral das larvas de peixe e a sua condição nutricional.

A integração deste trabalho num projecto de investigação nacional financiado pelo Programa PRAXIS XXI do Ministério da Ciência e Tecnologia (Ref^a 3/3.2/CA/1981/95), que pretende estudar diversos aspectos da biologia e ecologia dos peixes migradores anádromos que ocorrem em rios portugueses, contextualizou o estudo desenvolvido na problemática do recrutamento dos peixes, facilitou as recolhas das fases larvares e proporcionou os meios para as análises bioquímicas.

Os rios estudados são os mais importantes da região sul de Portugal, possuem características particulares (Loureiro *et al.*, 1984) que os distinguem e incluem-se no conjunto de bacias hidrográficas alvo de estudo do referido projecto. Por outro lado, vários investigadores têm salientado a importância dos estuários como *nursery* das formas juvenis de vários *taxa*. Com efeito, os peixes utilizam os sistemas estuarinos como locais que, providenciando protecção, proporcionam condições óptimas para a alimentação das fases larvares e juvenis. Assim, o estudo dos ictioplanctontes que ocorrem nos estuários permite avaliar o papel daqueles sistemas no ciclo vital de algumas espécies de peixe (Ré, 1984), nomeadamente na determinação de épocas e locais preferenciais de desova, no estudo da idade e crescimento e na estimação do recrutamento, bem como dos factores que os influenciam.

Os peixes constituem parte significativa do necton dos sistemas estuarinos (McHugh, 1967 *in* Yáñez-Arancibia *et al.*, 1994), sendo que as famílias mais comuns e características dos estuários temperados e sub-tropicais são: Angulidae, Clupeidae,

Engraulidae, Gasterosteidae, Mugilidae, Serranidae, Sciaenidae, Sparidae, Gobiidae, Pleuronectidae e Soleidae. Cunha (1995) assinalou 11 espécies de peixe comuns a todos ecossistemas estuarinos e lagunares da costa portuguesa, entre os quais indica *Sardina pilchadus* e *Atherina boyeri*. Algumas das espécies mencionadas: a) são economicamente importantes e sujeitas á pesca, e.g. sardinha e anchova (Pestana, 1989); b) encontram-se ameaçadas de extinção em virtude da instalação de infra-estruturas de aproveitamento hidroeléctrico, que impedem as migrações anádromas, modificam as características das bacias e propiciam fenómenos de introgressão, e.g. sável e savelha (Assis, 1990; SNPRCV, 1993; Alexandrino, 1995); ou c) são residentes nos estuários, e.g. gobídeos, blenídeos e aterinídeos, completando aí todo o seu ciclo de vida (Costa *et al.*, 1987; Antunes *et al.*, 1988). Neste trabalho, estudou-se a fase planctónica dos clupeídeos, engraulídeos, gobídeos, blenídeos e aterinídeos. Entre outros, Costa *et al.* (1987), Ré (1987, 1994), Antunes *et al.* (1988), Chícharo (1988), Teodósio (1988), Ré *et al.* (1990), Ré & Gonçalves (1993), e Chícharo (1996, 1997, 1998) estudaram aspectos relativos á ecologia das fases larvares de peixes (postura e dinâmica larvar, alimentação, condição nutricional, idade e crescimento) em alguns sistemas estuarinos (ou zonas costeiras adjacentes) da costa Sudoeste e Sul de Portugal.

Objectivos

A ecologia da fase planctónica de Clupeidae, Engraulidae, Gobiidae, Blennidae e Atherinidae foi estudada preliminarmente nos estuários dos rios Mira e Guadiana, tendo-se abordado os seguintes aspectos:

a) Reconhecer as áreas de distribuição, zonas de retenção e transporte das larvas de *Sardina* sp., *Alosa* spp. e *Engraulis* sp., Gobiidae, Blennidae e Atherinidae, bem como avaliar a sua abundância relativa nos ambientes dulçaquícola e estuarino dos rios Mira e Guadiana;

b) Estudar os factores abióticos e bióticos susceptíveis de afectar a distribuição das larvas de peixe: temperatura, salinidade, turbidez, disponibilidade alimentar e predação/competição;

c) Adaptar técnicas fluorimétricas de extração e quantificação dos ácidos nucleicos e espectrofotométricas de quantificação das proteínas às espécies em

estudo, comparar os resultados obtidos, e estimar parâmetros para intercalibração de resultados;

d) Avaliar a condição nutricional do ictioplâncton através de índices bioquímicos (RNA/DNA, Proteínas/RNA, Proteínas/DNA e Taxa Instantânea de Crescimento Proteico - Gpi) ;

e) Relacionar a condição nutricional larvar com parâmetros abióticos e bióticos relevantes;

f) Comparar a condição nutricional entre bacias.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

2.1. Rio Mira

A bacia hidrográfica do rio Mira ocupa uma área total de 1576 km² no Sudoeste de Portugal (37°20' - 37°45' N, 8°05' - 8°50' W) (Loureiro *et al.*, 1984). O rio Mira nasce na Serra do Caldeirão e desagua, 145 km depois, em Vila Nova de Milfontes (FIGURA 1). Segundo Almeida (1988) o estuário do rio Mira estende-se por 40 km, e a sua largura máxima, cerca de 400 m, encontra-se junto à foz. Andrade (1986) sintetiza as informações relativas a algumas características hidrológicas, salinidade, turbidez, diferencial térmico e teor em oxigénio dissolvido, e à sua distribuição espacial (gradiente estuarino montante-jusante) e vertical (superfície-fundo). A distribuição de batimetrias é bastante homogénea, com valores mínimos a montante (cerca de 3 m) e maiores profundidades registadas junto a alguns maciços rochosos, entre 5 - 10 m (Andrade, 1986; Almeida, 1988).

Almeida (1996) propõe uma zonação do estuário do rio Mira adaptada de Costa *et al.* (1994). A zona 1 (entre Vila Nova Milfontes e Moinho do Loural, km 12 do rio) de características predominantemente marinhas, em que a temperatura média anual varia entre 12,0 °C e 22,5 °C e salinidade entre 27,0 ppm e 35,0 ppm. Esta zona apresenta povoamentos de zoosteráceas e sapais nas margens, e ocorrem grande número de espécie íctias marinhas ocasionais que lhe conferem maior riqueza específica. A zona 2 (entre Moinho do Loural e Casão D. Soeiro, km 19 do rio) de características estuarinas, *i.e.* com maiores amplitudes térmicas (9,0 - 26 °C) e salinas (7,0 - 35,0 ppm). Existem áreas de sapal, contudo em menor extensão do que na zona 1, e ocorrem espécies de peixes tipicamente estuarinas. A zona 3 (entre Casão D. Soeiro e Odemira, km 31 do rio) possui características de estuário superior, com alguma influência dulçaquícola. A temperatura varia entre 8,0 e 26,5 °C e a salinidade entre 0,0 e 23,0 ppm. Ocorrem menor número de espécies e os ictiontes são característicos dos estuários superiores (FIGURA 1).

2.2. Rio Guadiana

A bacia hidrográfica do Guadiana (37°09' - 37°40' N, 7°15' - 7°40' W) possui uma extensão superficial de 67500 km², dos quais cerca de 12000 km² se encontram em território nacional (González, 1995). O Rio Guadiana nasce em Espanha, e depois de um percurso de cerca de 750 km, passa a servir de fronteira entre Portugal e Espanha em dois troços que totalizam aproximadamente 200 km (Weinholtz, 1978). A foz do Guadiana situa-se na extremidade Este da costa Sul de Portugal. A largura do rio varia entre cerca de 550 m em Vila Real de Santo António e 30 - 40 m mais para montante. As profundidades são superiores a 5 m, e em geral situam-se entre 7 - 10 m. A profundidade máxima atinge segundo Rodrigues da Costa (1980) cerca de 15 - 17 m.

Apesar de não se encontrar estudado o regime de marés, constata-se que o seu efeito se faz sentir para montante de Mértola, a cerca de 70 km da foz (Rodrigues da Costa, 1980; González, 1995). A velocidade da corrente determinada empiricamente para a situação de vazante ronda 1,75 - 2 m.s⁻¹ e cerca de 1 m.s⁻¹ marés mortas. Na enchente, os valores são ligeiramente inferiores (Rodrigues da Costa, 1980). González (1995) compilou informação relativa às características geológicas, edafo-climáticas e hidrológicas do rio Guadiana, e definiu três sectores estuarinos: 1) estuário inferior (ou marinho), parte do estuário com maior extensão lateral. Situa-se entre a foz da ribeira do Beliche (12 km a Norte de Vila Real Santo António) e a foz do rio Guadiana. Apresenta uma morfologia deltaica de domínio misto (ondulação/maré) e é o sector com maior profusão de formas, 2) estuário médio (desde Álamo, 20 km a norte de Vila Real Santo António, até à foz da ribeira do Beliche). As formas, sedimentos e vegetação apresentam um claro carácter de gradiente, embora a maioria do volume de sedimentos seja de origem fluvial. Este sector é claramente controlado pelas marés; e 3) estuário superior (ou fluvial) desde Mértola até ao paralelo do Álamo. Apesar da influência das marés, esta zona caracteriza-se pela presença de formas e sedimentos de origem fluvial e pela colonização das margens por vegetação dulçaquícola (FIGURA 1).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Metodologia de Campo

A amostragem decorreu entre Março e Setembro de 1997 em virtude de esse período corresponder aos maiores valores de abundância das larvas dos *taxa* considerados, nas bacias em estudo e em outros sistemas similares (*cf.* Antunes *et al.*, 1988; Chícharo, 1988; Ré & Gonçalves, 1993; Ré, 1994; Alexandrino, 1996).

3.1.1. Estratégia lagrangiana

Definiram-se 18 estações de amostragem, 8 no Rio Mira (de Vila Nova Milfontes a Odemira, a cerca de 25 km da foz) e 10 no Rio Guadiana (de Vila Real Santo António a Mourão, a cerca de 178 km da foz), de acordo com as propostas de zonação referidas anteriormente (*cf.* Secção 2.) (FIGURA 1 e ANEXO I).

Em cada estação, registou-se a temperatura e salinidade superficial da água (*ca.* 50 cm de profundidade), utilizando, respectivamente, um termómetro de balde e um refractómetro. Estimou-se a turbidez, *i.e.* profundidade de extinção da luz, com um disco de Secchii.

Para recolher microzooplâncton, organismos com dimensões entre 0,06 e 0,5 mm (Omori & Ikeda, 1992), filtraram-se 10 - 20 litros de água (colhidos a cerca de 50 cm de profundidade) por um crivo com malha de 0,06 mm. As amostras foram fixadas em formaldeído a 4% tamponizado com tetraborato de sódio.

Para a recolha de mesozooplâncton, organismos com dimensões superiores a 0,5 mm (Omori & Ikeda, 1992), realizaram-se arrastos sub-superficiais (*ca.* 50 - 75 cm profundidade) e horizontais com rede cónica de 0,5 mm de malha, 0,37 m de diâmetro de boca e 1,6 m de comprimento, durante 5 - 10 minutos. A rede estava equipada com um fluxómetro General Oceanics e com um copo colector Hydrobios mod. 438950. Os arrastos foram realizados à velocidade constante de 2 nós. De modo a conhecer o volume filtrado pela rede recorreu-se ao número de rotações efectuadas pelo fluxómetro, ao factor de calibração do aparelho (0,027 m), ou seja, a distância percorrida que corresponde a uma rotação do fluxómetro, e à área da boca da rede. Assim, foi possível calcular o volume filtrado (em m³) através da seguinte fórmula:

$$\text{Volume Filtrado (m}^3\text{)} = \Delta(\text{rotações}) \times 0,027 \text{ m} \times 0,1075 \text{ m}^2.$$

Após cada arrasto, a amostra foi concentrada no copo colector por lavagens da rede (sem a imergir completamente), e o conteúdo do copo colector foi sucessivamente vertido numa caixa de petri negra. As larvas de peixe foram retiradas, colocadas em microtubos Eppendorf referenciados e imediatamente congeladas em azoto líquido (-197 °C). No laboratório, os microtubos foram conservadas a -80 °C. Os restantes zooplanctontes foram fixados em formaldeído a 4% tamponizado com tetraborato de sódio.

3.1.2. Estratégia euleriana

Em Maio, Junho, Julho e Setembro de 1997 realizaram-se ciclos de colheitas de 24 horas nas estações de Vila Real de Santo António (rio Guadiana) e Vila Nova de Milfontes (rio Mira). De duas em duas horas registaram-se a temperatura, salinidade e turbidez, e recolheram-se amostras de micro- e mesozooplâncton, de acordo com as metodologias descritas anteriormente.

3.2. Processamento Laboratorial

3.2.1. Análise quantitativa

As amostras formalizadas de micro- e mesozooplâncton foram observadas utilizando um microscópio de inversão Zeiss Labovert e uma lupa binocular Wild M8, respectivamente. Identificaram-se os zooplanctontes até ao nível taxonómico mais baixo possível recorrendo aos manuais de identificação de Newell & Newell (1963), Russell (1976), Smith (1977) e Todd & Laverack (1991), e às fichas de identificação editadas pelo Conselho Internacional para a Exploração do Mar (CIEM/ICES), e determinou-se a sua abundância (ind./100m³). As larvas de peixe foram identificadas até à família de modo a reduzir a possibilidade de se obterem conclusões baseadas em erros de identificação taxonómica e para incorporar espécies pouco representadas (Scheidegger & Bain, 1995). A partir de 7 amostras replicadas, recolhidas aleatoriamente durante o mês de Abril, estimou-se a variabilidade das

determinações da abundância de zooplâncton através do coeficiente de variação (CV), *i.e.* $CV = \text{erro-padrão}/\text{média} * 100$.

Nas amostras de microzooplâncton, e sempre que necessário, subamostrou-se (1 ml) sucessivamente o volume da amostra recorrendo a uma pipeta de Stempel de 5 ml. Em cada amostra e para cada *taxon* contou-se um número de indivíduos não inferior a 300 como sugerem Omori & Ikeda (1992).

Nas amostras de mesozoplâncton, e quando o número de organismos o exigia, a amostra foi dividida em subamostras utilizando o princípio do fraccionador de Folsom. O critério de contagem seguido foi idêntico ao utilizado para as amostras de microzooplâncton. O comprimento padrão (CP) e o diâmetro ocular (DO) das larvas de clupeiformes formalizadas foram medidos com uma ocular micrométrica (ao 0,1 mm inferior).

3.2.2. Análise da condição nutricional

Os reagentes utilizados para a avaliação da condição nutricional foram de qualidade *pro analyse* e as soluções preparadas em material de vidro previamente lavado com mistura cromossulfúrica (ver Pombeiro, 1991) e água destilada, e seco em estufa a 60 °C durante 24 horas. Os protocolos para a preparação dos reagentes estão descritos no ANEXO II.

3.2.2.1. Homogeneização e extração dos ácidos nucleicos

As larvas de peixe foram descongeladas, identificadas [usando as chaves apresentadas por Newell & Newell (1963), Russell (1976) e as fichas de identificação editadas pelo Conselho Internacional para a Exploração do Mar (CIEM/ICES)], e medidas com aproximação ao 0,1 mm inferior, utilizando uma ocular micrométrica instalada numa lupa binocular Wild M8. Os ácidos nucleicos foram extraídos por homogeneização das larvas em 0,15 ml de sarcosina 1% em tris-EDTA e posterior diluição até 1,5 ml com tris-EDTA segundo o fluxograma da TABELA 1. Durante todo o processo os micro-tubos Eppendorf contendo as larvas foram mantidos sobre placas térmicas a uma temperatura inferior a 5 °C.

Para comparar os resultados obtidos com duas técnicas fluorimétricas relativamente diferentes para a determinação do conteúdo em ácidos nucleicos, as

larvas congeladas foram processadas de acordo com as metodologias de Caldarone & Buckley (1991) (CB) e de Clemmesen (1988, 1993) adaptada por Chícharo (1996) (CC).

Método de Caldarone & Buckley (1991) (CB) - uma aliquota de 0,2 ml de homogeneizado foi combinada com 0,4 ml de Tris-NaCl. A outra aliquota de 0,2 ml do mesmo homogeneizado foi adicionado 0,35 ml de Tris-NaCl e 0,05 ml de Ribonuclease A. Esta solução foi incubada a 37 °C durante 30 minutos (TABELA 2).

Método de Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chícharo (1996) (CC) - a uma terceira aliquota de 0,6 ml do mesmo homogeneizado foi adicionado 0,6 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (49,5:1:49,5 v/v), e a solução agitada durante 10 minutos e centrifugada a 6000 rpm (<3 °C) por período idêntico. O sobrenadante foi transferido para um novo micro-tubo Eppendorf ao qual se adicionou clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Os micro-tubos foram agitados durante 1 minuto e centrifugados durante 5 minutos a temperatura inferior a 3° C (TABELA 3). A fase aquosa contendo os ácidos nucleicos foi transferida para um novo micro-tubo, eliminando-se a fase contendo os solventes orgânicos.

TABELA 1 - Fluxograma da parte do protocolo referente à homogeneização das larvas e extração dos ácidos nucleicos.

Homogeneização e Extração dos Ácidos Nucleicos
Larva (>200 µg peso seco)
+
0,15 ml Sarcosina (1% em Tris-EDTA)

Vortex

15 minutos à temperatura ambiente

Vortex vigoroso

15 minutos à temperatura ambiente
+
1,35 ml Tris-EDTA

Agitação (>1 minuto)

Centrifugação a 4930 rpm (5 minutos, T<5°C)

TABELA 2 - Fluxograma relativo à quantificação dos conteúdo em ácidos nucleicos através do método de Caldarone & Buckley (1991).

Quantificação dos Ácidos Nucleicos	
(DNA+RNA)	(DNA)
0,200 ml Sobrenadante	0,200 ml Sobrenadante
+	+
0,400 ml Tris-Base	0,350 ml Tris-Base
+	+
0,050 ml EB	0,050 ml RNase
***	***
Leitura	Incubação a 37 °C (30 minutos)
	+
	Arrefecimento (15 minutos)
	+
	0,050 ml EB

	Leitura

TABELA 3 - Fluxograma relativo à quantificação dos conteúdo em ácidos nucleicos através do método de Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chicharo (1996).

Quantificação dos Ácidos Nucleicos	
(DNA+RNA)	(DNA)
0,600 ml Sobrenadante	
+	
0,600 ml Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (49,5:1:49,5 v/v)	

Agitação (10 minutos)	

Centrifugação a 6000 rpm (10 minutos, T<5 °C)	

0,300 ml Sobrenadante	
+	
0,300 ml Clorofórmio:Álcool Isomílico (24:1 v/v)	

Agitação (1 minuto)	

Centrifugação a 6000 rpm (5 minutos, T<5 °C)	
-----	-----
0,100 ml Sobrenadante	0,100 ml Sobrenadante
+	+
0,500 ml Tris-Base	0,450 ml Tris Base
+	+
0,050 ml EB	0,050 RNase
***	***
Leitura	Incubação a 37 °C (30 minutos)
	+
	Arrefecimento (15 minutos)
	+

0,050 ml EB

Leitura

3.2.2.2. *Quantificação dos ácidos nucleicos*

Os cálculos envolvidos na determinação das concentrações em ácidos nucleicos foram semelhantes para ambos os métodos. A fluorescência endógena das amostras ("branco") foi subtraída ao valor de fluorescência medido para o complexo amostra-fluóforo. A fluorescência associada ao RNA, maioritariamente ribossomal, foi calculada pela diferença entre a fluorescência total (DNA + RNA) e a fluorescência medida após a digestão do RNA pela Ribonuclease. Neste trabalho, e como sugere Chicharo (1996), utilizou-se o brometo de etídio (EB) para determinar as fluorescências dos ácidos nucleicos.

Determinou-se a fluorescência das amostras, com comprimentos de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 590 nm, usando um espectrofluorómetro Hitachi modelo 650-10. As concentrações foram determinadas com base em rectas-padrão DNA-EB e RNA-EB, elaboradas simultâneamente a partir de soluções apropriadas de padrão de DNA e RNA (ANEXO II).

3.2.2.3. *Quantificação das proteínas*

Determinou-se a concentração em proteínas solúveis das larvas segundo um procedimento adaptado de Bradford (1976). As soluções de proteínas foram preparadas com uma solução tampão de NaCl 0,15 M. Os protocolos para a preparação das soluções utilizadas na análise proteica das larvas são apresentados no ANEXO I.

Para a quantificação do conteúdo proteico larvar, adicionou-se 0,9 ml de reagente de Coomassie a 0,2 ml da solução obtida num passo intermédio do procedimento descrito para a determinação dos ácidos nucleicos (TABELA 4). A solução foi agitada durante alguns segundos e, após um período de cerca de 5 minutos, determinou-se a absorvância da solução a 595 nm num espectrofotómetro Hitachi U-1100. As concentrações das proteínas foram calculadas a partir de rectas-padrão elaboradas diariamente com albumina pura de bovino [0,5 mg/ml] (ANEXO

II). Analisou-se a precisão das determinações das proteínas solúveis através do coeficiente de variação (CV), ou seja, $CV = \text{erro-padrão}/\text{média} * 100$.

TABELA 4 - Fluxograma do procedimento de Bradford (1976) para a quantificação das proteínas.

Quantificação das proteínas solúveis com Azul Brillante de Coomassie
0,2 ml homogeneizado (congelado no final do procedimento esquematizado na TABELA 1)
+
0,9 ml Reagente de Coomassie ***
Vortex ***
Incubação (~2 minutos) à temperatura ambiente ***
Leitura

3.2.2.4. Índices de condição

Com base nas concentrações em ácidos nucleicos e proteínas solúveis obtidas calcularam-se os índices RNA/DNA, PROT/RNA e PROT/DNA. Calculou-se, ainda, a taxa de crescimento proteico instantâneo (Gpi) de acordo com a seguinte equação (Buckley, 1984):

$$Gpi (\%/dia) = 18,18 - 4,75*RNA/DNA + 0,93*T$$

em que *RNA/DNA* é a razão entre ácidos nucleicos obtida pela técnica de Clemmesen (1988, 1993) adaptada por Chícharo (1996) e *T* a temperatura da água no momento da captura em °C.

3.3. Análise dos Dados

3.3.1. Associação entre ovos e larvas de peixe e parâmetros hidrológicos e biológicos

As relações entre a abundância dos ovos e das larvas de peixe, e dos parâmetros hidrológicos, potenciais presas e predadores/competidores foram estudadas usando o coeficiente de correlação de Spearman (Conover, 1980). Esta análise de correlação não pressupõe a distribuição normal das variáveis em estudo e não assume um tipo

particular de relação entre as variáveis. Adicionalmente, se se considerar $\alpha=0,05$ numa matriz de correlações, uma em cada vinte interações será significativa devido ao acaso (Cushing, comunicação pessoal). Por forma a eliminar essa possibilidade, o nível de significância de r foi corrigido de acordo com o método de Bonferroni (Snedecor & Cochran, 1982): α/n' , em que n' é o número de pares de interações na matriz.

O ajuste dos modelos de regressão entre parâmetros da abundância dos ovos e larvas de peixe, factores hidrológicos e outros zooplanctontes foi analisado com base no coeficiente de determinação e nos coeficientes de correlação parcial, e a significância com base nos resultados da ANOVA (Zar, 1996).

3.3.2. Limite de detecção da técnica fluorimétrica

O limite de detecção da técnica fluorimétrica foi determinado segundo Miller & Miller (1988), que o definem como a concentração que produz uma leitura (y) (fluorescência relativa) igual à leitura do "branco" (y_b) mais dois desvios-padrão (s_b) do "branco": $y = y_b + 2 * s_b$.

3.3.3. Percentagem de recuperação de ácidos nucleicos e variabilidade das determinações

Determinou-se a percentagem de recuperação de ácidos nucleicos através da adição de volumes conhecidos de solução-padrão (DNA- λ e RNA-16s+23s) a oito replicados de um homogeneizado de 24 larvas. As concentrações em ácidos nucleicos finais foram corrigidas com base nestes valores. A variabilidade das determinações foi avaliada recorrendo ao coeficiente de variação, $CV = \text{desvio-padrão}/\text{média} * 100$.

3.3.4. Comparação de métodos para extração e quantificação de ácidos nucleicos

Os valores obtidos pelos dois métodos estudados (CB e CC) para as concentrações em ácidos nucleicos e razões RNA/DNA foram logaritmizados [$\text{Log}(x+1)$] por forma a corrigir a não-normalidade. A distribuição normal dos dados transformados foi, então, avaliada recorrendo ao teste de Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1996). Para a análise comparativa utilizaram-se os dados relativos às famílias

Clupeidae ($n=51$), Blennidae ($n=84$), Gobiidae ($n=141$) e Atherinidae ($n=46$) em virtude da sua abundância relativa corresponder a mais de 10% do total de larvas analisadas. As diferenças entre bacias, famílias e métodos foram estudadas através de ANOVA com o comprimento-padrão como co-variável contínua. As relações entre Log(DNA), Log(RNA) e Log(RNA/DNA) obtidos com os dois métodos foram estudadas usando regressão linear (método dos mínimos quadrados) e a sua significância testada por ANOVA. O ajuste e significância desses modelos de regressão foram analisados com base no coeficiente de determinação, r^2 , e nos resultados da ANOVA, respectivamente (Zar, 1996). Complementarmente, a hipótese nula, $H_0: b=1$, foi testada usando o teste t -Student (Zar, 1996).

3.3.5. Relação entre parâmetros da condição nutricional e factores abióticos/bióticos relevantes

Utilizou-se informação bioquímica referente a 340 larvas de peixe, 57 larvas de Clupeidae, 12 de Engraulidae, 84 de Blennidae, 141 de Gobiidae e 46 de Atherinidae. As famílias consideradas, excepto Engraulidae, corresponderam a mais de 10% do número total de larvas analisadas. Os valores dos conteúdos em ácidos nucleicos e dos índices de condição (RNA/DNA, PROT/RNA, PROT/DNA e Gpi) foram relacionados com os parâmetros abióticos estudados, com Log(abundância de presas) e com Log(abundância de potenciais predadores) através do coeficiente de correlação de Spearman (Conover, 1980). Como referido anteriormente, α foi corrigido de acordo com o método de Bonferroni (Snedecor & Cochran, 1982). Posteriormente, os factores que se correlacionaram significativamente foram integrados em modelos de regressão linear/curvilínea, simples ou múltipla (Zar, 1996). O ajuste e significância desses modelos de regressão foram analisados com base no coeficiente de determinação, nos coeficientes de correlação parcial, e nos resultados da ANOVA, respectivamente (Zar, 1996).

3.3.6. Comparação da condição nutricional larvar entre noite/dia e entre bacias

Preliminarmente, determinou-se a percentagem de larvas em estado de inanição com base nos seguintes critérios: 1) larvas com RNA/DNA inferior a 1,3 (clupeídeos), e 1,0 (restantes famílias) (cf. Clemmesen, 1994; Chícharo, 1996) e 2)

larvas com $G_{pi} < 0\%$ (Buckley, 1984). Complementarmente, calculou-se o valor crítico da razão RNA/DNA, *i.e.* RNA/DNA correspondente a um crescimento proteico igual a zero, a partir de $RNA/DNA(\text{crítico}) = 3,83 - 0,196 \cdot T$ (Buckley, 1984)

Compararam-se os índices de condição nutricional e parâmetros associados entre dia (6:30 - 21:00 H) e noite (21:00 - 6:30 H) e entre bacias (rios Mira e Guadiana), considerando os dados combinados da análise bioquímica (famílias Clupeidae, Blennidae, Gobiidae e Atherinidae) e as variáveis logaritmizadas [$\text{Log}(x + 1)$], através de ANOVA a três entradas (factores *Bacia*, *Dia/Noite* e *Familia*) com o CP e Temperatura como co-variáveis contínuas. Posteriormente, compararam-se os valores logaritmizados, [$\text{Log}(x + 1)$], dos índices determinados entre bacias através do teste *t*-Student (Zar, 1996).

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros hidrológicos e distribuição das potenciais presas e predadores/competidores.

4.1.1. Variação espacial

Os parâmetros hidrológicos médios foram diferentes nos dois rios. Enquanto no rio Mira a temperatura, salinidade e turbidez foram, respectivamente $24,8 \pm 2,37$ °C, $18,8 \pm 11,17$ ppm e $50,9 \pm 50,7$ cm, no rio Guadiana os valores foram menores para a temperatura e salinidade ($21,5 \pm 3,69$ °C e $10,2 \pm 12,12$ ppm, respectivamente), e maior para a turbidez $74,0 \pm 37,05$ cm. Os vários parâmetros apresentaram gradientes montante-jusante, decrescentes no caso da temperatura e crescentes para a salinidade (FIGURA 2) e profundidade do disco de Secchii.

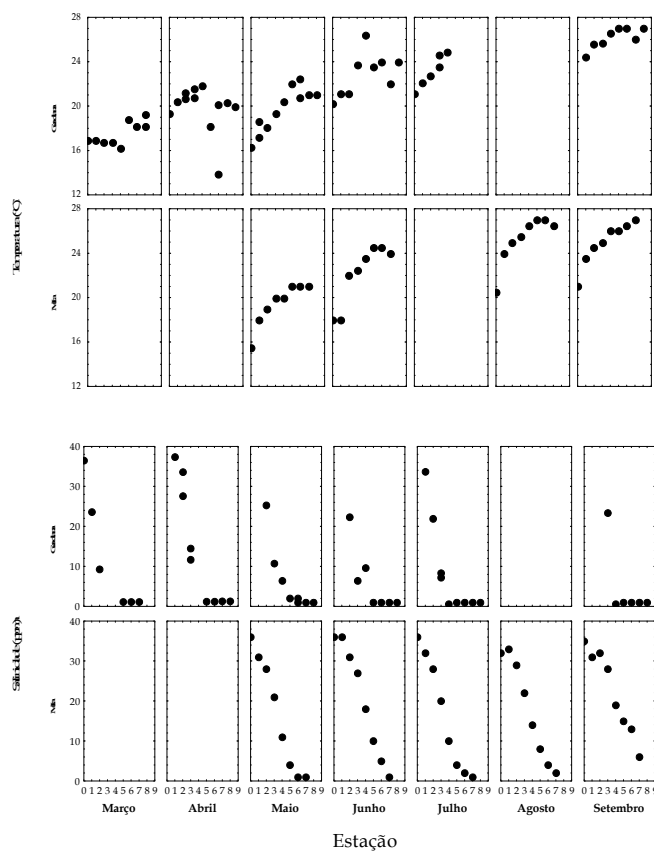


FIGURA 2 - Variação espacial da temperatura e salinidade registadas nos rios Mira e Guadiana.

Considerando os volumes médios filtrados em cada rio ($55,5 \pm 20,77 \text{ m}^3$ no rio Mira e $54,6 \pm 27,49 \text{ m}^3$ no rio Guadiana), a abundância total de micro- e ictioplanctontes foi maior no rio Guadiana ($3,23 * 10^6$ e $1,16 * 10^4 \text{ ind./100m}^3$ vs. $1,09 * 10^6$ e $7,24 * 10^3 \text{ ind./100m}^3$) e a abundância de mesozooplanctontes foi menor ($1,21 * 10^5$ vs. $1,58 * 10^5 \text{ ind./100m}^3$). O coeficiente de variação associado aos valores de abundância foi de 48,5%.

4.1.1.1. Rio Mira

No rio Mira, os *nauplii* de copéodes dominaram a fracção microzooplanctónica das amostras (>86% da abundância total). Aquele *taxon* ocorreu principalmente nas estações mais a jusante (zonas 1 e 2) e em número bastante apreciável (máximo de $\sim 228000 \text{ ind./100m}^3$ na estação #3 em Setembro) (FIGURA 3). A abundância dos gastrópodes (2,9%) variou bastante durante o período de amostragem, com máximo em Setembro na estação #0 ($21000 \text{ ind./100m}^3$) e mínimo em Maio na estação #1 ($\sim 49 \text{ ind./100m}^3$). Os foraminíferos (3,2% da abundância total) ocorreram apenas em Junho ($\sim 49 \text{ ind./100m}^3$), Agosto ($17500 \text{ ind./100m}^3$) e Setembro ($14000 \text{ ind./100m}^3$) em estações do estuário inferior (zonas 1 e 2). Os dinoflagelados (2,7% do total) e os copépoditos ($\sim 1,5\%$) surgiram apenas em amostras obtidas em Setembro (estação #0 e 3) com efectivos importantes, ~ 29200 e 7000 ind./100m^3 , respectivamente (FIGURA 4).

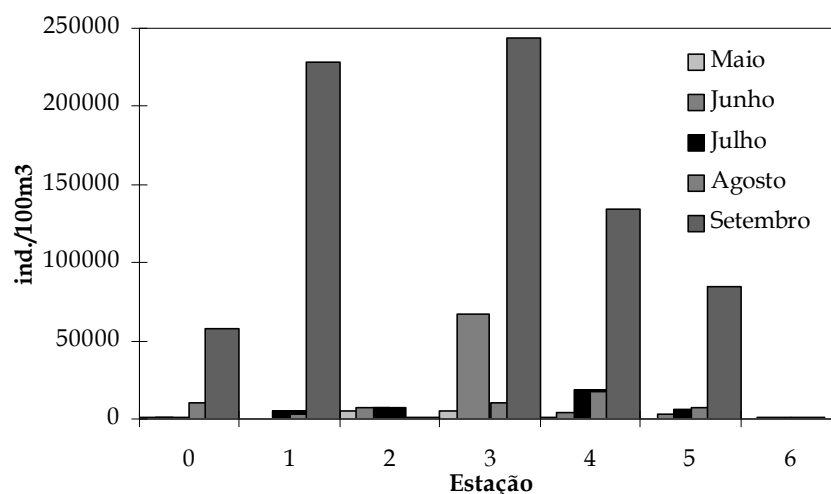


FIGURA 3 - Variação espacial dos *nauplii* de copéodes no rio Mira.

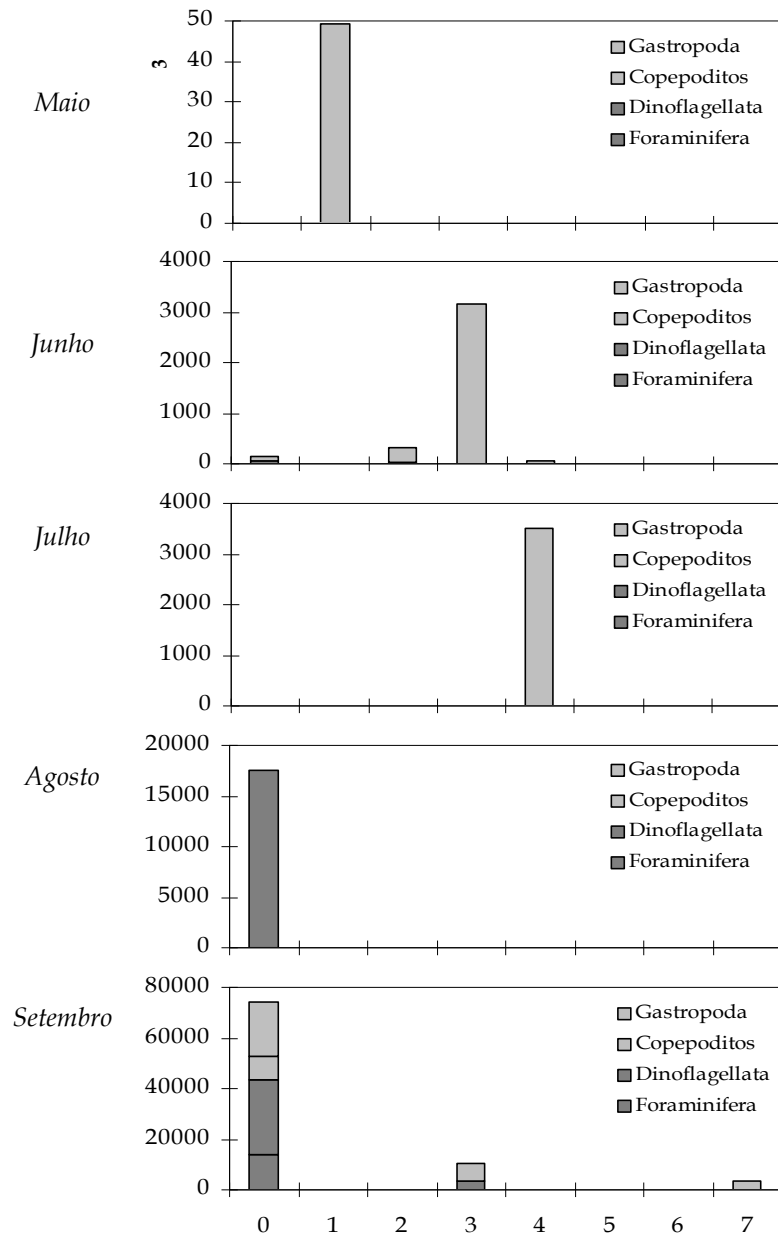


FIGURA 4 - Variação espacial das larvas de gastrópodes, dos copepoditos, dos dinoflagelados e dos foraminíferos no rio Mira.

Quanto aos mesozooplanc-tontes, a abundância de hidrozoários, que representaram ~43,6% da abundância total, variou bastante ao longo do período de amostragem e estações estudadas. Em Maio e Junho, os máximos verificaram-se nas estações #6 (~12500 ind./100m³) e 0 (~2240 ind./100m³), respectivamente. Entre Julho e Setembro as maiores abundâncias ocorreram nas estações intermédias (#3 - 5, entre 2000 e 12000 ind./100m³). Os misidáceos (32,2% do total) ocorreram esporadicamente nas estações mais a montante (#4 - 6) em densidades que variaram entre ~38 ind./100m³, na estação #4 em Agosto, e ~37600 ind./100m³, na estação 6 em Junho

(FIGURA 5). A abundância de *zoea/mysis* de decápodes (8,3%) distribuiu-se bimodalmente, com máximos nas estações mais a jusante (#0 e 1) de cerca 590 ind./100m³, e a montante (estações #5 - 6) de cerca 650 ind./100m³. Quanto aos *nauplii* (~4,6% do total), os valores máximos de abundância verificaram-se em Agosto (estação #6, ~7200 ind./100m³) sendo que durante o período de amostragem estes mesozooplanc-tontes ocorreram regularmente em número inferior (<250 ind./100m³). Por fim, os copépodes (5,3% do total), ocorreram em número apreciável em Junho e Julho (máximos de ~6300 e ~1600 ind./100m³, respectivamente) nas estações #1 e 2. Nos restantes meses a densidade não ultrapassou ~320 ind./100m³ (FIGURA 5).

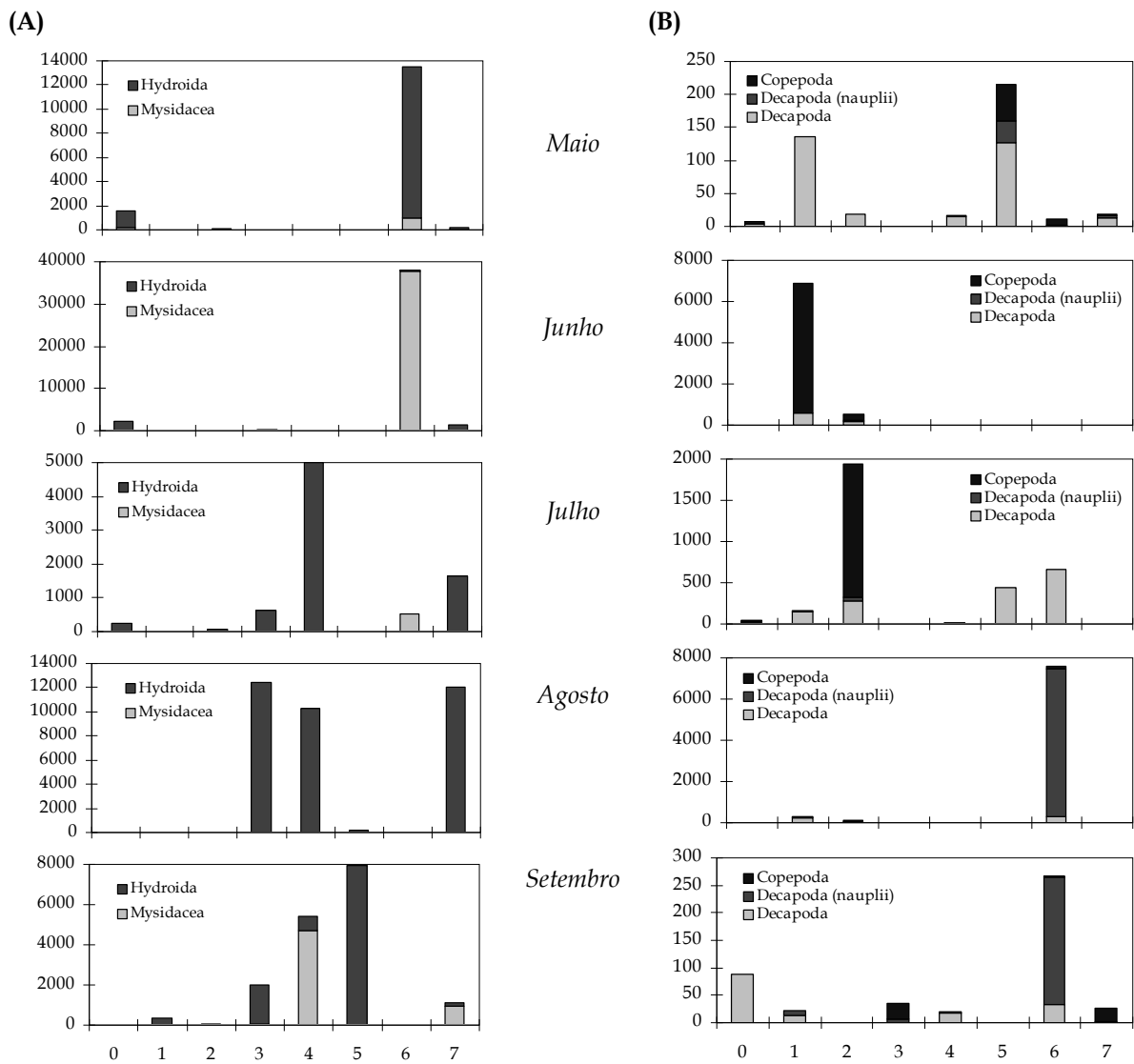


FIGURA 5 - Variação espacial dos (A) hidrozoários, dos misidáceos, e (B) dos copépodes e dos decápodes no rio Mira.

Ocorreram ovos de peixe em todos os meses, verificando-se as maiores abundâncias em Junho (com cerca de 4500 ovos/100m³ na estação #1), Julho e Agosto (com máximos de <400 ovos/100m³ nas estações #1 e #2, respectivamente). Os ovos de *Engraulis* sp. ocorreram regularmente ao longo do período de amostragem, com abundâncias superiores a 300 e 150 ind./100m³ nas estações #1 e 2, respectivamente em Julho e Agosto (FIGURA 6).

Capturaram-se larvas de clupeídeos (*Alosa* spp.) em Maio, Agosto e Setembro em estações mais a jusante (#0 e 1) e em Julho na estação #6. Apenas se registou uma ocorrência de larvas de *Engraulis* sp. em Setembro na estação #1. Os gobídeos ocorreram entre Junho e Setembro em estações intermédias (#1 - 4), com densidades que variaram entre ~2 e <35 ind./100m³. Apenas ocorreram larvas de aterinídeos em Junho na estação #1 (~5 ind./100m³) (FIGURA 7).

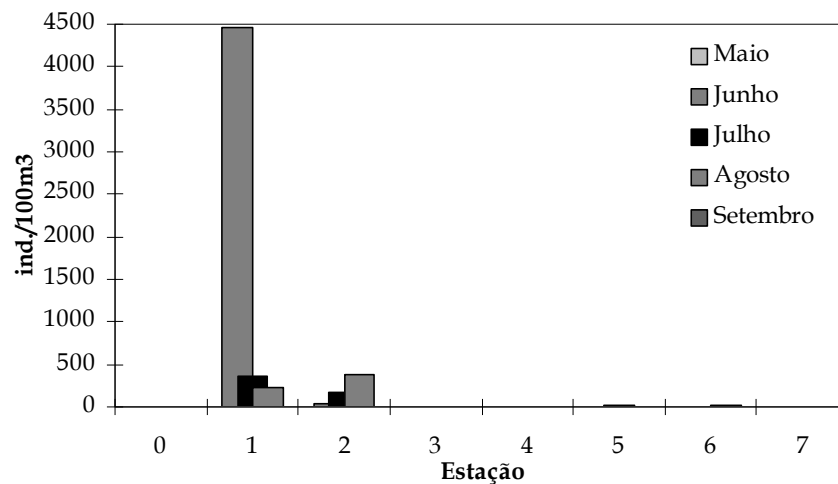


FIGURA 6 - Variação espacial dos ovos de peixe no rio Mira.

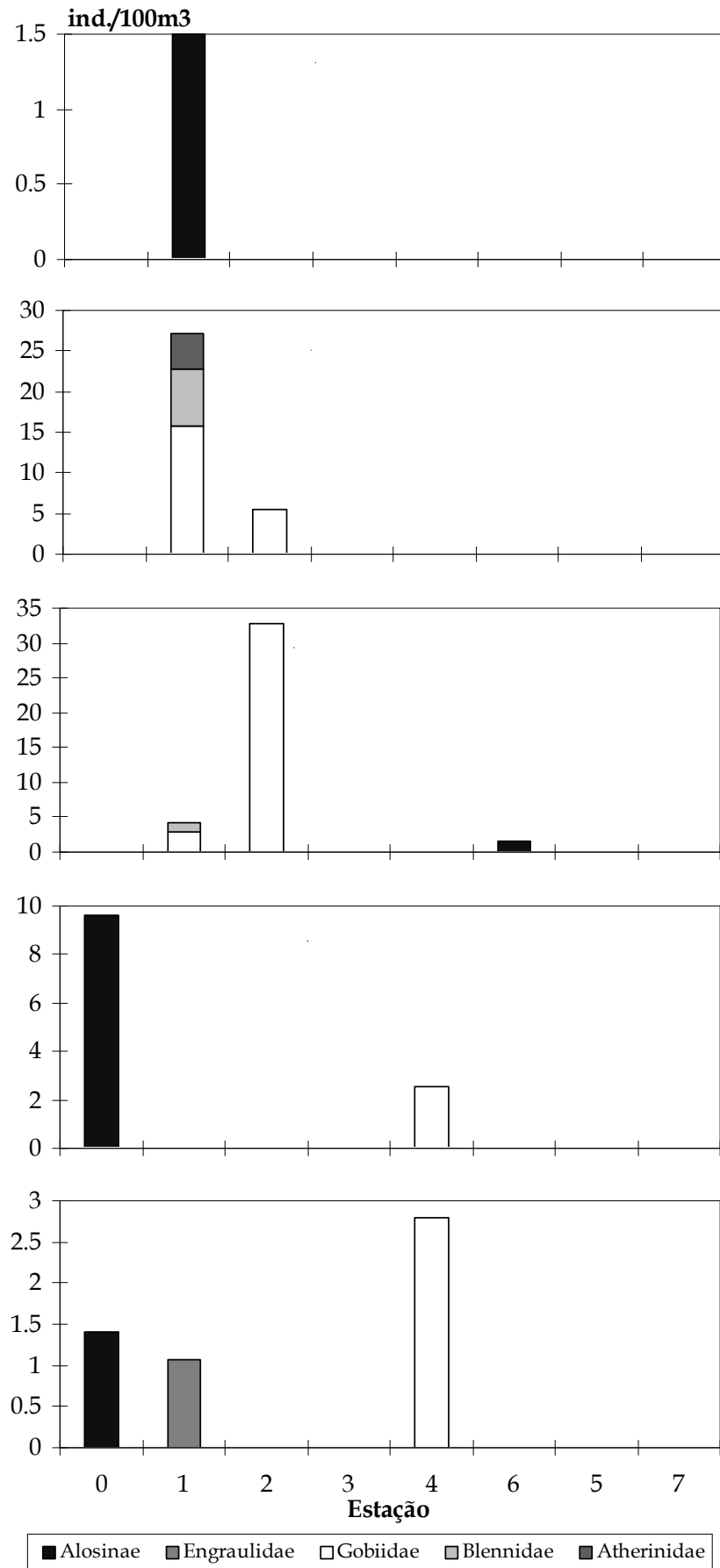


FIGURA 7 - Distribuição espacial das larvas de peixe no rio Mira.

4.1.1.2. Rio Guadiana

Entre os microzooplantontes, os *nauplii* de copépodes dominaram as amostras obtidas no rio Guadiana (>80% da abundância total), ocorrendo principalmente no estuário inferior (estações #1 - 4). Os copepoditos (7,7% do total) ocorreram apenas entre Março e Junho nas estações #1 a 5. Os rotíferos (2,2%) foram amostrados em maior número nas estações mais interiores (#5 - 9) em Julho e nas estações mais a jusante nos restantes meses. Quanto aos ciliados (7,4%), as maiores abundâncias ocorreram em Março (estações #5 - 9) e Abril (estações #0 - 4) (FIGURA 8).

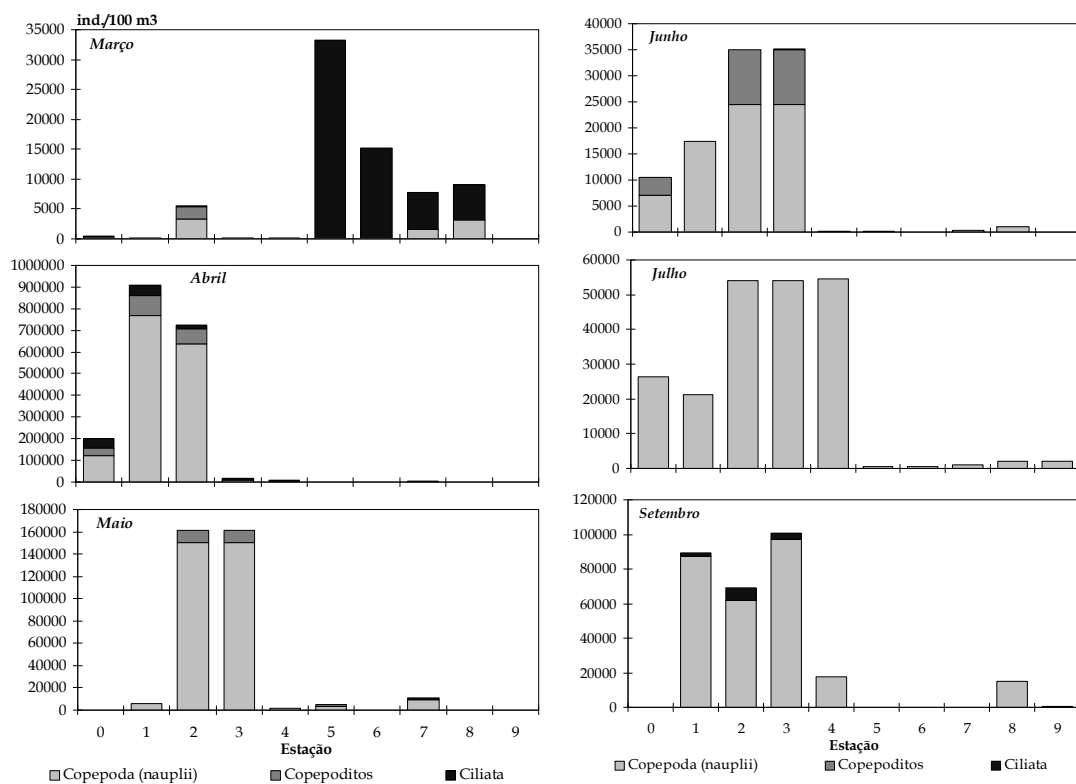


FIGURA 8 - Distribuição espacial dos ciliados, copepoditos e *nauplii* de copépodes no rio Guadiana.

No rio Guadiana, os copépodes constituíram o grupo mais abundante dos mesozooplanktontes (>57% da abundância total) e ocorreram de forma irregular ao longo do período de amostragem deste estudo e das estações prospectadas. Em Março registou-se um máximo (estação #1) de cerca 58700 ind./100m³. Entre Abril e Setembro, a abundância por estação diminuiu até Junho (com ocorrências nas estações interiores), aumentando posteriormente até Setembro (e nas estações mais interiores). Quanto aos cladóceros (~14%), o máximo ocorreu na estação #9 em Maio

(~13800 ind./100m³). As densidades foram maiores nas estações mais a jusante em Março/Abril e nas estações mais interiores em Julho e Setembro (FIGURA 9). Os insectos (2,5%) ocorreram irregularmente, enquanto os quelognatos (3,3%) ocorreram esporadicamente com máximo de abundância em Maio (~2700 ind./100m³, na estação #9) e mínimo em Abril (<2 ind./100m³, na estação #4). A abundância de *nauplii* de decápodes (7,4% do total) foi maior em Junho (estação #9, ~7250 ind./100m³) e, geralmente, nas estações mais interiores. As fases *zoea/mysis* (~3,8%) distribuíram-se irregularmente ao longo das estações, com maiores abundâncias em Maio (~1800 ind./100m³, estação #9) (FIGURA 10).

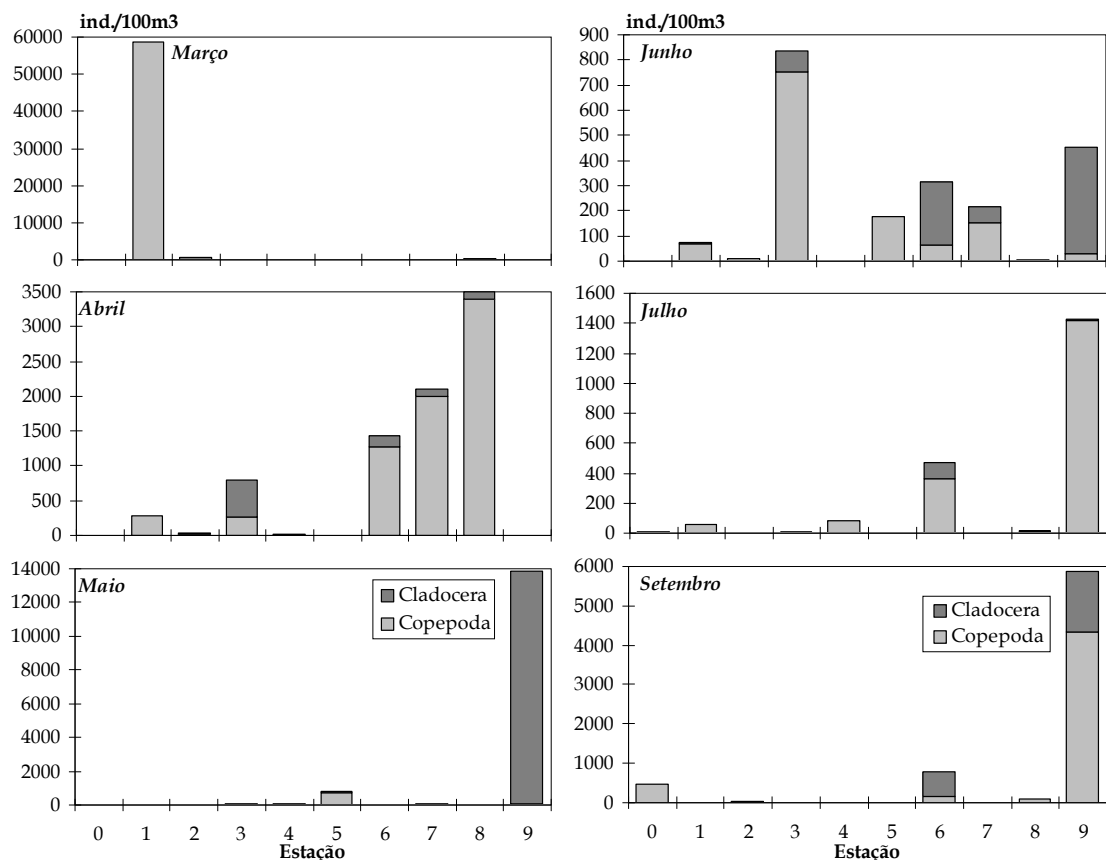


FIGURA 9 - Distribuição espacial dos cladóceros e copépodes no rio Guadiana.

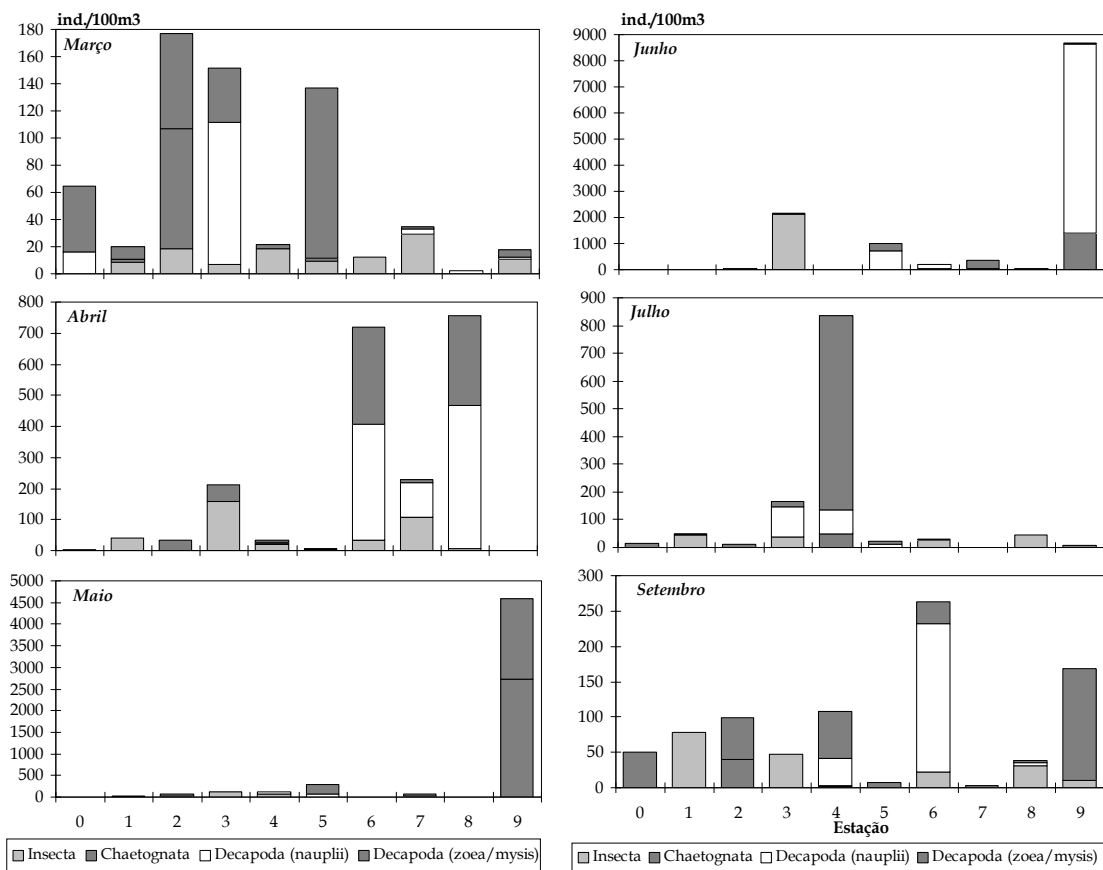


FIGURA 10 - Distribuição espacial dos decápodes (*nauplii*, *zoea* e *mysis*), dos quetognatos e dos insectos no rio Guadiana.

Os ovos de peixe constituiram um grupo importante do plâncton, com densidades de aproximadamente 35 ind./100m³ em Maio (estação #2), ~1000 ind./100m³ em Março (estação #5), Junho (estação #5) e Setembro (estação #4), e de cerca de 5000 ind./100m³ em Julho (estação #4). Assim, os ovos de clupeídeos (0,22% do total) ocorreram esporadicamente, contudo em Junho e Julho, registaram-se densidades de 100 - 180 ind./100m³ nas estações #5 e 4. Os ovos de *E. encrasicolus* (1,6% da abundância total) surgiram na estação #5 em Março e Abril e nas estações #4 - 7 entre Junho e Setembro em densidades apreciáveis (≤ 800 ind./100m³) (FIGURA 11).

As larvas de clupeídeos (<0,07% do total) não ocorreram em Maio e Setembro, e as densidades registadas nos restantes meses não ultrapassaram 35 ind./100m³ (de *Sardina* sp. na estação #2 em Março) sendo geralmente inferiores a 8 ind./100m³. Em Março, Maio-Julho recolheram-se larvas de clupeídeos (*Alosa* spp.) em estações mais a montante junto ao limite de intrusão da maré (#4 - 8). Registou-se um máximo de 12 ind./100m³ em Março na estação #8, e nos restantes meses em que ocorreu (Maio -

Julho) a densidade não excedeu 5 ind./100m³. Apenas em Julho foram amostradas larvas de *Engraulis* sp. (<0,005% do total), densidades <5 ind. 100 m⁻³, nas estações #0 e 4. Os gobídeos ocorreram em Março, Abril, Julho e Setembro, registrando-se um máximo de ~40 ind./100m³ na estação #4 (em Julho). Quanto aos blenídeos, ocorreram regularmente em todos os meses com densidades que variaram entre <2 ind./100m³ (estações #0 e 7, em Setembro) e ~10 ind./100m³ (estação #4 em Março, Abril e Maio). Foram colhidas larvas de atherídeos em Abril, Junho e Julho, em estações mais a montante (#5 - 7) e sempre com densidades inferiores a 5 ind./100m³ (FIGURA 12).

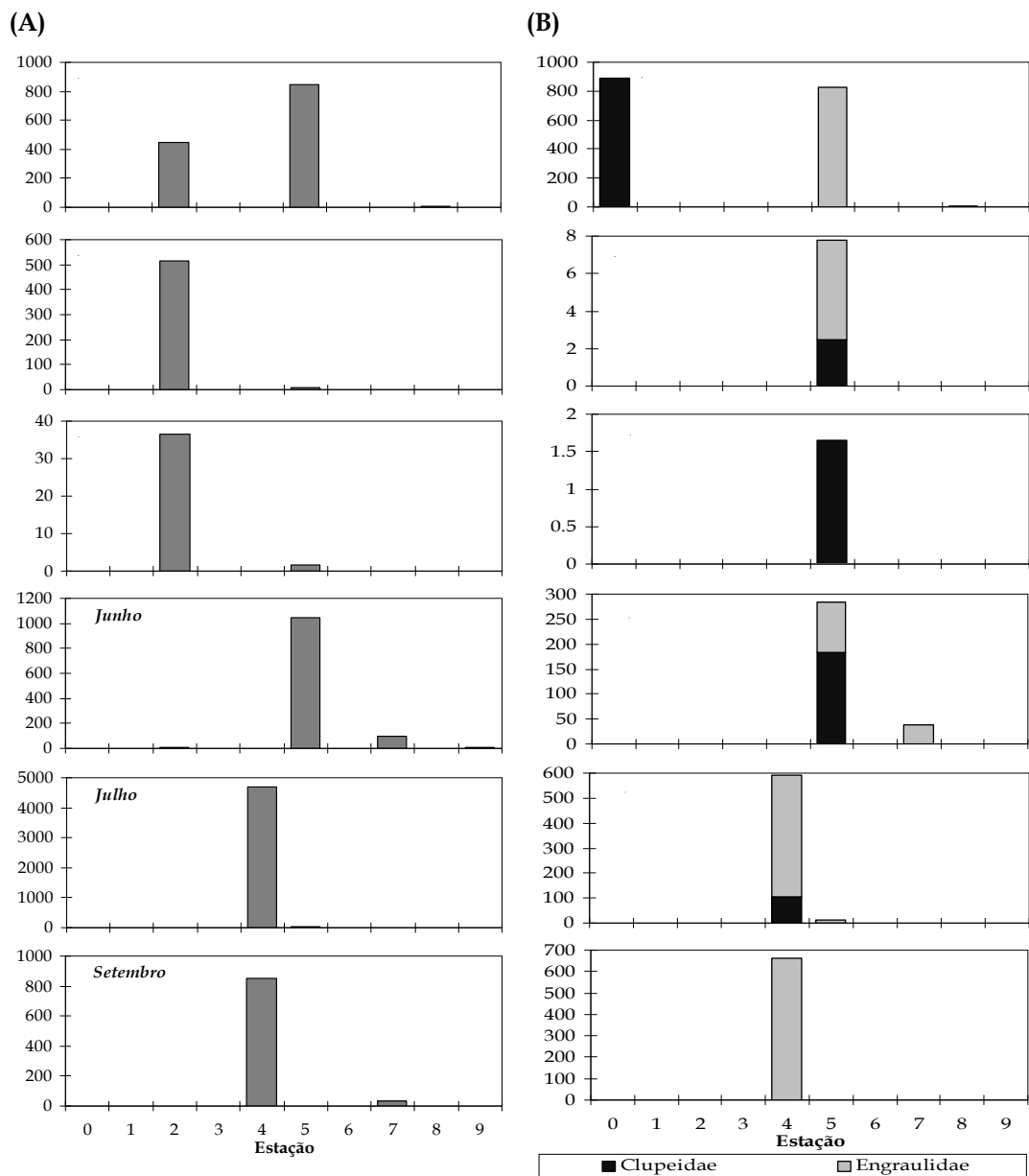


FIGURA 11 - Distribuição espacial dos ovos de peixe (A), e designadamente de clupeídeos e engraulídeos (B), no rio Guadiana.

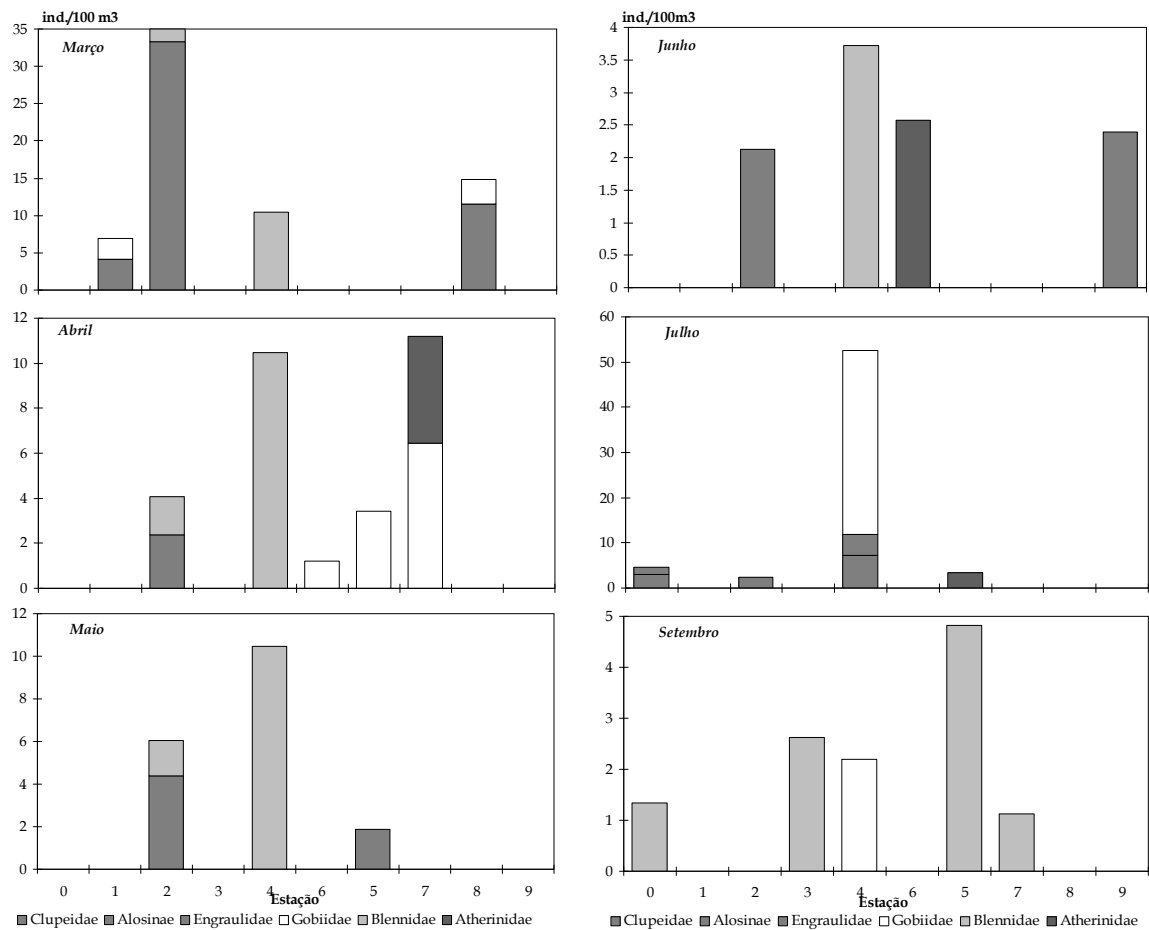


FIGURA 12 - Distribuição espacial da densidade de larvas de peixe no rio Guadiana.

4.1.2. Variação nictemeral

Os parâmetros hidrológicos registados variaram entre rios. Os valores da temperatura, da salinidade e da turbidez média no rio Mira, foram $18,9 \pm 1,52$ °C, $35,5 \pm 1,87$ ppm e $197 \pm 42,4$ cm, enquanto no rio Guadiana aqueles parâmetros foram $21,0 \pm 2,97$ °C, $33,5 \pm 3,86$ ppm e $127,5 \pm 55,6$ cm, respectivamente (FIGURA 13). A amplitude de marés nos dois rios foi relativamente semelhante, 2,60 m no rio Mira e 2,43 m no rio Guadiana. O mesmo se verificou para os volumes filtrados médios, *i.e.* $45,6 \pm 14,46$ m³ no rio Mira e $43,3 \pm 17,87$ m³ no rio Guadiana. A abundância de micro- e mesozoplâncton foi menor no rio Guadiana ($1,02 \cdot 10^6$ e $1,31 \cdot 10^5$ ind./100m³ vs. $3,28 \cdot 10^6$ e $4,01 \cdot 10^5$ ind./100m³, respectivamente). Pelo contrário, a abundância de ictioplantões foi maior no rio Guadiana, $5,90 \cdot 10^4$ vs. $1,01 \cdot 10^4$ ind./100m³.

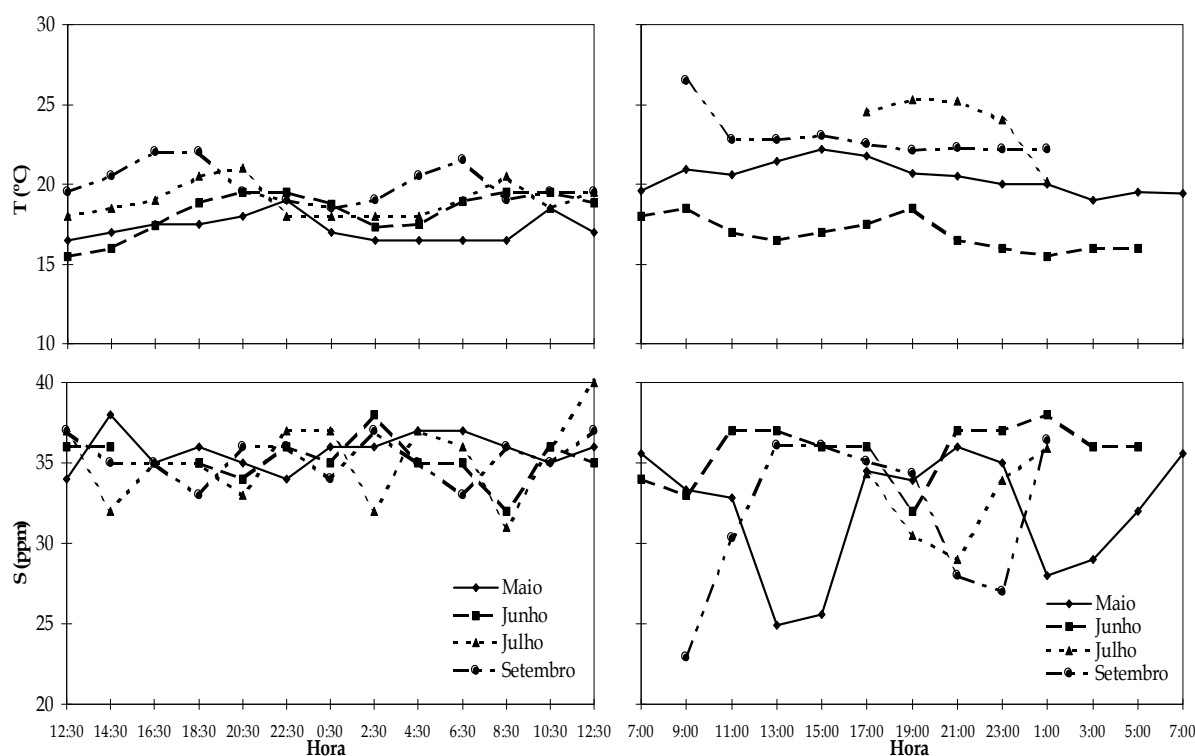


FIGURA 13 - Variação horária da temperatura e salinidade nos rios Mira (A) e Guadiana (B), nos quatro ciclos de 24 horas de amostragem realizados (linhas e pontos).

4.1.2.1. Rio Mira

Os estados larvares de copépodes microzooplânctónicos (*nauplii*, 23,8% da abundância total e copepoditos, 27,4% do total) ocorreram em todos os ciclos de 24 horas realizados no rio Mira. Excepto no mês de Junho, os *nauplii* de copépodes ocorreram associados à maré. Naquele mês, os valores máximos de densidade registaram-se durante a baixa-mar nocturna. Os copepoditos surgiram regularmente em Maio e esporadicamente nos ciclos de Junho e Setembro. Foram amostradas larvas de bivalves em todos os ciclos de 24 horas (31,8% do total), sendo que as maiores abundâncias se registaram em Maio (máximos de ~ 250000 ind./ 100m^3 às 12:30 e 6:30) (FIGURA 14). Os anelídeos (9,7%) ocorreram irregularmente em todos os ciclos de 24 horas, com os valores máximos registados em situação de enchente/preia-mar (~ 600 ind./ 100m^3 em Julho às 4:30 e ~ 110000 ind./ 100m^3 em Maio às 12:30). Os hidrozoários microzooplânctónicos (2,9%) apenas ocorreram durante o ciclo de Maio, com máximo às 2:30 em situação de preia-mar (~ 45000 ind./ 100m^3). Pelo contrário, as larvas de gastrópodes (2,1%) surgiram nos ciclos realizados em Junho, Julho e Setembro, variando as densidades entre ~ 100 e cerca de 17500 ind./ 100m^3 (em Julho, às 22:30) (FIGURA 14).

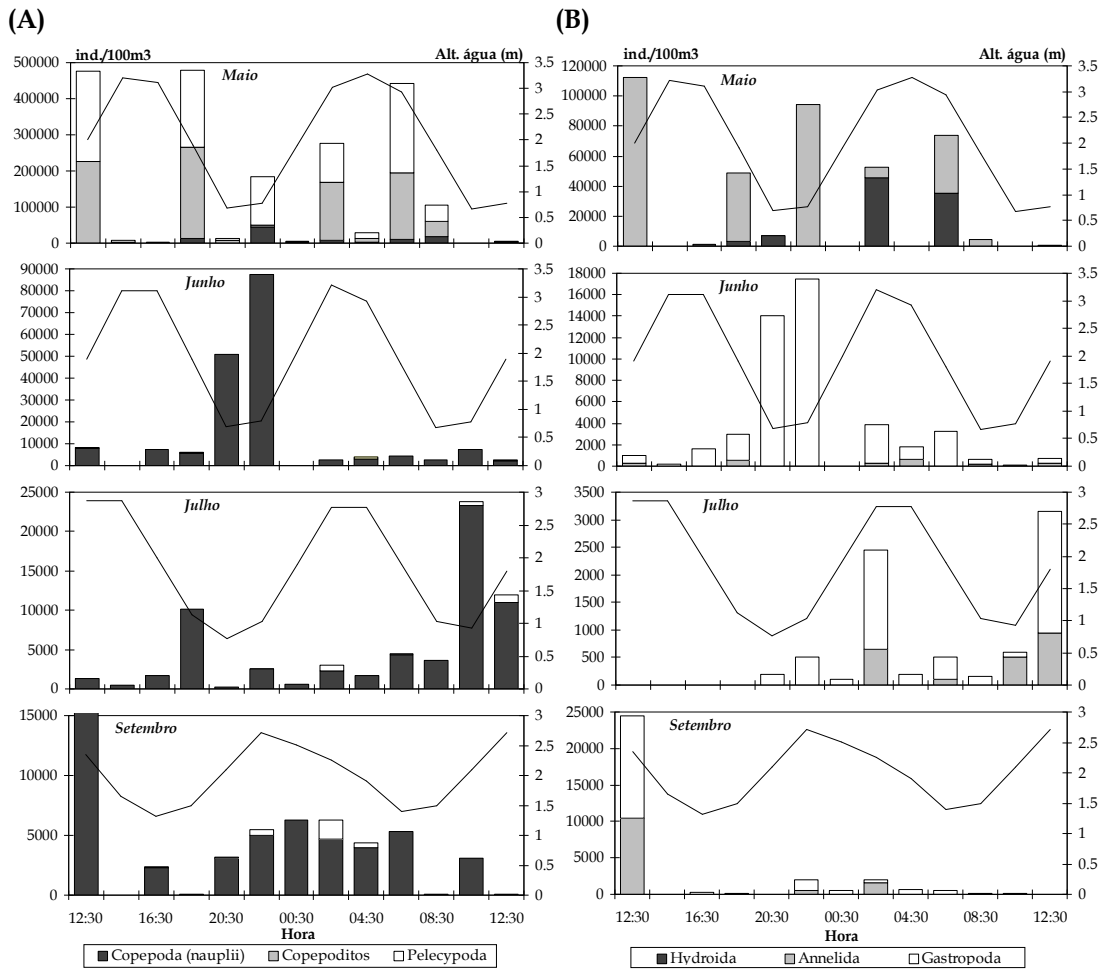


FIGURA 14 - Distribuição nictemeral dos (A) *nauplii* de copépodes, copepoditos, larvas de bivalves e (B) hidrozóários, anelídeos e larvas de gastrópodes no rio Mira. Em setembro os *nauplii* de copépodes atingiram um máximo de 404200 ind./100m³ às 12:30 que não se apresenta para facilitar a visualização dos restantes resultados.

Da fracção mesozooplancónica, os *nauplii* de decápodes (>45% da abundância total) ocorreram regularmente em todos os ciclos de maré, com as maiores abundâncias a verificarem-se em Setembro (máximo de cerca 60000 ind./100m³ às 10:30). Genericamente, a distribuição de abundâncias corresponde à altura de água, *i.e.* ao ciclo de maré. Quanto às fases *zoea/mysis* (16,2% do total) não se registaram ocorrências em Setembro e as abundâncias variaram entre 100 e 2200 ind./100m³, excepto em Junho quando se verificou um máximo de ~50000 ind./100m³ às 6:30. Os copépodes (19,7%) ocorreram regularmente em todos os ciclos com valores de densidade que variaram com a maré (máximo excepcional no ciclo de Junho às 6:30, ~30000 ind./100m³) (FIGURA 15). A distribuição das abundâncias de cladóceros (5,7%) parecem corresponder ao ciclo de maré, com maiores valores registados em

Maio (máximos de ~ 4000 ind./ 100m^3 às 4:30 e 14:30). As maiores densidades de misidáceos (2,6%) verificaram-se durante a noite (20:30 - 6:30) com os máximos de cerca de 5500 ind./ 100m^3 em Maio e ~ 3000 ind./ 100m^3 em Setembro. Os taliáceos (2,4%) não ocorreram em Junho, a distribuição das densidades variou nictemeralmente e as maiores densidades registaram-se em Julho (máximo de *ca.* 2000 ind./ 100m^3 às 12:30). Quanto aos isópodes (1,5%), distribuíram-se regularmente ao longo dos ciclos de 24 horas em todos os meses com máximo de *ca.* 1200 ind./ 100m^3 em Junho às 6:30). A distribuição das abundâncias de apendiculários (1,7% do total) pareceu corresponder ao ciclo de maré, com os maiores valores registados em Maio em situação de preia-mar (FIGURA 15).

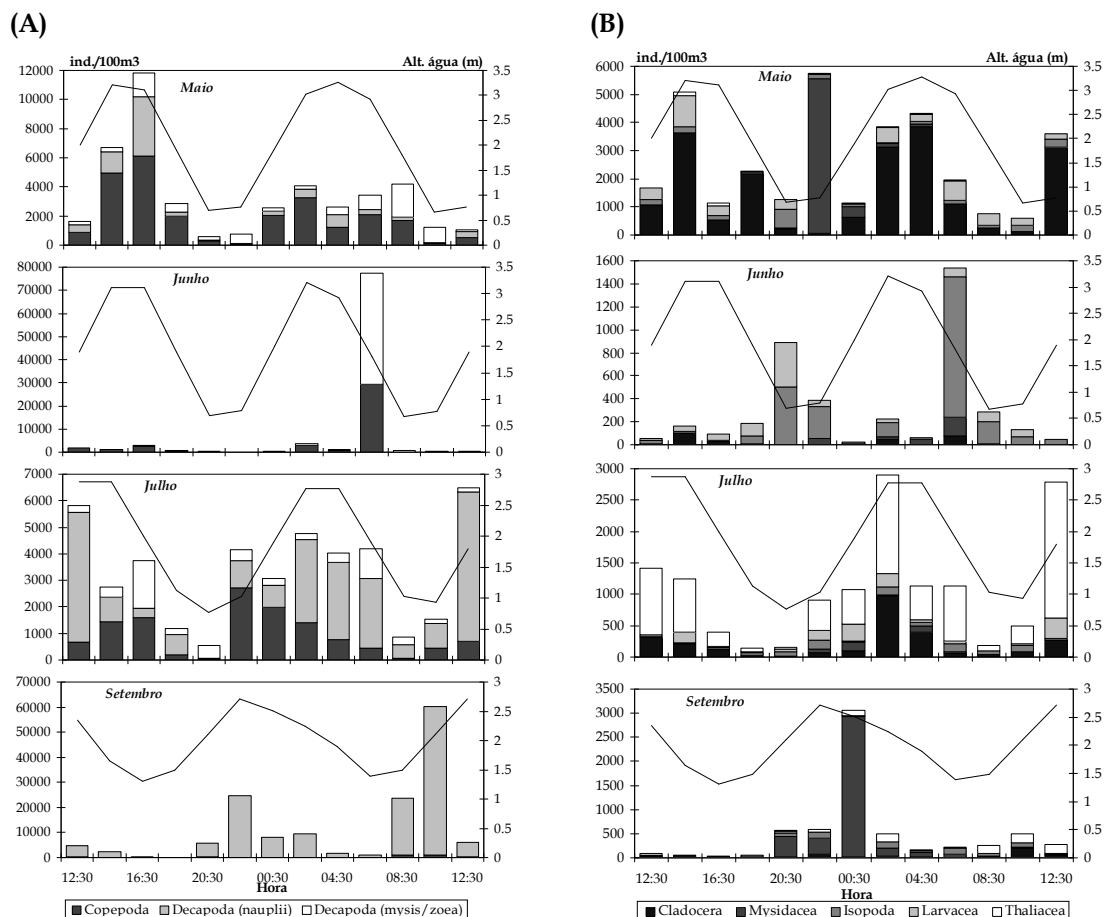


FIGURA 15 - Distribuição nictemeral dos (A) copépodes, decápodes (*nauplii*, *zoea* e *mysis*) e (B) cladóceros, misidáceos, isópodes, apendiculários e taliáceos no rio Mira.

Recolheram-se ovos de peixe em todos os ciclos de 24 horas realizados no rio Mira. As densidades que parecem corresponder ao ciclo de maré, diminuem ao longo do tempo, com registo de valores superiores a 1500 ind./ 100m^3 em Maio e <120 ind./ 100m^3 em Setembro. Os ovos de clupeídeos ($<0,6\%$ do total) e engraulídeo

(<0,2%) apenas ocorreram nos ciclos realizados em Maio e Junho, com densidades que variaram entre ~2 (em Junho às 0:30) e ~1000 ind./100m³ (em Maio às 16:30) e entre ~2 (em Maio às 2:30) e ~360 ind./100m³ (às 10:30), respectivamente. As maiores abundâncias de ovos de clupeídeos ocorreram durante a preia-mar diurna enquanto os ovos de engraulídeo ocorreram de forma mais abundante durante a baixa-mar (FIGURA 16).

Capturaram-se larvas de clupeídeos nos ciclos realizados em Maio e Junho, com densidades inferiores a 100 ind./100m³. Em Maio, ocorreram de forma regular e correspondendo ao ciclo de maré (com valores mais elevados durante a enchente/preia-mar diurna), registando-se um máximo de >80 ind./100m³ às 14:30. Os gobiídeos ocorreram irregularmente em todos os ciclos de 24 horas realizados de forma independente da maré, sendo que as maiores densidades se registaram em Junho (<300 ind./100m³ às 6:30). Quanto aos blenídeos, apenas ocorreram entre Maio e Julho com distribuições circadianas relativamente independentes da maré, registando-se as maiores densidades também em Junho (>300 ind./100m³ às 6:30). Apenas ocorreram larvas de atherinídeos nas recolhas efectuadas em Maio (2 - 5 ind./100m³ às 4:30, 12:30 e 0:30) (FIGURA 16).

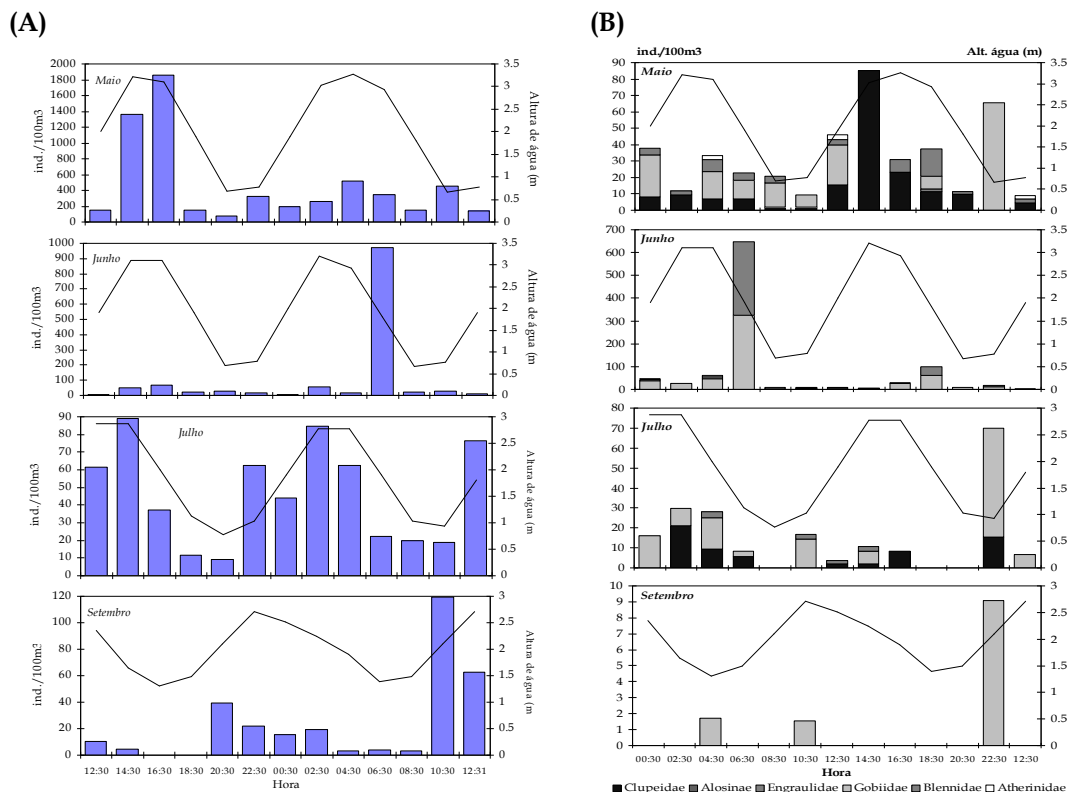


FIGURA 16 - Distribuição nictemeral dos ovos (A) e das larvas de peixe (B) no rio Mira.

4.1.2.2. Rio Guadiana

No rio Guadiana, os *nauplii* de copépodos dominaram as amostras de microzooplâncton, correspondendo a cerca de 69% da abundância total, e distribuíram-se irregularmente nos vários ciclos de 24 horas realizados. A densidade foi maior no ciclo de Maio (máximos de cerca 110000 - 126000 ind./100m³, às 1:00, 19:00 e 21:00), e decresceu ao longo do período de amostragem. Os ciliados (~22% da abundância total) ocorreram irregularmente nos vários ciclos de 24 horas, com maiores abundâncias no ciclo realizado em Maio. As distribuições das larvas de anelídeos (~7,5%), gastrópodes (>11,5% do total) e de bivalves (~7,5%) foram semelhante à dos ciliados (FIGURA 17).

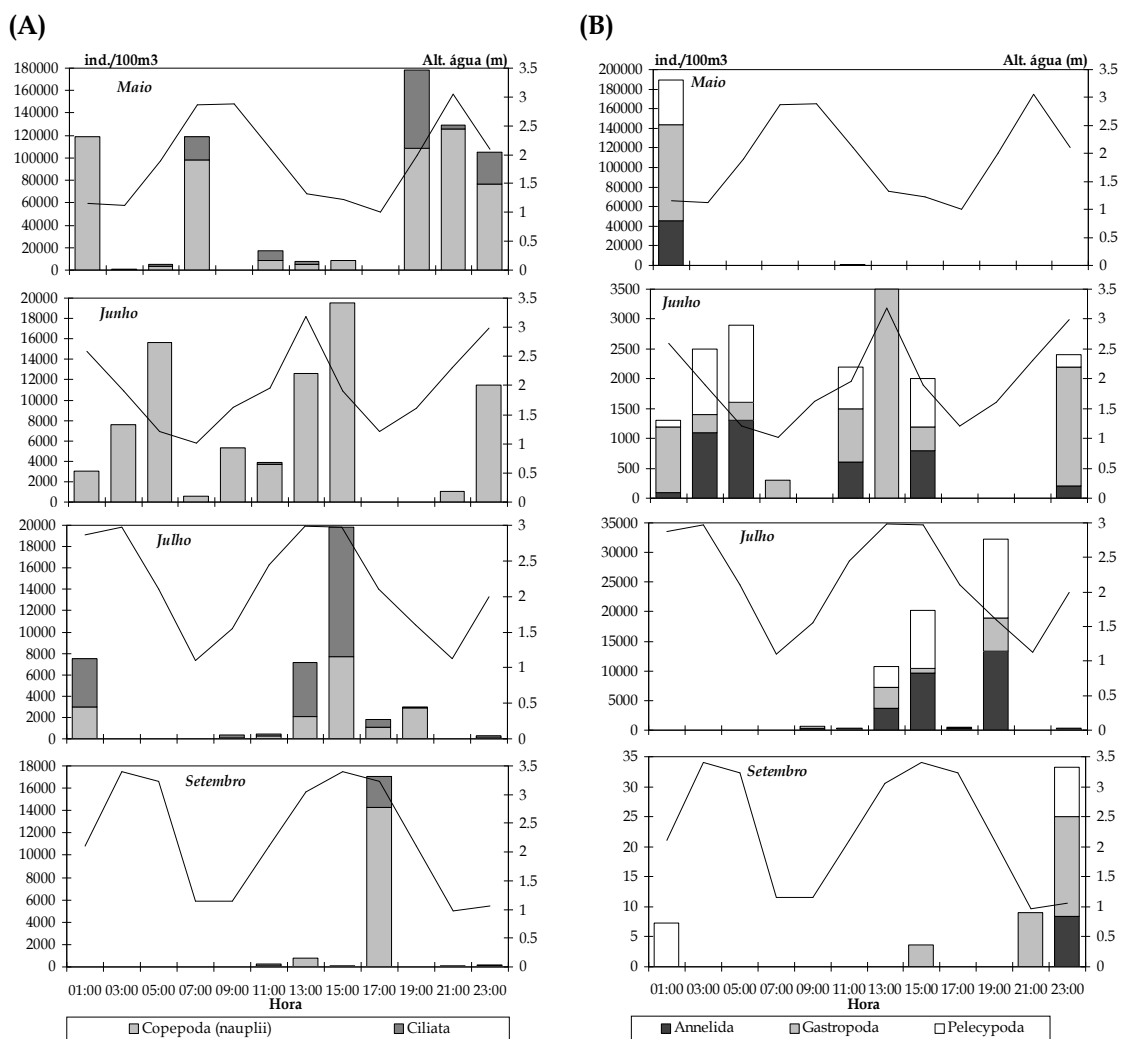


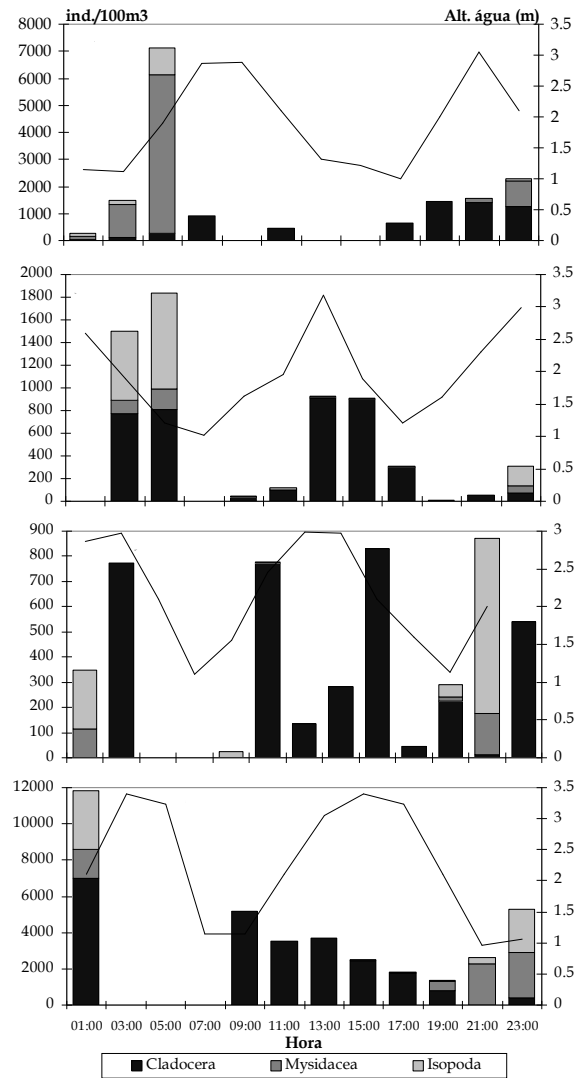
FIGURA 17 - Distribuição nictemeral dos *nauplii* de copépodos, dos ciliados (A) e das larvas de anelídeos, de gastrópodes e de bivalves (B) no rio Guadiana.

Os cladóceros constituíram o *taxon* mais representado na fracção mesozooplanctónica das amostras obtidas durante os ciclos de 24 horas, cerca de 22% da abundância total. A sua densidade pareceu corresponder, embora ligeiramente, ao ciclo de maré. A distribuição da abundância de *zoea/mysis* de decápodes (~14,6%) foi similar à descrita anteriormente para cladóceros, enquanto os *nauplii* (~4%) apenas foram capturados (de forma irregular) em Maio e Junho. Estes últimos ocorreram em número apreciável em situação de vazante. Os misidáceos (7,8%) e isópodes (~4,9%) ocorreram em todos os ciclos de 24 horas, especialmente durante a noite (21:00 - 5:00). Os copépodes (3,8% do total) ocorreram irregularmente nos ciclos realizados em Junho e Setembro. Quanto aos quetognatos (~1%), a sua abundância foi maior no ciclo realizado em Setembro, com os valores de densidade a variarem entre ~200 e 2300~ ind./100m³ (23:00 e 19:00, respectivamente) e associados aos ciclos de maré. Os hidrozoários (corresponderam a ~2% da abundância total) ocorreram em maiores densidades durante a preia-mar da tarde e noite (FIGURA 18).

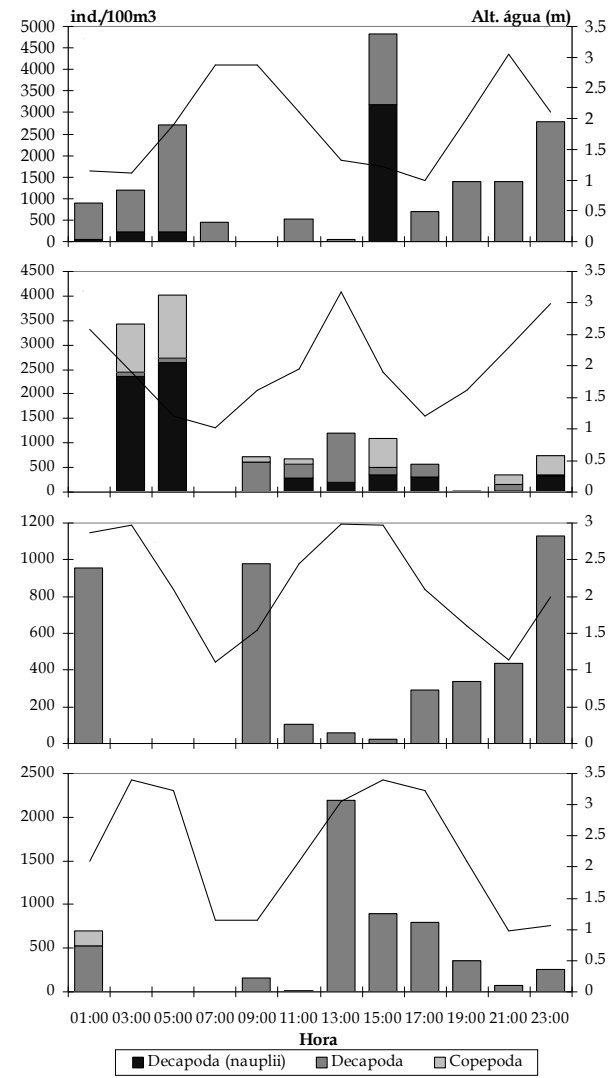
Em Maio, registaram-se densidades superiores a 6000 ovos/100m³ (máximo de ~13000 ovos/100m³ às 21:00), enquanto em Junho, as densidades dos ovos variaram entre ~100 ovos/100m³ e ~3500 ovos/100m³. Neste último mês, a densidade dos ovos correspondeu ao ciclo de maré. Apenas se capturaram ovos de clupeídeos (0,6% da abundância total) e de engraulídeo (~5,8% do total) em Maio/Junho e Maio/Junho/Setembro, respectivamente, sendo que as maiores abundâncias se registaram em Maio durante a enchente/preia-mar da tarde (máximos de às 21:00 de ~660 e 4272 ind./100m³, respectivamente) (FIGURA 19).

As larvas de Clupeidae ocorreram irregularmente em todos os ciclos de amostragem com densidades inferiores a 50 ind./100m³, enquanto apenas em Junho (às 1:00 e 3:00) e em Setembro (às 19:00) foram amostradas larvas de *Engraulis* sp., sempre em densidades <20 ind./100m³. Pelo contrário, os gobídeos abundaram durante os periodos de preia-mar e os blenídeos ocorreram durante a enchente em Maio e durante a vazante nos restantes meses. As maiores abundâncias desses *taxa* registaram-se em Junho (80 - 120 ind./100m³ às 15:00 e 23:00) e em Maio (310 ind./100m³ às 19:00), respectivamente. Quanto aos aterinídeos, apenas ocorreram nos ciclos realizados em Maio e em Junho, em número inferior a 5 ind./100m³ (FIGURA 19).

(A)



(B)



(C)

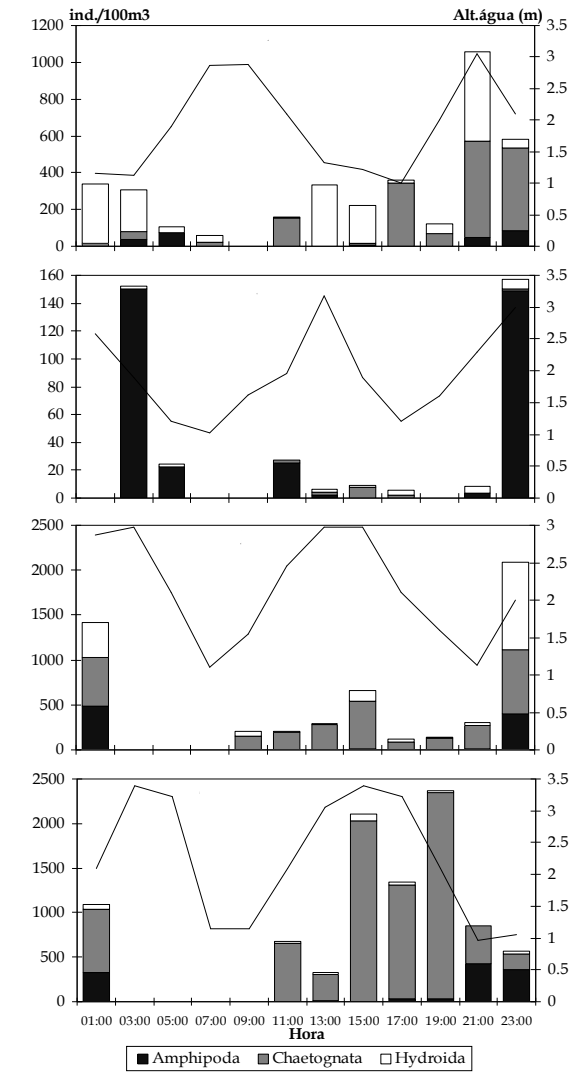


FIGURA 18 - Distribuição nictemeral dos cládceros, dos misidáceos, dos isópodes (A), de decápodes, de copépodes (B) e de anfípodas, quetognatos e hidromedusas no rio Guadiana.

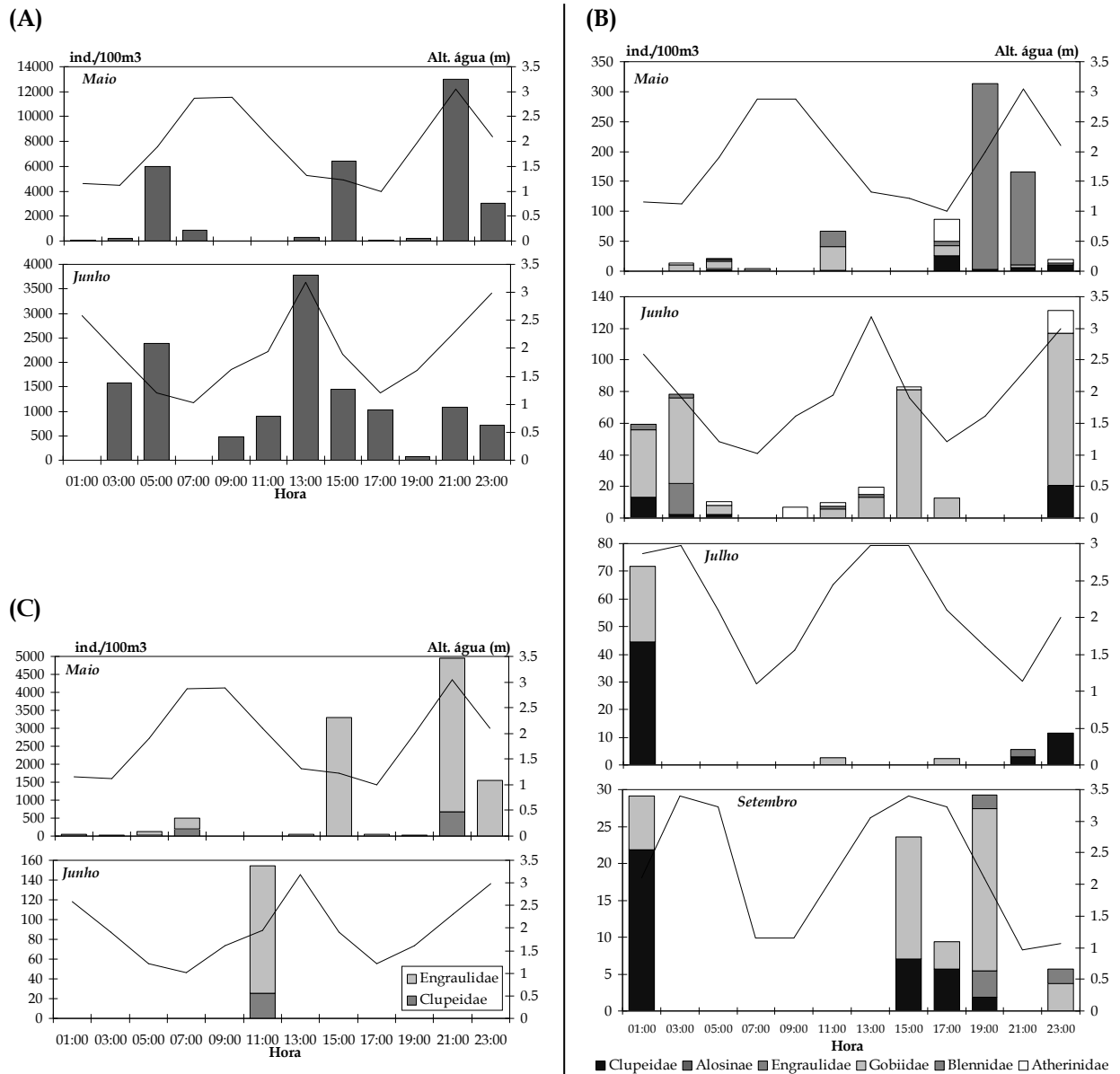


FIGURA 19 - Variação circadiana da densidade de ovos de peixe (A), e designadamente dos ovos de clupeídeos e engraulídeos (C), no rio Guadiana. Distribuição nictemeral das larvas de peixe no rio Guadiana (B). Não se apresentam os dados relativos aos ciclos de Julho e Setembro em virtude da ocorrência esporádica de larvas

4.2. Associações entre ictioplanctontes e restantes parâmetros abióticos e bióticos.

4.2.1. Parâmetros hidrológicos

Na TABELA 5 apresentam-se os resultados relativos à análise espacial e nictemeral das relações entre a distribuição dos ictioplanctontes e de alguns parâmetros hidrológicos. Considerando o nível de significância corrigido (α'), no rio Mira apenas a distribuição espacial dos ovos de peixe se correlacionou

significativamente com alguns parâmetros hidrológicos, designadamente a temperatura e salinidade. Especificamente, a distribuição espacial dos ovos de engraulídeo ocorreu associada à salinidade e temperatura, enquanto as larvas de gobídeos se correlacionaram negativamente com a temperatura. No rio Guadiana, as distribuições da salinidade e turbidez estiveram relacionadas com a abundância dos ovos de peixe, e particularmente com ovos de engraulídeo.

No rio Mira, a distribuição nictemeral dos ictioplanctontes correlacionou-se negativamente com a altura de água e temperatura, excepto em blenídeos. Pelo contrário, no rio Guadiana apenas se obtiveram correlações significativas (e negativas) entre ovos de peixe e larvas de aterinídeos e a temperatura, e entre abundância de larvas de gobídeos e a salinidade.

TABELA 5 - Coeficientes de correlação de Spearman significativos obtidos para a análise das relações entre os ovos e larvas de peixes e alguns parâmetros hidrológicos. O - ovos, T - temperatura, S - salinidade, Secchii - turbidez, ALT - altura de água; * $p < 0,005$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,001$.

<i>Estratégia</i>	<i>Bacia</i>	<i>Ictioplâncton</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>R</i>
Espacial	Mira	O. peixe	T	-0,61**
		O. peixe	S	0,64**
		O. Engraulidae	T	-0,51*
		O. Engraulidae	S	0,49***
		Gobiidae	T	-0,57***
	Guadiana	O. peixe	S	0,64**
		O. peixe	Secchii	0,55**
		O. Engraulidae	S	0,51**
		O. Engraulidae	Secchii	0,53**
		Nictemeral	Mira	O. peixe
O. Clupeidae	T			-0,67***
O. Engraulidae	ALT			-0,39*
Clupeidae	T			-0,55***
Blennidae	T			0,54***
Guadiana	O. peixe		T	-0,62***
	Gobiidae		S	0,51***
	Atherinidae		T	-0,44*

4.2.2. Potenciais presas

As relações entre a distribuição espacial e variação nictemeral da abundância de ovos e larvas de peixe e a abundância dos grupos microzooplânctónicos que podem constituir presas potenciais, apresentam-se na TABELA 6.

Se, por um lado, no rio Mira não se obtiveram correlações significativas ($p>0,007$) entre as distribuições espaciais de ictioplanctontes e potenciais presas, por outro, no rio Guadiana os ovos e larvas dos peixes ocorreram associados a larvas de anelídeos, platelmintas, *nauplii* de copépodes, copépodes e larvas de bivalve. No rio Mira, as variações nictemerais da abundância dos hidrozoários, *nauplii* de cirrípedes, copepoditos e as larvas de gastrópodes e bivalves, correlacionaram-se significativamente com os ictioplanctontes estudados. Pelo contrário, no rio Guadiana a densidade dos *nauplii* de copépodes correlacionou-se significativamente com os ovos de peixe e os hidrozoários com larvas de engraulídeo ($p<0,005$).

TABELA 6 - Coeficientes de correlação de Spearman (R) significativos obtidos para a análise das relações entre os ovos e larvas de peixes e potenciais presas. O - ovos, $\alpha'=0,007$ (rio Mira) e $0,008$ (rio Guadiana).

<i>Estratégia</i>	<i>Bacia</i>	<i>Ictioplâncton</i>	<i>Taxon</i>	R
Espacial	Mira	---	---	---
		Guadiana	O peixe	<i>nauplii</i> Copepoda
	O. peixe		<i>copepoditos</i>	0,47***
	Clupeidae		Annelida	0,39***
	Clupeidae		<i>copepoditos</i>	0,39***
	Clupeidae		Pelecypoda	0,39***
	Nictemeral	Mira	Atherinidae	Platyhelminthes
O. peixe			Hydroida	0,45***
O. peixe			<i>copepoditos</i> .	0,46***
O. peixe			Pelecypoda	0,45***
O. Clupeidae			Hydroida	0,63***
O. Clupeidae			Cirripedia	0,49***
O. Clupeidae			<i>copepoditos</i>	0,78***
O. Clupeidae			Gastropoda	-0,57***
O. Clupeidae			Pelecypoda	0,58***
O. Engraulidae			<i>copepoditos</i>	0,48***
Clupeidae			Hydroida	0,53***
Clupeidae			Cirripedia	0,47***
Clupeidae			<i>copepoditos</i>	0,55***
Clupeidae		Gastropoda	-0,46***	
Clupeidae		Pelecypoda	0,44***	
Engraulidae		Cirripedia	0,43**	
Blennidae		<i>nauplii</i> Copepoda	0,54***	
Guadiana		O. peixe	<i>nauplii</i> Copepoda	0,53***
		O. Clupeidae	<i>nauplii</i> Copepoda	0,49**
		O. Engraulidae	<i>nauplii</i> Copepoda	0,43*
	Engraulidae	Hydroida	0,68***	

4.2.3. *Potenciais predadores/competidores*

Nas TABELAS 7 e 8 resumem-se os dados relativos à análise de correlação (de Spearman) entre a abundância dos ovos e larvas de peixe, e os grupos de potenciais predadores e competidores que representaram mais de 1% da abundância total de mesozooplâncton nas amostras obtidas mensalmente.

No rio Mira, a distribuição espacial dos ovos de peixe relacionou-se significativamente com a distribuição de briozoários, quetognatos, cladóceros, copépodes, decápodes (*zoea/mysis*), apendiculários e taliáceos. Os ovos de engraulídeo ocorreram associados à distribuição dos apendiculários e a distribuição de larvas de peixe correlacionou-se com quetognatos, apendiculários e taliáceos. No rio Guadiana, os ovos de peixe ocorreram associados com quetognatos, misidáceos, isópodes, decápodes, apendiculários e larvas de singnatídeos e calionimídeos, enquanto as larvas de peixe se correlacionaram com os hidrozoários, sifonóforos, quetognatos, misidáceos, cumáceos, ostrácodes, apendiculários, taliáceos, ascidiáceos e larvas de esparídeos, gobídeos e blenídeos. As larvas de clupeídeos ocorreram associadas as larvas de esparídeos e de calionimídeos, enquanto as larvas de engraulídeo se correlacionaram com os calionimídeos. Por outro lado, as distribuições das larvas de gobídeos, blenídeos e aterinídeos estiveram associadas à densidade de apendiculários, de quetognatos e de taliáceos no rio Mira, ou à abundância de cumáceos, de misidáceos, de ostrácodes, de ascidiáceos e de taliáceos no rio Guadiana.

Considerando a variação nictemeral da abundância de zooplantontes no rio Mira, os ovos de peixe correlacionaram-se com a densidade de cladóceros, de copépodes, de decápodes (*zoea/mysis*), de gastrópodes, de apendiculários e de larvas de labrídeos e de mugilídeos. Quanto aos estados larvares, aqueles ocorreram associados à densidade de cladóceros, de copépodes, de isópodes, de decápodes (*zoea/mysis*), de anfípodes e de apendiculários. Pelo contrário, no rio Guadiana os ovos de peixe ocorreram associados à densidade de decápodes e de larvas de singnatídeos e de esparídeos. As larvas de clupeídeos correlacionaram-se com a abundância de cumáceos, de misidáceos, de anfípodes e de gobídeos, enquanto as larvas de engraulídeo ocorreram associadas à distribuição dos insectos, dos ostrácodes e dos ascidiáceos. Apenas se obtiveram correlações significativas entre a distribuição de larvas de aterinídeos e a abundância de briozoários e de poliquetas.

TABELA 7 - Coeficientes de correlação de Spearman (*R*) significativos obtidos para a análise das relações entre os ovos e larvas de peixes e potenciais predadores/competidores (variação espacial). O - ovos, $\alpha=0,004$ (rio Mira) e 0,006 (rio Guadiana).

<i>Estratégia</i>	<i>Bacia</i>	<i>Ictioplâncton</i>	<i>Taxon</i>	<i>R</i>
Espacial	Mira	O. peixe	Bryozoa	0,48**
		O. peixe	Chaetognata	0,52***
		O. peixe	Cladocera	0,54***
		O. peixe	Copepoda	0,61***
		O. peixe	<i>zoea/mysis</i> Decapoda	0,45*
		O. peixe	Larvacea	0,75***
		O. Engraulidae	Larvacea	0,69***
		Gobiidae	Larvacea	0,53***
		Blennidae	Chaetognata	0,50***
		Blennidae	Thaliacea	0,47*
	Atherinidae	Thaliacea	0,47***	
	Guadiana	O. peixe	Chaetognata	0,57***
		O. peixe	Insecta	-0,37**
		O. peixe	Mysidacea	0,52***
		O. peixe	<i>zoea/mysis</i> Decapoda	0,34*
		O. peixe	Sparidae	0,39***
		O. peixe	Calionymidae	0,33*
		O. Clupeidae	Mysidacea	0,41***
		O. Clupeidae	Isopoda	0,37***
		O. Clupeidae	<i>nauplii</i> Decapoda	0,43***
		O. Clupeidae	Larvacea	0,55***
		O. Engraulidae	Mysidacea	0,45***
		Clupeidae	Hydroida	0,40***
		Clupeidae	Chaetognata	0,49***
		Clupeidae	Mysidacea	0,51***
		Clupeidae	Larvacea	0,54***
		Clupeidae	Sparidae	0,40***
		Clupeidae	Clyonimidae	0,55***
		Engraulidae	Cumacea	0,41***
		Engraulidae	Larvacea	0,49***
		Engraulidae	Siphonophora	0,33*
		Engraulidae	Calyonimidae	0,50***
		Gobiidae	Cumacea	0,37**
Gobiidae		Mysidacea	0,43***	
Blennidae	Ostracoda	0,35*		
Atherinidae	Ascidiacea	0,57***		
Atherinidae	Thaliacea	0,55***		

TABELA 8 - Coeficientes de correlação de Spearman significativos obtidos para a análise das relações entre os ovos e larvas de peixes e potenciais predadores/competidores (variação nictemeral). O - ovos, $\alpha=0,004$ (rio Mira) e $0,006$ (rio Guadiana).

<i>Estratégia</i>	<i>Bacia</i>	<i>Ictioplâncton</i>	<i>Taxon</i>	<i>R</i>		
Nictemeral	Mira	O. peixe	Cladocera	0,80***		
		O. peixe	Copepoda	0,49***		
		O. peixe	<i>zoea/mysis</i> Decapoda	0,59***		
		O. peixe	Larvacea	0,72***		
		O. peixe	Labridae	0,41*		
		O. peixe.	Mugilidae	0,53***		
		O. Clupeidae	Cladoceraa	0,62***		
		O. Clupeidae	Copepoda	0,49***		
		O. Clupeidae	Gastropoda	-0,57***		
		O. Clupeidae	Mugilidae	0,53***		
		Clupeidae	Cladocera	0,73***		
		Clupeidae	Copepoda	0,53***		
		Clupeidae	Isopoda	0,38*		
		Clupeidae	<i>zoea/mysis</i> Decapoda	0,59***		
		Clupeidae	Larvacea	0,59***		
		Gobiidae	Amphipoda	0,49***		
		Guadiana	Guadiana	O. peixe	<i>nauplii</i> Decapoda	0,62***
				O. peixe	Syngnathidae	0,44*
				O. Engraulidae	<i>zoea/mysis</i> Decapoda	0,52***
				O. Engraulidae	Sparidae	0,51***
Clupeidae	Cumacea			0,47**		
Clupeidae	Mysidacea			0,42*		
Clupeidae	Amphipoda			0,47**		
Clupeidae	Gobiidae			0,54***		
Engraulidae	Ostracoda			0,72***		
Engraulidae	Insecta			0,45**		
Engraulidae	Ascidiacea	0,72***				
Atherinidae	Bryozoa	0,42*				
Atherinidae	Polychaeta	0,58***				

4.2.4. Análise de regressão

Após a análise de correlação, e considerando as associações significativas, testaram-se alguns modelos de regressão linear simples/múltipla do tipo Log(abundância) *vs.* factores significativos que se apresentam na TABELA 9. No rio Mira, e tendo em conta os valores resultantes da análise espacial, a temperatura, a salinidade, e a abundância de quetognatos, de *zoea/mysis* de decápodes, de apendiculários e de taliáceos explicaram entre 50,3 - 88,0% da variância da abundância de ictioplanctontes. No rio Guadiana, a inclusão da salinidade e da

abundância de quetognatos, de misidáceos, de ascidiáceos e de taliáceos nos modelos testados permitiu explicar 31,5 - 58,6% da variância da abundância dos estados larvares de peixes.

TABELA 9 - Modelos de regressão obtidos para relações do tipo Log(abundância ictioplantontes) vs. Parâmetros abióticos/bióticos. ALT - altura de água, T - temperatura, S - salinidade, O - ovos de peixe, L - larvas de peixe, OE - ovos de *Engraulis* sp., OC - ovos de clupeídeos, CLU - larvas de clupeídeos, GOBI - larvas de gobídeos, BLENI - larvas de blenídeos, ATHER - larvas de atherídeos, Q - quetognatos, CL - cladóceros (<500 µm), CL2 - cladóceros (>500 µm), CO - copepoditos, C - copépodes, I - isópodes, M - misidáceos, D - zoea/mysis de decápodes, A - apendiculários, G - gastrópodes (<500 µm), DD - nauplii de decápodes, TA - taliáceos, ASC - ascidiáceos; F significativo para $\alpha=0,001$ ***, $\alpha=0,01$ ** e $\alpha=0,05$ *.

Bacia	Modelo	n	R ²	F
Espacial				
Mira	Log(O) = 3,64 - 0,14*T + 0,865*Log(A)	32	0,654	27,42***
	Log(O) = 0,049 + 1,227*Log(A) + 1,941*Log(Q)	32	0,841	97,53***
	Log(O) = 0,342 - 0,011*T + 1,176*Log(A) + 2,124*Log(Q)	32	0,880	68,59***
	Log(OE) = 0,016 + 0,007*S + 0,942*Log(A)	40	0,503	18,73***
	Log(GOBI) = 0,884 - 0,037*T + 0,377*Log(A)	32	0,631	24,77***
	Log(BLENI) = -0,022 + 0,495*Log(Q) - 0,104*(TA)	40	0,542	21,91**
Guadiana	Log(O) = -0,061 + 0,049*S - 0,325*Log(Q)	65	0,586	43,79***
	Log(O) = -0,061 + 0,037*S + 0,321*Log(M)	65	0,584	43,60***
	Log(L) = 0,273 + 0,342*Log(Q) + 0,349*Log(M)	74	0,374	21,17***
	Log(CLU) = 0,024 + 0,22*Log(Q)	74	0,315	33,05***
	Log(ATHER) = 0,011 + 0,983*Log(ASC) + 0,981*Log(TA)	74	0,541	41,83***
Nictemeral				
Mira	Log(O) = 6,88 - 0,269*T - 0,131*Log(G)	52	0,479	22,56***
	Log(O) = 4,28 - 0,178*T + 0,370*Log(CL)	52	0,581	34,00***
	Log(O) = 5,18 - 0,215*T + 0,234*Log(D)	52	0,532	27,85***
	Log(O) = 4,35 - 0,179*T + 0,401*Log(A)	52	0,577	33,43***
	Log(O) = 0,383 + 0,361*Log(CL2) + 0,390*Log(A)	52	0,659	47,37***
	Log(OC) = -0,399 + 0,265*ALT + 0,356*Log(C)	52	0,652	45,89***
	Log(OE) = 0,514 - 0,358*ALT + 0,341*Log(A)	52	0,408	16,86***
	Log(OE) = 0,909 - 0,384*ALT + 0,154*Log(C)	52	0,388	15,51***
	Log(CLU) = -0,704 + 0,227*Log(I) + 0,368*Log(CL)	52	0,559	31,06***
	Log(CLU) = 0,354 - 0,052*T + 0,222*Log(I) + 0,324*Log(CL)	52	0,575	21,64***
	Log(CLU) = 0,493 + 0,199*Log(A) + 0,305*Log(CL2)	52	0,588	35,02***
Guadiana	Log(O) = 0,516 - 0,207*T + 0,469*Log(DD)	39	0,474	16,21***

A variação nictemeral da abundância dos ovos e larvas de peixe no rio Mira relacionou-se significativamente com a maré (altura de água), temperatura e da abundância de gastrópodes, de cladóceros, de *zoea/mysis* de decápodes, de copepoditos, de copépodes e de apendiculários. Os modelos testados explicaram 38,8 - 65,9% da variância da abundância de ictioplanctontes. Pelo contrário, no rio Guadiana apenas a temperatura e a abundância de *nauplii* de decápodes explicaram cerca de 47,4% da variância de Log(abundância de ovos) (TABELA 9).

4.3. Limite de detecção fluorimétrica, percentagem de recuperação de ácidos nucleicos e variabilidade das determinações

O limite de detecção das técnicas utilizadas para quantificar os ácidos nucleicos variou entre 0,16 µgDNA/ml e 0,46 µgRNA/ml. A percentagem de recuperação dos ácidos nucleicos foi substancialmente superior na técnica de Caldarone & Buckley (1991), 95,3% para o DNA e 105,6% para o RNA *versus* 88,8% para o DNA e 62,8% para o RNA. O coeficiente de variação das determinações variou entre 14,8% para o DNA e 17,8% para o RNA [técnica de Clemmesen (1988, 1993) adaptada por Chícharo (1996) - CC], e entre 1,5% para o DNA e 3,5% para o RNA [técnica de Caldarone & Buckley (1991) - CB]. O coeficiente de variação modificado, CV' , calculado para a análise das proteínas variou entre 0,1 e 6,1%, com média ~1%.

4.4. Comparação de métodos para quantificar os ácidos nucleicos.

Os comprimentos-padrão (CP) das larvas utilizadas para a comparação de metodologias de extracção e quantificação de ácidos nucleicos variou entre 9,0 - 36,1 mm (clupeídeos), 3,3 - 18,3 mm (gobídeos), 3,9 - 11,6 mm (blenídeos) e 4,3 - 14,3 mm (aterinídeos). A estatística associada às variáveis em estudo (concentração em ácidos nucleicos e razão RNA/DNA) encontra-se resumida na TABELA 10. Os valores obtidos para o conteúdo larvar em DNA são genericamente superiores quando obtidos pela técnica de Caldarone & Buckley (1991). Pelo contrário, a concentração em RNA e as razões RNA/DNA são superiores quando obtidos a partir da metodologia de Clemmesen (1988, 1993) adaptada por Chícharo (1996).

TABELA 10 - Estatística das variáveis DNA, RNA e RNA/DNA, média \pm desvio-padrão ($x \pm s$) e intervalo, por Bacia e por Método.

	<i>Caldarone & Buckley (1991)</i>			<i>Clemmesen (1988, 1993)</i>	
	<i>n</i>	<i>x \pm s</i>	<i>intervalo</i>	<i>x \pm s</i>	<i>intervalo</i>
Clupeidae					
<i>Mira</i>					
$\mu\text{g DNA}$	13	22,29 \pm 37,49	1,91-112,87	13,94 \pm 18,20	3,11-57,44
$\mu\text{g RNA}$	13	44,06 \pm 67,95	6,75-212,04	78,73 \pm 143,05	4,83-459,71
RNA/DNA	13	2,83 \pm 1,98	0,80-6,83	4,46 \pm 2,68	0,53-8,95
<i>Guadiana</i>					
$\mu\text{g DNA}$	38	19,30 \pm 20,71	2,91-110,96	18,24 \pm 21,27	3,06-90,35
$\mu\text{g RNA}$	38	60,16 \pm 70,65	7,79-342,49	138,30 \pm 153,95	13,15-772,59
RNA/DNA	38	3,56 \pm 2,12	0,16-12,39	8,95 \pm 6,31	2,8-38,70
Blennidae					
<i>Mira</i>					
$\mu\text{g DNA}$	21	8,45 \pm 5,57	0,33-24,14	7,60 \pm 3,59	3,43-20,36
$\mu\text{g RNA}$	21	13,98 \pm 7,53	0,014-27,71	21,21 \pm 55,39	1,21-55,39
RNA/DNA	21	4,48 \pm 12,42	0,00-58,55	2,91 \pm 1,69	0,33-5,65
<i>Guadiana</i>					
$\mu\text{g DNA}$	63	9,16 \pm 4,04	2,72-28,98	9,16 \pm 4,08	3,12-22,05
$\mu\text{g RNA}$	63	19,52 \pm 9,79	3,59-56,39	26,53 \pm 16,87	6,62-102,54
RNA/DNA	63	2,26 \pm 1,02	0,55-6,56	3,42 \pm 2,43	0,63-13,08
Gobiidae					
<i>Mira</i>					
$\mu\text{g DNA}$	61	16,69 \pm 18,54	3,13-76,39	16,08 \pm 20,69	3,08-114,40
$\mu\text{g RNA}$	61	38,99 \pm 18,54	1,23-315,46	72,37 \pm 127,81	2,12-619,69
RNA/DNA	61	2,22 \pm 1,07	0,19-4,42	3,34 \pm 2,01	0,23-9,01
<i>Guadiana</i>					
$\mu\text{g DNA}$	80	11,36 \pm 9,29	0,17-64,91	12,09 \pm 10,50	3,09-66,87
$\mu\text{g RNA}$	80	31,82 \pm 24,01	2,22-138,12	69,87 \pm 69,52	3,23-320,94
RNA/DNA	80	6,59 \pm 14,79	0,14-114,32	6,75 \pm 6,11	0,25-34,65
Atherinidae					
<i>Mira</i>					
$\mu\text{g DNA}$	32	31,68 \pm 37,17	4,02-132,80	20,89 \pm 19,24	3,09-79,96
$\mu\text{g RNA}$	32	78,31 \pm 100,95	3,69-356,67	90,36 \pm 115,12	6,56-449,13
RNA/DNA	32	2,50 \pm 1,76	0,32-10,48	3,84 \pm 1,71	0,54-8,89
<i>Guadiana</i>					
$\mu\text{g DNA}$	14	14,28 \pm 8,74	5,33-35,24	12,60 \pm 6,93	5,54-29,40
$\mu\text{g RNA}$	14	26,09 \pm 20,53	7,14-81,14	57,17 \pm 43,08	23,11-173,37
RNA/DNA	14	2,27 \pm 1,60	0,22-5,27	4,84 \pm 3,27	2,11-15,33

As variáveis logaritmizadas distribuíram-se normalmente (teste de Kolmogorov-Smirnov, $p>0,05$) e permitiram a utilização da estatística paramétrica nas análises que se seguem. Entre bacias não se obtiveram diferenças significativas para nenhuma das variáveis (ANOVA, $p>0,07$). Os valores de Log(RNA), Log(DNA) e Log(RNA/DNA) diferiram significativamente entre as várias famílias estudadas (ANOVA, $p<0,001$). Entre métodos, as diferenças foram significativas quando se compararam Log(RNA) e Log(RNA/DNA) (ANOVA, $p<0,001$) e não-significativas para Log(DNA) (ANOVA, $p>0,2$). Os efeitos da interação entre factores foram significativos apenas quando se comparou Log(RNA/DNA) (*Família x Método*) e Log(RNA) e Log(RNA/DNA) (*Bacia x Família*) (ANOVA, $p<0,005$ e $p<0,0001$, respectivamente) (TABELA 11).

TABELA 11 - ANOVA a três entradas de Log(RNA), Log(DNA) e Log(RNA/DNA) com CP como co-variável para larvas capturadas nos rios Mira e Guadiana (costa Oeste e Sudoeste portuguesa, respectivamente); $\alpha=0,05$.

<i>Factores</i>	<i>Var. depend.</i>	<i>g.l.</i>	<i>MS efeito</i>	<i>MS erro</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Bacia</i>		1, 573				
	Log(DNA)		0,215	0,067	3,010	0,074
	Log(RNA)		0,067	0,089	0,752	0,386
	Log(RNA/DNA)		0,042	0,090	0,467	0,494
<i>Família</i>		3, 581				
	Log(DNA)		4,011	0,068	58,697	0,000***
	Log(RNA)		2,336	0,093	25,065	0,000***
	Log(RNA/DNA)		0,768	0,099	7,750	0,000***
<i>Método</i>		1, 581				
	Log(DNA)		0,079	0,068	1,161	0,282
	Log(RNA)		4,492	0,093	48,196	0,000***
	Log(RNA/DNA)		5,765	0,099	58,191	0,000***
<i>Bacia x Família</i>		3, 573				
	Log(DNA)		0,089	0,067	1,324	0,266
	Log(RNA)		0,761	0,089	8,569	0,000***
	Log(RNA/DNA)		1,274	0,090	14,095	0,000***
<i>Bacia x Método</i>		1, 573				
	Log(DNA)		0,098	0,067	1,459	0,227
	Log(RNA)		0,066	0,089	0,737	0,391
	Log(RNA/DNA)		0,003	0,090	0,036	0,849
<i>Família x Método</i>		3, 581				
	Log(DNA)		0,095	0,068	1,388	0,245
	Log(RNA)		0,202	0,093	2,165	0,091
	Log(RNA/DNA)		0,433	0,099	4,374	0,005***

A correlação entre os métodos foi maior para Log(DNA) do que para Log(RNA) ou Log(RNA/DNA). Excepto no caso de Log(RNA/DNA) nos aterinídeos, ajustaram-se rectas de regressão estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) para todas as restantes relações (FIGURAS 20 e 21). Não se rejeitou a hipótese nula, $H_0: b=1$, *i.e.* declive igual a um (teste *t*-Student, $p > 0,05$) em nenhum dos modelos ajustados.

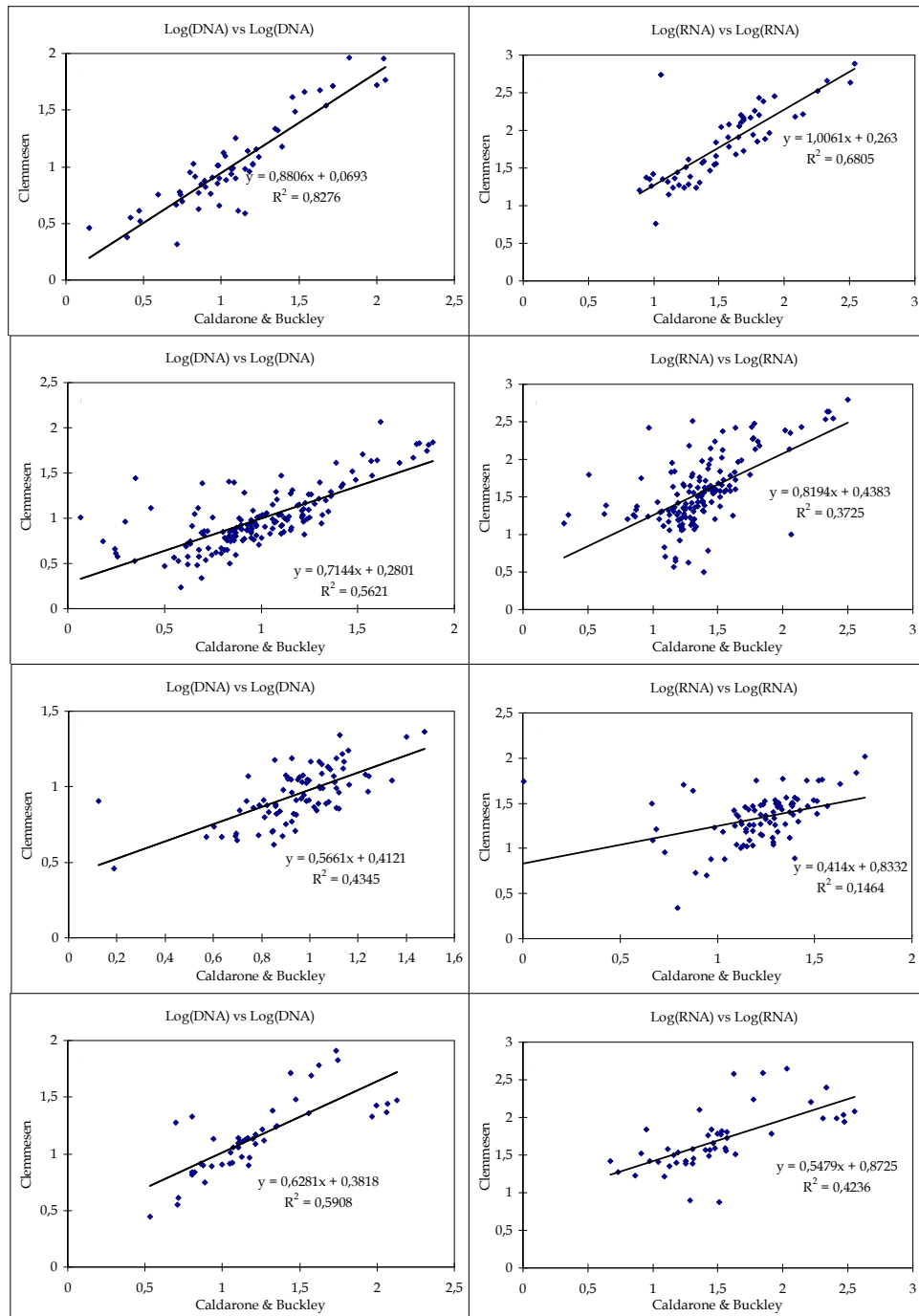


FIGURA 20 - Relação entre a concentração em ácidos nucleicos determinada a partir dos dois métodos estudados, Calderone & Buckley (1991) e Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chicharo (1996) e respectivas equações lineares ajustadas.

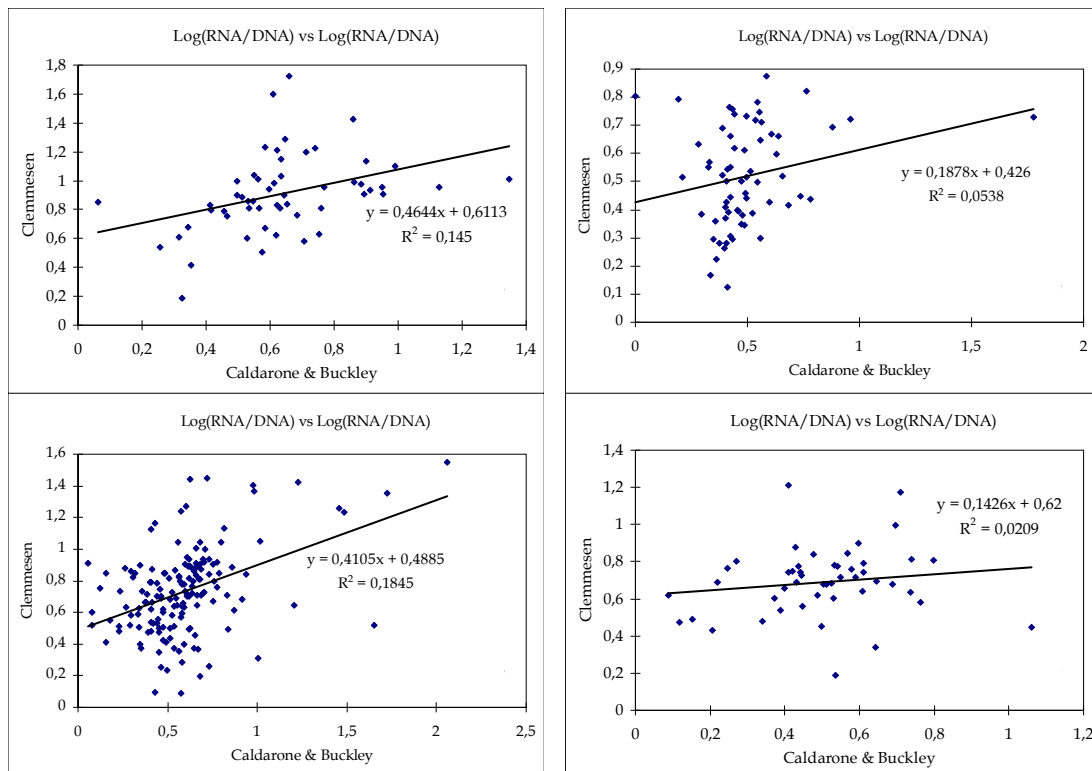


FIGURA 21 - Relação entre a razão RNA/DNA determinada a partir dos dois métodos estudados, Calderone & Buckley (1991) e Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chicharo (1996) e equações lineares ajustadas.

4.5. Condição nutricional

Os índices correlacionaram-se significativamente ($p < 0,005$) entre si (TABELA 12) com r variando entre $-0,219$ (RNA/DNA *vs.* PROT/DNA) e $0,981$ (RNA/DNA *vs.* Gpi). Apenas em quatro dos casos não se obtiveram correlações significativas.

A quantidade média de DNA e RNA, [RNA] e [DNA], extraído por larva de clupeiforme foi superior em *Engraulis* sp. e menor em *Alosa* spp. A amplitude de valores de [DNA] e [RNA] foi maior em *Sardina* sp. A razão RNA/DNA média variou entre $8,99 \pm 8,43$ em *Sardina* sp. (CC) e $2,47 \pm 0,79$ em *Alosa* spp. (CC). Os conteúdos em ácidos nucleicos variaram bastante entre famílias e entre rios. No que diz respeito à razão RNA/DNA, os valores são semelhantes nos dois rios em aterinídeos ($2,5 \pm 1,76$ e $2,3 \pm 1,60$, respectivamente nos rios Mira e Guadiana). Pelo contrário, os blenídeos recolhidos no rio Mira possuem valores médios de RNA/DNA mais elevados ($4,5 \pm 12,42$ *vs.* $2,3 \pm 1,02$), enquanto para os gobídeos provenientes do rio Guadiana se obtiveram valores médios mais elevados ($6,6 \pm 14,79$ *vs.* $2,2 \pm 1,07$) (TABELA 13).

TABELA 12 - Análise de correlação (coeficiente de correlação de Spearman, *R*) entre os índices de condição calculados. $283 < n < 350$; ** - $p < 0,0005$, *** - $p < 0,0001$; [AN] obtidas a partir do método de Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chicharo (1996) (a) ou de Caldarone & Buckley (1991) (b).

		(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	<i>Gpi</i>
(1)	RNA/DNA (b)	0,379***	-0,219***	0,325**	0,041	0,243**	0,391**
(2)	RNA/DNA (a)		-0,186	-0,030	-0,442***	0,124	0,981***
(3)	PROT/DNA (b)			0,789**	0,799***	0,785***	-0,246***
(4)	PROT/RNA (b)				0,824***	0,926***	-0,064
(5)	PROT/DNA (a)					0,783***	-0,469***
(6)	PROT/RNA (a)						0,071

TABELA 13 - Estatística das variáveis DNA, RNA e RNA/DNA, média \pm desvio-padrão ($x \pm s$) e intervalo, para as famílias estudadas.

		<i>Caldarone & Buckley (1991)</i>		<i>Clemmesen (1988, 1993)</i>	
	<i>n</i>	$x \pm s$	intervalo	$x \pm s$	intervalo
<i>Sardina sp.</i>					
	57	18,35 \pm 24,75	0,40 - 112,87	15,55 \pm 19,87	1,09 - 90,35
	57	52,29 \pm 66,89	6,76 - 342,49	114,55 \pm 146,81	4,84 - 772,6
	57	3,97 \pm 3,24	0,16 - 21,27	8,99 \pm 8,44	0,53 - 52,15
<i>Alosa spp.</i>					
	4	5,16 \pm 3,3	1,91 - 8,34	8,43 \pm 4,6	3,60 - 14,67
	4	13,63 \pm 4,58	7,73 - 18,08	18,78 \pm 6,69	9,10 - 23,76
	4	4,07 \pm 3,33	1,01 - 8,56	2,47 \pm 0,79	1,34 - 3,00
<i>Engraulis sp.</i>					
	12	33,18 \pm 15,42	2,81 - 50,42	30,04 \pm 14,42	3,69 - 47,26
	12	82,24 \pm 54,85	15,4 - 187,57	97,06 \pm 63,16	14,57 - 227,53
	12	2,78 \pm 1,35	0,85 - 5,47	3,95 \pm 4,19	1,44 - 16,94
Blennidae					
<i>Mira</i>					
	21	8,45 \pm 5,57	0,33-24,14	7,60 \pm 3,59	3,43-20,36
	21	13,98 \pm 7,53	0,014-27,71	21,21 \pm 55,39	1,21-55,39
	21	4,48 \pm 12,42	0,00-58,55	2,91 \pm 1,69	0,33-5,65
<i>Guadiana</i>					
	63	9,16 \pm 4,04	2,72-28,98	9,16 \pm 4,08	3,12-22,05
	63	19,52 \pm 9,79	3,59-56,39	26,53 \pm 16,87	6,62-102,54
	63	2,26 \pm 1,02	0,55-6,56	3,42 \pm 2,43	0,63-13,08
Gobiidae					
<i>Mira</i>					
	61	16,69 \pm 18,54	3,13-76,39	16,08 \pm 20,69	3,08-114,40
	61	38,99 \pm 18,54	1,23-315,46	72,37 \pm 127,81	2,12-619,69
	61	2,22 \pm 1,07	0,19-4,42	3,34 \pm 2,01	0,23-9,01
<i>Guadiana</i>					
	80	11,36 \pm 9,29	0,17-64,91	12,09 \pm 10,50	3,09-66,87
	80	31,82 \pm 24,01	2,22-138,12	69,87 \pm 69,52	3,23-320,94
	80	6,59 \pm 14,79	0,14-114,32	6,75 \pm 6,11	0,25-34,65
Atherinidae					
<i>Mira</i>					
	32	31,68 \pm 37,17	4,02-132,80	20,89 \pm 19,24	3,09-79,96
	32	78,31 \pm 100,95	3,69-356,67	90,36 \pm 115,12	6,56-449,13
	32	2,50 \pm 1,76	0,32-10,48	3,84 \pm 1,71	0,54-8,89
<i>Guadiana</i>					
	14	14,28 \pm 8,74	5,33-35,24	12,60 \pm 6,93	5,54-29,40
	14	26,09 \pm 20,53	7,14-81,14	57,17 \pm 43,08	23,11-173,37
	14	2,27 \pm 1,60	0,22-5,27	4,84 \pm 3,27	2,11-15,33

A concentração em proteínas solúveis variou entre 8,58 e 176,06 $\mu\text{gPROT/larva}$ em *Sardina sp.*, entre 12,26 e 95,15 $\mu\text{gPROT/larva}$ em *Alosa spp.* e entre 20,04 e 63,82

μg PROT/larva em *Engraulis* sp. No caso dos gobídeos e atherinídeos, a concentração média em proteínas foi relativamente semelhante nas duas populações larvares estudadas (respectivamente, $66,2 \pm 36,83$ e $59,2 \pm 29,88$ μg PROT/larva no rio Mira e $59,3 \pm 42,55$ e $50,9 \pm 22,99$ μg PROT/larva no rio Guadiana). Pelo contrário, o conteúdo proteico médio das larvas de blenídeos recolhidas no rio Guadiana ($79,1 \pm 34,48$ μg PROT/larva) foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao obtido para as larvas provenientes do rio Mira ($50,3 \pm 20,71$ μg PROT/larva). A TABELA 14 resume estes dados e os valores relativos aos índices PROT/RNA, PROT/DNA e Gpi para as famílias consideradas. Os valores destes índices de condição variam entre bacias e entre métodos embora apenas nos clupeídeos as relações PROT/RNA e PROT/DNA médias sejam diferentes entre bacias ($4,6 \pm 2,70$ e $21,5 \pm 22,91$ no rio Mira vs. $1,8 \pm 2,29$ e $6,2 \pm 9,01$ no rio Guadiana, respectivamente).

Em *Sardina* sp. e nos atherinídeos a concentração em ácidos nucleicos, [AN], parece aumentar exponencialmente com o comprimento-padrão (FIGURA 22), independentemente do método de determinação usado. No caso dos gobídeos e blenídeos, ajustaram-se significativamente relações lineares quando [AN] foi obtida a partir do método de Caldarone & Buckley (1991) e relações exponenciais quando aquelas quantidades foram determinadas através do método de Clemmesen (1988, 1993) (FIGURA 22). No caso de *Alosa* spp. e de *Engraulis* sp., não foi possível identificar um padrão para a relação entre a concentração larvar de RNA e DNA e o comprimento, em virtude do número reduzido de larvas considerado ($n=4$ e $n=12$, respectivamente).

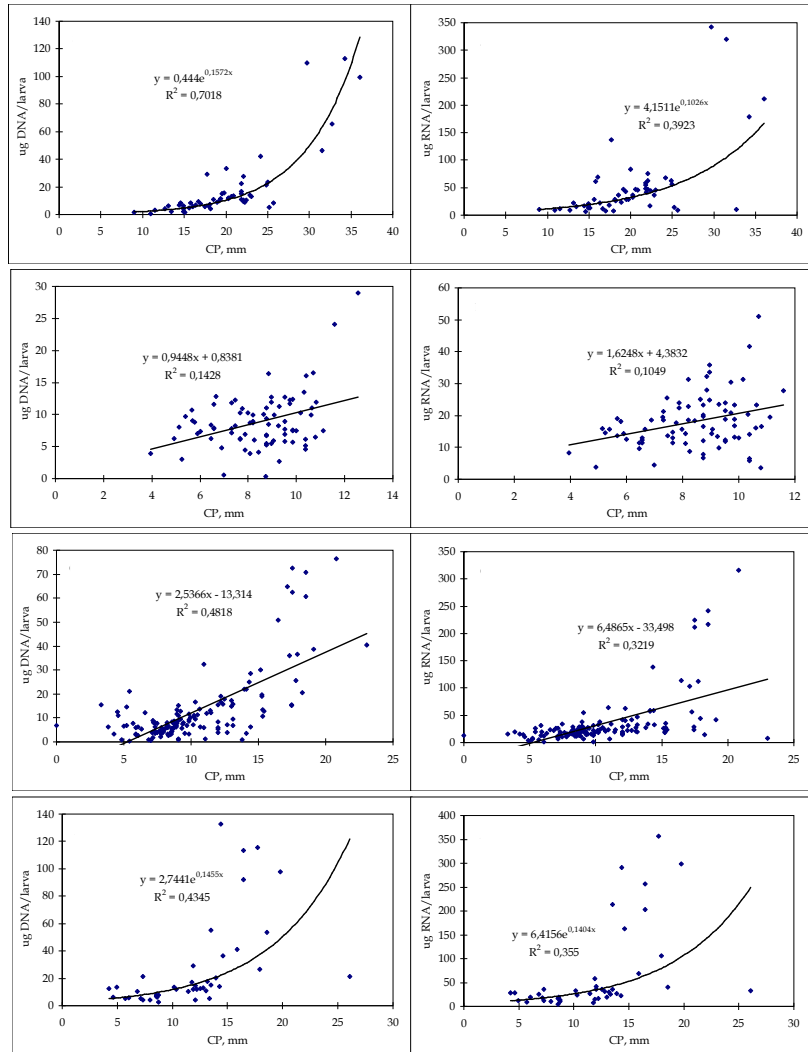
A razão RNA/DNA apenas se correlacionou ($p < 0,01$) com o comprimento-padrão das larvas (FIGURA 23) em *Sardina* sp. [método de Caldarone & Buckley (1991)] e em blenídae [método de Clemmesen (1988, 1993)]. Pelo contrário, os índices PROT/RNA e PROT/DNA parecem decrescer exponencialmente com comprimento para a generalidade das famílias: os parâmetros a e b das equações variam entre metodologias. Contudo, no caso dos atherinídeos, PROT/RNA parece aumentar exponencialmente com o comprimento-padrão (FIGURA 24).

TABELA 14 - Estatística das variáveis $\mu\text{gPROT/larva}$, PROT/DNA , PROT/RNA e Gpi (\%/dia) . n - número de larvas, e $x \pm s$ - média \pm desvio-padrão, * - teste t -Student, H_0 : $\text{índice}_{\text{Mira}} = \text{índice}_{\text{Guadiana}}$, $p < 0,05$.

		<i>Caldarone & Buckley (1991)</i>	<i>Clemmesen (1988, 1993)</i>
	n	$x \pm s$	$x \pm s$
Clupeidae (c)			
Mira			
$\mu\text{g PROT (a)}$	18	71,48 \pm 37,48	----
PROT/DNA	18	21,48 \pm 22,91*	22,02 \pm 23,99*
PROT/RNA	18	4,56 \pm 2,70*	3,50 \pm 2,28*
Gpi	21	----	27,64 \pm 25,83
Guadiana			
$\mu\text{g PROT (a)}$	21	55,29 \pm 44,84	----
PROT/DNA	21	6,18 \pm 9,01*	6,65 \pm 8,79*
PROT/RNA	21	1,77 \pm 2,29*	1,26 \pm 2,02*
Gpi	40	----	46,01 \pm 43,11
Alosa spp. (b)			
$\mu\text{g PROT (a)}$	2	53,71 \pm 58,61	----
PROT/DNA	2	6,96 \pm 7,77	13,62 \pm 18,07
PROT/RNA	2	6,49 \pm 8,22	5,54 \pm 6,95
Gpi	4	----	13,64 \pm 2,64
Engraulis sp. (b)			
$\mu\text{g PROT (a)}$	10	45,79 \pm 15,42	----
PROT/DNA	10	2,59 \pm 4,18	1,73 \pm 1,46
PROT/RNA	10	0,91 \pm 0,87	0,73 \pm 0,69
Gpi	12	----	15,62 \pm 19,93
Blennidae			
Mira			
$\mu\text{g PROT (a)}$	19	50,34 \pm 20,71*	----
PROT/DNA	19	20,77 \pm 43,76	9,10 \pm 6,76
PROT/RNA	19	174,86 \pm 739,9	4,80 \pm 4,4
Gpi	20	----	10,27 \pm 7,10
Guadiana			
$\mu\text{g PROT (a)}$	56	79,14 \pm 34,48*	----
PROT/DNA	56	10,28 \pm 5,41	10,72 \pm 6,19
PROT/RNA	56	5,14 \pm 3,21	4,27 \pm 3,20
Gpi	62	----	17,33 \pm 11,58
Gobiidae			
Mira			
$\mu\text{g PROT (a)}$	66	66,17 \pm 36,83	----
PROT/DNA	66	10,81 \pm 12,02	10,63 \pm 9,21
PROT/RNA	66	7,45 \pm 3,33	2,45 \pm 3,32
Gpi	48	----	26,24 \pm 21,29
Guadiana			
$\mu\text{g PROT (a)}$	55	59,27 \pm 42,55	----
PROT/DNA	55	7,45 \pm 6,28	9,76 \pm 12,02
PROT/RNA	55	4,42 \pm 7,95	3,82 \pm 5,08
Gpi	69	----	17,49 \pm 18,42
Atherinidae			
Mira			
$\mu\text{g PROT (a)}$	7	59,31 \pm 29,88	----
PROT/DNA	7	5,31 \pm 5,12	6,25 \pm 4,88
PROT/RNA	7	4,19 \pm 3,12	1,66 \pm 1,18
Gpi	8	----	23,83 \pm 19,29
Guadiana			
$\mu\text{g PROT (a)}$	25	50,88 \pm 22,99	----
PROT/DNA	25	4,75 \pm 5,80	4,78 \pm 5,90
PROT/RNA	25	3,34 \pm 5,36	1,71 \pm 2,64
Gpi	32	----	19,92 \pm 12,29

Legenda: (a) valores obtidos independentemente do método de quantificação das proteínas, (b) não foram discriminados por bacias em virtude do reduzido número de larvas analisadas, (c) inclui os géneros *Sardina* e *Alosa*.

(A)



(B)

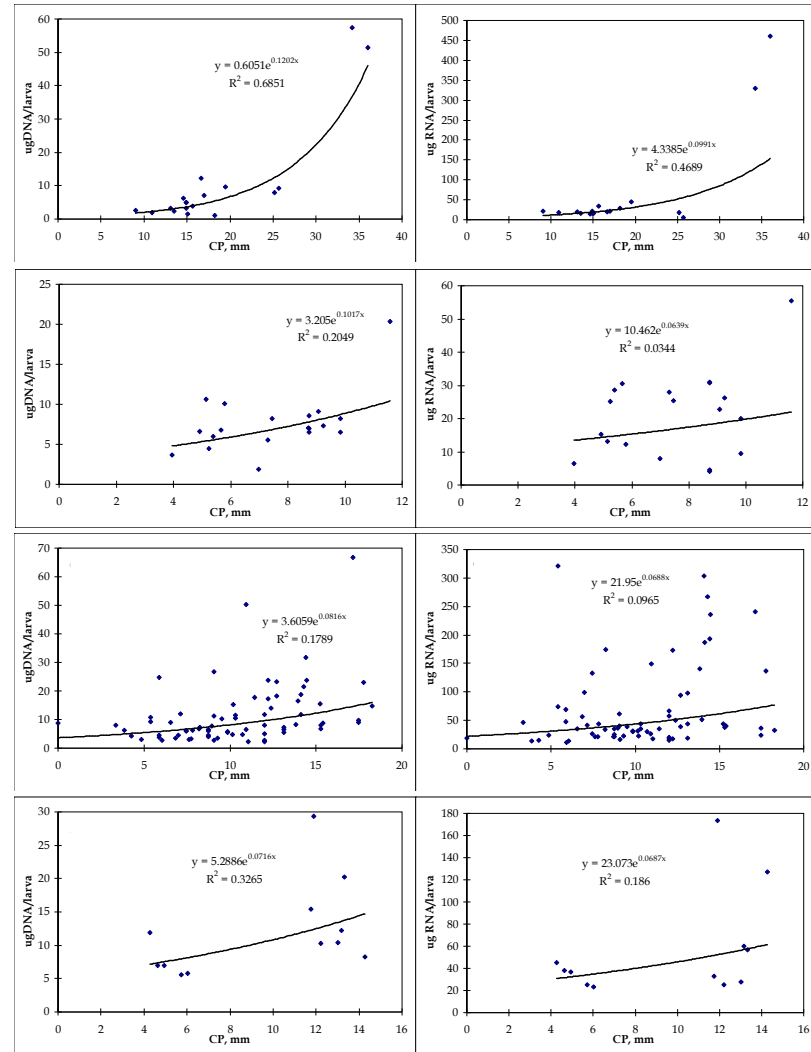


FIGURA 22- Relação entre a concentração em ácidos nucleicos, obtida a partir do método de Caldarone & Buckley (1991) (A) e do método de Clemmesen (1988, 1993) (B), e o comprimento-padrão (CP) e respectivas equações ajustadas.

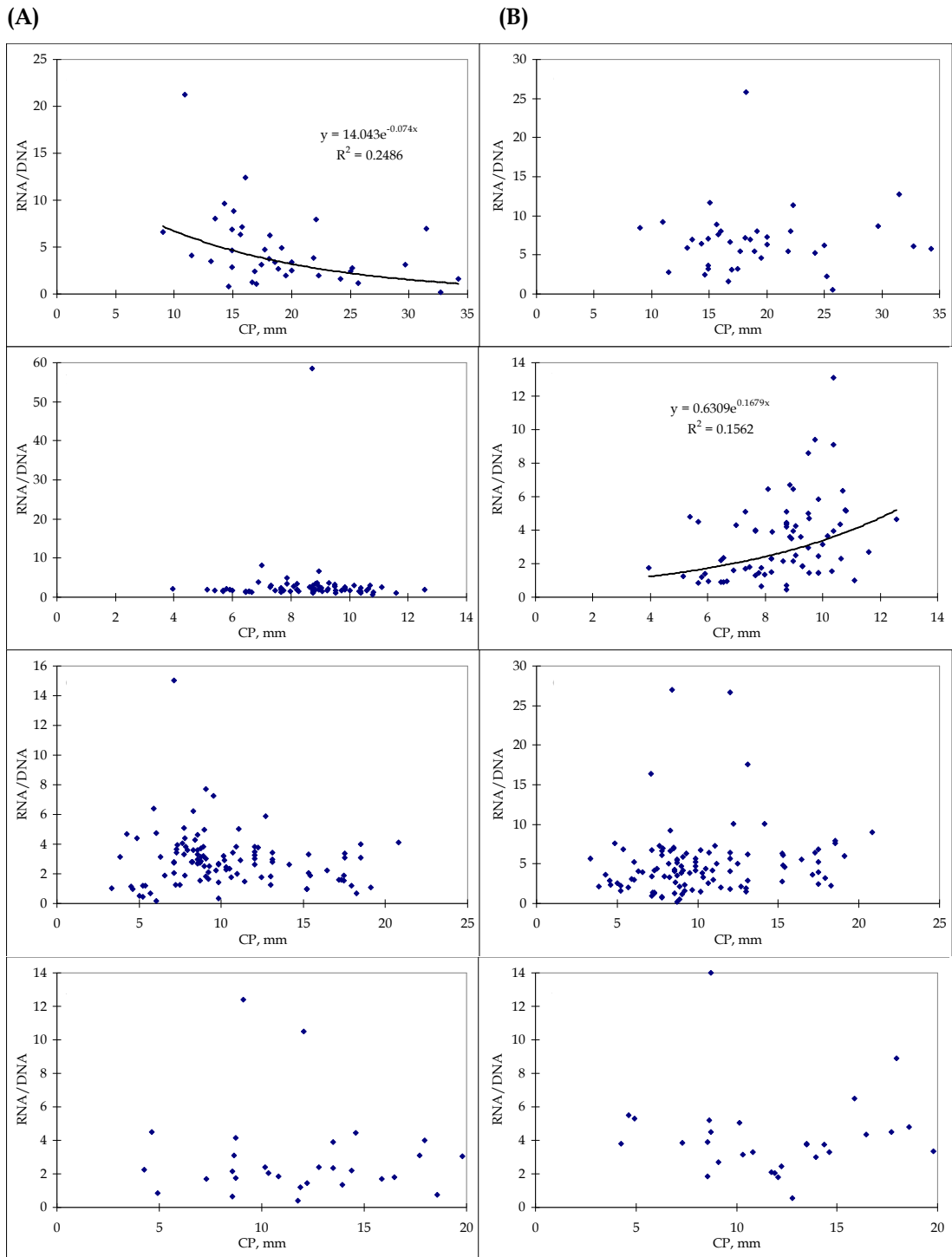


FIGURA 23 - Relação entre os índices RNA/DNA, obtidos a partir dos métodos de Caldarone & Buckley (1991) (A) e Clemmesen (1988, 1993) (B), e o comprimento padrão das larvas. Nos casos em que se verificou existirem relações estatisticamente significativas apresentam-se as equações respectivas.

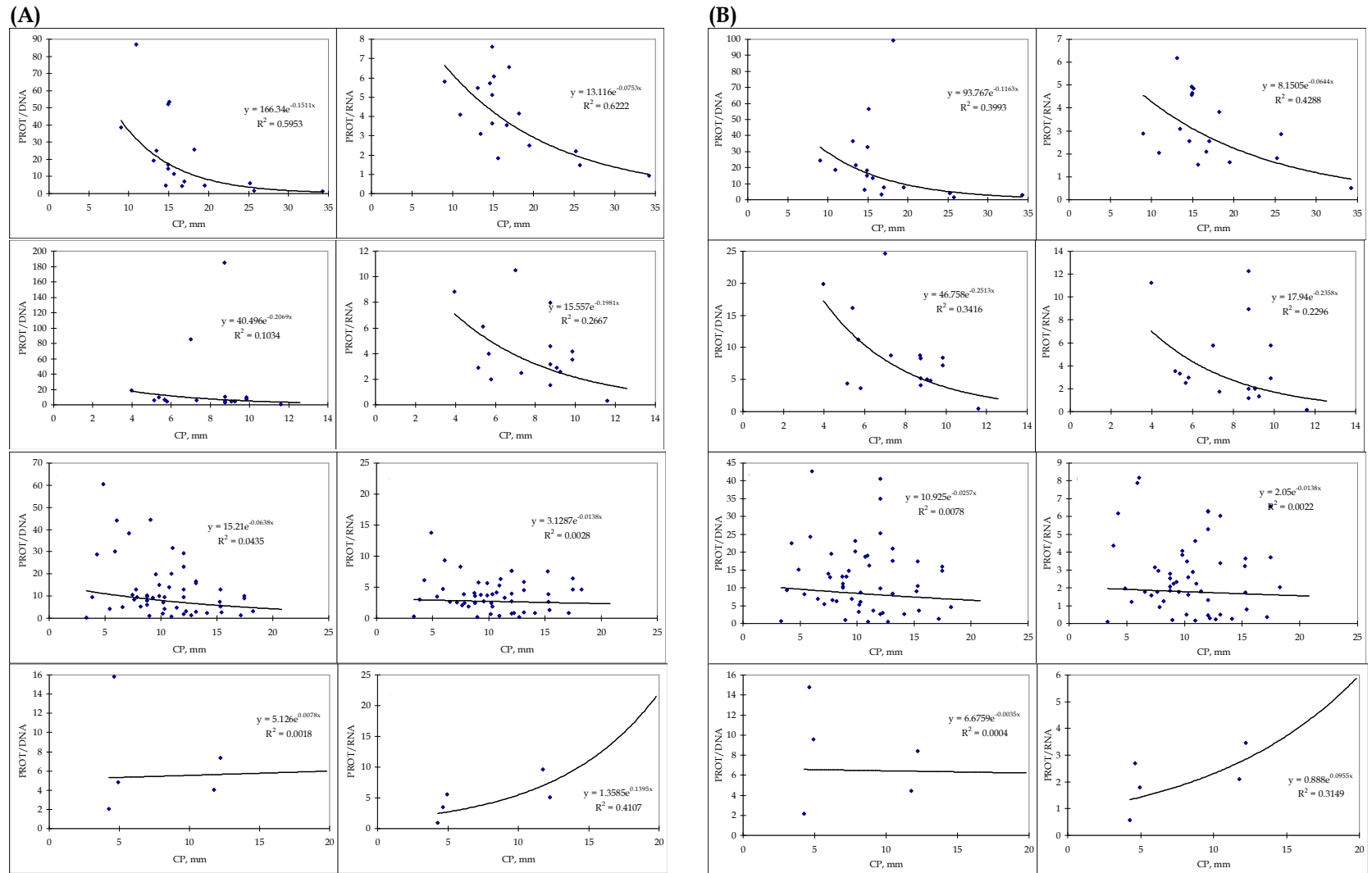


FIGURA 24 - Relação entre os índices PROT/DNA e PROT/RNA, em que a concentração dos ácidos nucleicos foi obtida a partir dos métodos de Caldarone & Buckley (1991) (A) e de Clemmesen (1988, 1993) (B), e o comprimento-padrão das larvas. Incluem-se, também, as curvas ajustadas.

4.6. Relação entre a condição nutricional e factores abióticos/bióticos relevantes

Dos três géneros de clupeíformes que ocorreram neste estudo, apenas a condição nutricional de *Sardina* sp. se correlacionou significativamente ($p < 0,0001$) com alguns dos parâmetros hidrológicos e biológicos estudados (ANEXO III) designadamente com anelídeos ($< 500 \mu\text{m}$), cirrípedes ($> 500 \mu\text{m}$), copepoditos e anfípodes ($r > 0,65$), no rio Mira, e *nauplii* de copépodes, cumáceos, bivalves ($> 500 \mu\text{m}$) e misidáceos ($r > 0,53$), no rio Guadiana. Quanto às restantes famílias, os índices de condição correlacionaram-se significativamente ($p < 0,001$) com a temperatura, a salinidade e diversos *taxa*, em graus diferentes. Geralmente os coeficientes de correlação foram superiores a 0,35, contudo, em alguns casos $r > 0,65$, como por exemplo, quando se considerou a razão RNA/DNA de blenídeos e a abundância de ostrácodes (no rio Guadiana) ou as razões PROT/[ácidos nucleicos] de blanídeos ou aterinídeos e a temperatura ou a densidade de briozoários, quetognatos, cirrípedes, larvas de bivalves, *nauplii* de decápodes ou de copépodes. Os coeficientes de correlação mais elevados registaram-se para as relações entre a condição nutricional de aterinídeos (PROT/DNA) e a temperatura, e a taxa de crescimento proteico instantâneo (G_{pi}) e a abundância de cirrípedes ($r > 0,80$). Verificou-se que os grupos correlacionados foram diferentes entre populações larvares (ANEXO III).

Factores como a temperatura e abundância de dinoflagelados, dos ciliados, dos hidrozoários ($> 500 \mu\text{m}$), dos anelídeos, dos cirrípedes, dos ostrácodes, dos copépodes e dos *zoea/mysis* de decápodes integraram equações que explicaram 43 - 95% da variabilidade da razão RNA/DNA. Uma percentagem inferior (34 - 71%) da variância dos índices PROT/RNA, PROT/DNA e G_{pi} foi explicada por equações que incluíram a temperatura e abundância de dinoflagelados, de briozoários, dos hidrozoários ($< 500 \mu\text{m}$), de cumáceos, dos *nauplii* de copépodes, de gastrópodes, de cirrípedes ($> 500 \mu\text{m}$), de *zoea/mysis* de decápodes e de bivalves (TABELA 15).

TABELA 15 - Modelos de regressão obtidos para as relações Índices *vs.* Parâmetros abióticos/bióticos. Mt. - Método, AN - Annelida, BR - Bryozoa, C - copepoditos, CC - *nauplii* Copepoda, CIL - Ciliata, CUM - Cumacea, CR - (<500 µm), CRR - Cirripedia (>500 µm), DN - Dinoflagelata, D - *zoea/mysis* Decapoda, G - Gastropoda (<500 µm), H - Hydroida (<500 µm), HH - Hydroida (>500 µm), O - Ostracoda, PL - Pelecypoda, PRED - predadores combinados, PRES - presas potenciais, T - Temperatura, * - $p < 0,05$, ** - $p \leq 0,001$, *** - $p < 0,0001$

	Modelo	Mt.	n	R ²	F
Clupeidae					
<i>Guadiana</i>	Log(PROT/DNA)=1,21+1,2*10 ⁻⁵ *CC-0,223*PL	CB	21	0,653	16,90***
	Log(PROT/DNA)=1,21+1,3*10 ⁻⁵ *CC-0,229*PL	CC	21	0,677	18,83***
	Log(PROT/RNA)=-0,289+1*10 ⁻⁵ *CC-0,278*PL	CC	21	0,651	16,76***
<i>Mira</i>	RNA/DNA=7,55-0,0004*CR-3,80*T+0,0061*D	CB	16	0,948	73,39***
	RNA/DNA=4,59+0,001*CC+0,00012*PL-7*10 ⁻⁵ *PRES	CB	16	0,732	10,93***
	Log(RNA/DNA)=0,871+9*10 ⁻⁶ *H-6,4*10 ⁻⁵ *CR	CB	16	0,754	19,92***
	Log(PROT/DNA)=0,256-4,1*10 ⁻⁵ *DN+0,127*T+1,77*CRR	CB	18	0,516	4,97*
	Log(PROT/DNA)=-1,23-6*10 ⁻⁵ *DN+0,23*T+0,133*CRR	CC	18	0,619	7,59*
Blennidae					
<i>Guadiana</i>	RNA/DNA=1,642+0,0002*DN+5*10 ⁻⁶ *CC	CB	60	0,431	21,59***
	RNA/DNA=1,638+0,0109*HH-0,296*CUM	CB	60	0,436	22,00***
	RNA/DNA=1,654+4*10 ⁻⁶ *CC+0,002*HH	CB	60	0,434	21,82***
	RNA/DNA=1,642+6*10 ⁻⁶ *CIL+0,003*HH	CB	60	0,434	21,85***
	Log(RNA/DNA)=0,431-3,1*10 ⁻⁵ *CIL+7,04*10 ⁻⁴ *O	CC	60	0,576	38,71***
	Log(RNA/DNA)=0,392+1,56*10 ⁻⁴ *ANN+9,8*10 ⁻⁵ *O	CC	60	0,594	41,63***
	Log(Gpi)=2,555-0,0013*ANN+2,1*10 ⁻⁴ *O-6,1*10 ⁻⁵ *Q		52	0,652	30,00***
	Log(Gpi)=2,515-0,0013*ANN+2,2*10 ⁻⁴ *O		52	0,650	45,52***
Gobiidae					
<i>Guadiana</i>	RNA/DNA=0,313 + 0,0027*AN+0,00051*C+0,0011*D	CB	31	0,608	13,97***
	RNA/DNA=-3,49-0,0016*AN+0,406*T-0,00014*PRED	CC	31	0,484	8,45***
	Gpi=-76,98+4,75*T+0,867*BR		31	0,611	22,02***
<i>Mira</i>	Gpi=22,97+0,435*O-0,848*CUM		36	0,341	8,53**
	Log(Gpi)=3,02+0,27*O-0,048*CUM		36	0,395	10,79***
Atherinidae					
<i>Guadiana</i>	PROT/RNA=8,635-0,374*T+0,209*BR	CB	22	0,678	19,97***
	PROT/DNA=1,367+0,780*BR+0,272*G	CB	22	0,711	23,38***
	PROT/RNA=28,96-1,342*T-0,073*CRR	CC	22	0,505	9,70**
	PROT/DNA=1,627+0,803*BR	CC	22	0,689	44,36***

4.7. Comparação da condição nutricional larvar entre rios

No rio Mira, cerca de 5,6% (1/18) das larvas de *Sardina* sp. apresentaram RNA/DNA <1,3 enquanto no rio Guadiana nenhuma larva se encontrava nesse estado. Quanto às restantes famílias, as porcentagens de larvas em estado de inanição

variaram entre 2,3% (gobídeos) e 13,6% (blenídeos) no rio Mira, e entre 2,9% (aterinídeos) e 11,1% (blenídeos) no rio Guadiana. A percentagem de casos em que Gpi foi inferior a 0 % foi menor em ambos os rios. De acordo com aquele indicador, apenas 4,5 % dos blenídeos e 7,1% dos aterinídeos, no rio Mira, e 1,4% dos gobídeos, no rio Guadiana, se encontravam em estado de inanição. Complementarmente, RNA/DNA(critico) variou entre -0,26 em blenídeos no rio Guadiana e 0,69 para aterinídeos no rio Mira (TABELA 16).

TABELA 16 - Percentagem de larvas em estado de inanição, *i.e.* com RNA/DNA<1,3 no caso dos clupeídeos, RNA/DNA<1,0 para as restantes famílias (%RNA/DNA); e Gpi<0%/dia (%Gpi) e valores de RNA/DNA(critico) (Rc) - obtidos a partir de Buckley (1984).

	<i>Mira</i>				<i>Guadiana</i>			
	<i>n</i>	%RNA/DNA	%Gpi	Rc	<i>n</i>	%RNA/DNA	%Gpi	Rc
Clupeidae	18	5,6	0,0	0,41	39	0,0	0,0	0,18
Blennidae	22	13,6	4,5	0,57	63	11,1	0,0	-0,26
Gobiidae	86	2,3	0,0	0,46	70	7,1	1,4	0,44
Atherinidae	14	0,0	7,1	0,69	34	2,9	0,0	0,09

Da análise de variância a três entradas, verificou-se que as diferenças entre bacias se revelaram não-significativas para todos os índices ($p>0,16$). Entre dia e noite, apenas Log(RNA/DNA) obtido a partir de CB se distinguiu significativamente, embora ligeiramente ($p=0,049$). Pelo contrário, somente a diferença entre famílias de Log(Gpi) se revelou não-significativa ($p>0,07$). Da interação entre factores resultaram diferenças significativas ($p<0,009$) em algumas variáveis: Log(RNA) quando se considerou *Bacia* x *Dia/Noite*; Log(RNA/DNA), Log(RNA), Log(PROT/RNA), Log(PROT/DNA) no caso de *Bacia* x *Família*; e Log(RNA/DNA) e Log(RNA) para *Dia/Noite* x *Família* (TABELA 17).

Para a maioria das comparações entre bacias e considerando os valores por família (factor *Bacia* x *Família*), os valores médios de RNA/DNA são relativamente superiores no rio Guadiana. Pelo contrário, os valores médios das razões PROT/RNA e PROT/DNA são genericamente superiores no rio Mira. As diferenças dos índices entre bacias foram significativas para Log(RNA) e Log(DNA) em blenídeos e Log(RNA/DNA) em gobídeos. No caso de Log(PROT/RNA) e Log(PROT/DNA), apenas se obtiveram diferenças significativas entre bacias em clupeídeos (TABELA 18).

TABELA 17 - Resultados significativos da ANOVA a 3 entradas de Log(RNA), Log(DNA), Log(RNA/DNA), Log (PROT/RNA), Log(PROT/DNA) e Log(Gpi), com o comprimento-padrão e temperatura como co-variáveis contínuas, para larvas capturadas nos rios Mira e Guadiana (Costas Oeste e Sudoeste portuguesa, respectivamente). [AN] obtidas a partir de Clemmesen (1983, 1993) adaptado por Chícharo (1996), Caldarone & Buckley (1991) (1). $\alpha=0,05$.

<i>Factores</i>	<i>Variável</i>	<i>g.l.</i>	<i>MS efeito</i>	<i>MS erro</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Noite/Dia</i>	Log(RNA/DNA) (1)	1, 203	0,291	0,075	3,91	0,049
<i>Família</i>	Log(DNA) (1)	3, 203	2,191	0,082	26,89	<0,001
	Log(RNA) (1)		0,744	0,071	10,48	<0,001
	Log(RNA/DNA) (1)		0,438	0,075	5,88	<0,001
	Log(DNA)		1,589	0,074	21,56	<0,001
	Log(RNA)		1,271	0,084	15,13	<0,001
	Log(RNA/DNA)		0,210	0,078	2,68	0,048
	Log(PROT/RNA) (1)		3,495	0,811	3,41	<0,006
	Log(PROT/DNA) (1)		10,99	0,915	12,02	<0,001
	Log(PROT/RNA)		6,830	0,984	7,21	<0,001
	Log(PROT/DNA)		7,401	0,889	8,33	<0,001
	<i>Bacia x Noite/Dia</i>	Log(RNA) (1)	1, 203	0,503	0,071	7,09
<i>Bacia x Família</i>	Log(RNA/DNA) (1)	3, 203	0,309	0,075	4,15	0,007
	Log(RNA)		0,338	0,084	4,02	0,008
	Log(PROT/RNA) (1)		4,455	0,811	5,49	0,001
	Log(PROT/DNA) (1)		2,642	0,915	2,89	0,037
	Log(PROT/RNA)		6,794	0,984	7,17	<0,001
<i>Noite/Dia x Família</i>	Log(PROT/DNA)		4,758	0,889	5,35	0,002
	Log(RNA) (1)	3, 203	0,359	0,071	5,05	0,002
	Log(RNA/DNA) (1)		0,236	0,075	3,16	0,026

TABELA 18 - Resultados do teste *t*-Student para comparação dos índices entre bacias, H_0 : índice_{Mira}=índice_{Guadiana}. Apresentam-se apenas as diferenças significativas ($p<0,05$). Clupeidae inclui os géneros *Sardina* e *Alosa*.

<i>Família</i>	<i>Variável</i>	<i>Método</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Clupeidae	Log(DNA)	CB	3,09	<0,004
	Log(RNA)	CB	3,67	<0,0008
	Log(DNA)	CC	3,55	<0,0011
	Log(RNA)	CC	4,18	<0,0002
	Log(PROT/RNA)	CB	-4,62	<0,0001
	Log(PROT/DNA)	CB	-3,73	<0,0001
	Log(PROT/RNA)	CC	-4,86	<0,0001
	Log(PROT/DNA)	CC	-3,79	<0,0001
Blennidae	Log(DNA)	CB	2,09	<0,04
	Log(RNA)	CB	2,79	<0,007
	Log(RNA)	CC	2,28	<0,026
Gobiidae	Log(RNA/DNA)	CC	-2,84	<0,005

5. DISCUSSÃO

5.1. Características hidrológicas, abundância e distribuição do plâncton

5.1.1 Parâmetros abióticos

Os valores de temperatura e de salinidade obtidos neste trabalho encontram-se entre os referidos na literatura para o período de amostragem considerado (Loureiro *et al.*, 1984; Cartaxana, 1991; Ré, 1994; Rojo Mattos, 1995). Especialmente, as maiores variações da salinidade e turbidez relativamente á temperatura confirmam os resultados publicados por outros autores, designadamente no que diz respeito ao rio Mira (Cartaxana, 1991; Ré, 1994; Rojo Mattos, 1995). Em termos nictemerais, as variações da temperatura e salinidade foram mais acentuadas no rio Guadiana. A influência da maré, pela deslocação das massas de água e pelas alterações que provoca na direcção e velocidade das correntes dominantes, terá sido determinante para aquelas variações. Por outro lado, as dimensões relativas dos dois estuários e a sua relação com o oceano adjacente propiciam condições hidrológicas diferentes, sejam a menor intrusão de água salgada e maiores temperaturas no rio Mira ou a maior turbulência e velocidade das correntes no rio Guadiana. Aquelas diferenças poderão explicar as maiores variações nictemerais dos parâmetros hidrológicos observadas no rio Guadiana.

5.1.2. Potencias presas

A predominância dos *nauplii* de copépodes na distribuição espacial do microzooplâncton de ambos os rios e as densidades apreciáveis verificadas nas estações mais a jusante no rio Guadiana ou nas estações intermédias no rio Mira, serão reflexo, por um lado, da importância dos copépodes no meio marinho, pois constituem o grupo mais comum das comunidades zooplactónicas marinhas (Roman, 1982; Raymont, 1983), e, por outro, da preferência dos copépodes por zonas lénticas (Oliveira *et al.*, 1989), em que as condições físico-químicas do meio contribuem para a formação de agregados de nutrientes, favorecendo a produção primária e, por conseguinte, aumentando a disponibilidade de alimento (Lehman, 1982). A elevada abundância relativa daquele *taxon* relativamente aos restantes

microzooplankton também foi observada por Rojo Mattos (1995), no rio Mira, que apresenta valores semelhantes (>80%). Pelo contrário, Chícharo (1996) refere como grupos de presas potenciais mais representativos ao largo da foz do rio Guadiana, os dinoflagelados (~30% da abundância total), os *nauplii* de crustáceos (19%) e os ovos de invertebrados (~17%).

Nictemeralmente, importância dos *nauplii* de copépodes foi menor e partilhada com os copepoditos e as larvas de bivalves, no rio Mira, e com os ciliados, no rio Guadiana. A distribuição circadiana desses grupos parece estar associada ao ciclo de maré e à luminosidade. A maré e a velocidade das correntes poderão contribuir para a intromissão de espécies marinhas com origem na zona costeira adjacente ou de organismos de características fluviais provenientes de regiões situadas a montante. Por outro lado, ritmos endógenos relacionados com a luminosidade poderão originar migrações verticais dos organismos, que assim surgem nas colheitas apenas em determinados momentos do dia ou da noite.

5.1.3. *Predadores potenciais*

A importância relativa dos vários *taxa* na distribuição espacial e nictemeral do mesozooplâncton variou entre os rios. No rio Guadiana, foram importantes os copépodes e os cladóceros (~70% do total), enquanto no rio Mira, as hidromedusas (medusas) e os misidáceos representaram mais de 75% da abundância total da comunidade mesozooplânctónica. Nictemeralmente, as colheitas foram dominadas por decápodes (*zoea/mysis*) e copépodes, no rio Mira, e por cladóceros, decápodes (*zoea/mysis*) e ovos de peixes, no rio Guadiana. A generalidade dos *taxa* apresentou variações sazonais bastante apreciáveis, sendo que a distribuição espacial parece particularmente relacionada com a maré. Por um lado, a maré contribui para os movimentos dos zooplankton e, por outro, condiciona os gradientes de alguns factores abióticos determinantes para o ciclo de vida do plâncton, *e.g.* salinidade, temperatura e velocidade das correntes. Com efeito, nos estuários de regiões temperadas, os padrões sazonais de distribuição zooplâncton encontram-se associados a picos de abundância do fitoplâncton e de produção primária, sugerindo a importância da disponibilidade de alimento para o controlo da abundância do zooplâncton (Buskey, 1993). Por outro lado, Cartaxana (1991) refere a importância da

salinidade como factor condicionante das migrações de reprodução e da desova de um penaídeo estuarino relativamente comum no rio Mira. Quanto às variações circadianas da abundância, os ritmos endógenos de migração vertical relacionados com a luminosidade (Raymont, 1983), o afundamento passivo dos organismos durante a baixa-mar (em virtude das menores velocidades das correntes) (Chícharo *et al.*, 1998c) ou os movimentos das massas de água com as marés, poderão ter contribuído para os resultados obtidos.

No rio Mira, Rojo Mattos (1995) refere os copépodes como o grupo zooplancónico mais abundante. Aquele autor refere, ainda, a ocorrência de grandes concentrações da hidromedusa *Blackfordjia virginica* entre Julho e Outubro. No presente trabalho, estes macrozooplanctontes também ocorreram em densidades bastante apreciáveis nas estações intermédias e constituíram um *taxa* relativamente abundante nas colheitas espaciais (~44% da abundância total). Chícharo (1996) indica os sifonóforos e outras hidromedusas (~88% da abundância total) e os quetognatos (7,5%) como os grupos mais abundantes num transecto realizado perpendicularmente à costa ao largo do rio Guadiana em 1992. No estuário, os cladóceros (*Evadne* spp. e *Podon* spp.), quetognatos (*Sagitta friderici*), larváceos (*Oikopleura dioica*) e particularmente os misidáceos (*Mesopodopsis slabberi*) são referidos como dominando a fracção zooplanctónica (Chícharo *et al.*, 1998c).

5.1.4. Ictioplâncton

A distribuição espacial e nictemeral dos ovos de peixe observada neste estudo poderá reflectir o comportamento reprodutivo dos adultos (Smith, 1973) e a influência de factores hidrológicos do meio (Hewitt, 1981). As maiores abundâncias registadas em alguns meses poderão indicar épocas de desova de algumas das espécies estudadas, designadamente no caso dos clupeiformes em que foi possível identificar os ovos com fiabilidade. Por outro lado, os resultados obtidos parecem reflectir a distribuição não-uniforme dos ovos nos estuários dos rios Mira e Guadiana. Com efeito, a distribuição agregada dos ovos promoverá o desenvolvimento do comportamento gregário das larvas, determinante para a sobrevivência larvar (Hewitt, 1981). Neste estudo, as maiores abundâncias de ovos de clupeiformes verificadas no rio Mira em Julho e Agosto, diferem dos resultados

publicados por Ré (1994) e poderão relacionar-se com o início do período de amostragem (Maio), após o período de máxima actividade de desova, *i.e.* Abril (Ré, 1994). No rio Guadiana, as diferenças nas densidades relativas entre ovos de sardinha e anchova, parecem reflectir a preferência pelo estuário do Guadiana para a desova de *E. encrasicolus*. Por outro lado, as estações em que se registaram os máximos de densidade de ovos de anchova, poderão indicar locais preferenciais de desova da espécie, aliás como verificaram Ré (1990, 1994) e Ré & Gonçalves (1993), para o rio Mira, e Chícharo (1988) para o rio Guadiana. Pelo contrário, Antunes *et al.* (1988) referem maiores abundâncias de ovos de *E. encrasicolus* na ria de Alvôr nas estações mais exteriores (em Julho), que atribuíram às condições hidrográficas daquele sistema.

A distribuição nictemeral da maioria dos ovos de peixe com a maré, observada neste estudo, poderá reflectir a importância dos factores hidrológicos. A maioria dos ovos de peixe recolhidos, eram de dimensões relativamente reduzidas e com um espaço perivitelino reduzido e, portanto, com dificuldades acrescidas em contrapor as correntes de maré. No entanto, a variação nictemeral da densidade dos ovos de clupeídeos e engraulídeos parece reflectir estratégias específicas. As maiores concentrações de ovos de *Sardina* sp. registaram-se durante a preia-mar, o que pode indicar uma dependência de factores hidrológicos ou de processos de advecção, e portanto uma utilização ocasional do estuário como *nursery*. Pelo contrário, as maiores abundâncias de ovos de anchova durante a baixa-mar podem reflectir a preferência pelas condições estuarinas para o desenvolvimento embrionário e larvar, o que parece confirmado pela abundância relativa das duas espécies nos estuários estudados. Dinâmica semelhante é referida por Antunes *et al.* (1988) para ovos de sardinha na ria de Alvôr.

Considerando conjuntamente as variações espacial e nictemeral parecem existir estratégias de retenção dos ovos de anchova em determinadas zonas dos estuários, mais próximas do limite superior de intrusão salina e propagação da maré (Ré, 1987, 1990). Pelo contrário, a distribuição dos ovos de sardinha nos estuários parece principalmente sujeita à influência de fenómenos físicos. Estes transportam os ovos da zona costeira adjacente para o interior dos estuários, possivelmente como estratégia de sobrevivência. Quanto aos restantes ovos colhidos, a influência da maré parece evidente, particularmente em Junho. Os ovos de gobídeos, blenídeos e

aterinídeos são demersais, geralmente adesivos, e com dimensões e espaço perivitelino estreito (Russel, 1976; Fives, 1979; Palmer & Culley, 1984; Santos, 1989), características que facilitam estratégias de retenção no estuário e que poderão ser responsáveis pela permanência das espécies no estuário durante todo o seu ciclo de vida.

As larvas de gobídeos e blenídeos ocorreram regularmente e constituíram os *taxa* mais representados nas colheitas. O facto de serem espécies residentes nos estuários, completando aí o seu ciclo de vida (Costa *et al.*, 1987), poderá explicar a predominância destes *taxa*. A ocorrência relativas das larvas de clupeiformes dependeu das características da postura e do desenvolvimento larvar. Ré (1984) e Ré *et al.* (1990) referem como zonas principais de desova de clupeídeos, as costas Noroeste e Sul de Portugal. Posteriormente, a distribuição dos ovos e das larvas parece depender de processos de advecção. Pelo contrário, a anchova utiliza os estuários (Ré, 1984; Chícharo, 1988; Ré & Gonçalves, 1993; Ré, 1994) e as rias (Antunes *et al.*, 1988) da Península Ibérica como locais preferenciais de desova.

A densidade de ictioplanctontes foi substancialmente superior no rio Guadiana. As maiores dimensões deste rio e as suas características hidrológicas, que promovem a existência de um maior número e diversidade de *habitats*, poderão explicar aquele resultado. Espacialmente, as densidades de larvas de peixe foram relativamente reduzidas, <35 ind./100m³ no rio Mira e <55 ind./100m³ no rio Guadiana, quando comparadas com outros estudos realizados naqueles estuários (Chícharo, 1988; Ré, 1994). As alterações ambientais que decorreu entre os periodos de recolha considerados nesses trabalhos e Março-Setembro de 1997 poderão explicar, pelo menos em parte, as diferenças observadas. Por outro lado, parece evidente em alguns trabalhos (*e.g.* Ré, 1994) que a abundância do ictioplâncton tem decrescido ao longo dos anos.

A distribuição espacial das larvas de peixe reflecte o tipo de utilização que os vários *taxa* fazem dos estuários. Por um lado, os clupeídeos ocorreram junto à foz (*Sardina* sp.) e em estações mais a montante (*Alosa* spp.). No caso das larvas de sardinha, a sua distribuição horizontal parece depender de fenómenos de advecção (Ré, 1984; Ré *et al.*, 1990) e reflectir a utilização dos estuários como zonas de *nursery* para as formas larvares e juvenis da espécie. Pelo contrário, as larvas de *Alosa* resultam de posturas efectuadas no limite de intrusão da maré ou em zonas

dulçaquícolas (Quignard & Douchement, 1991). Por outro, as larvas de anchova foram colhidas em maior número nas estações amostradas no estuário inferior/médio. A postura de anchova ocorre nos estuários, geralmente em zonas localizadas para montante da foz, e parecem existir mecanismos de retenção das larvas no estuário durante os períodos iniciais da ontogenia. Quanto às restantes famílias, o facto de constituírem espécies residentes nos estuários e de apresentarem estratégias de retenção contra o movimento predominante em direcção às águas costeiras adjacentes, poderá explicar a sua ocorrência em maior número nas estações estuarinas (estações #0 - 3). A metodologia de colheita e particularmente as elevadas concentrações de hidromedusas observadas nas estações intermédias do rio Mira poderão ser responsáveis pela ausência de ictioplanctontes nas estações intermédias. As larvas colhidas nas estações mais a montante, integram concerteza a comunidade dulçaquícola dos rios estudados.

Nictemeralmente, a distribuição das larvas observada neste estudo poderá resultar ou relacionar-se com: 1) eventuais migrações verticais das larvas, que procuram os estratos com maiores densidades das potenciais presas. Por isso, as larvas deslocam-se para a superfície durante a noite de forma a estarem em zonas iluminadas quando se alimentarem, uma vez que as larvas são predadores visuais (Houde, 1982). As variações diárias na distribuição vertical das larvas poderão influenciar decisivamente a deriva das larvas e, por conseguinte, a distribuição horizontal e a estrutura dos agregados (Houde, 1982). Esta parece ter sido a estratégia no rio Guadiana, especialmente em Junho; 2) a influência da maré, designadamente no caso dos clupeídeos colhidos no rio Mira. Contudo, a distribuição horária da maioria dos *taxa* não parece relacionar-se com a maré; e/ou 3) com estratégias de retenção específicas, evidenciadas pelos ritmos circadianos dos gobídeos e blenídeos independentes do período do dia e da maré. A variabilidade da abundância e distribuição das larvas reflectem um padrão adaptativo da estratégia de sobrevivência das fases iniciais da ontogenia (Hewitt, 1981). A densidade de engraulídeos e aterinídeos não permitiu discurtinar variações circadianas específicas nos rios Mira e Guadiana, apesar de serem referidas na literatura estratégias de retenção das larvas, com objectivo de utilizar os estuários como zonas de *nursery* (Ré, 1994). No entanto, os mecanismos de retenção referidos anteriormente podem ser explicados apenas por processos mecânicos, que eliminam as suposições acerca do

comportamento das larvas, *e.g.* fototaxia ou actividade natatória estimulada pelas marés (Wolf, 1973, 1974 *in* Ré, 1994).

5.2. Associações entre larvas de peixes e parâmetros abióticos e bióticos

5.2.1. Hidrologia

A temperatura e salinidade constituíram os parâmetros abióticos mais determinantes na distribuição dos ictioplantones, correlacionando-se de forma bastante significativa ($p < 0,005$) com ovos e larvas de peixe. Pelo contrário, a turbidez e maré apenas foram importantes para a distribuição dos ovos de peixe. Os factores físico-químicos podem influenciar decisivamente os estados larvares dos peixes, uma vez que as larvas são meroplantónicas e, portanto, estão sujeitas a fenómenos de advecção que ocorrem num meio estruturalmente diverso (Rothschild & Rooth, 1982). Entre outras, a temperatura, a salinidade, a velocidade da corrente e a maré são variáveis estruturantes dos estuários (Bain *et al.*, 1988; Thiel *et al.*, 1995), determinando *habitats* e condicionando o comportamento dos organismos. Os organismos marinhos tendem a concentrar-se em zonas de transição, como por exemplo a termoclina, a haloclina, as frentes, a superfície ou o fundo, que possuem fortes gradientes ou propriedades específicas, escalares (*e.g.* salinidade, temperatura) ou vectoriais (*e.g.* direcção ou velocidade da corrente) (Rothschild & Rooth, 1982). Assim, a falta de mobilidade dos ovos de peixe, poderá ser responsável pela associação verificada com alguns parâmetros (designadamente a salinidade e maré) e pelos padrões de distribuição observados. Quanto às larvas de peixe, a influência da temperatura sobre a abundância larvar é referida na literatura como estando relacionada com taxas de mortalidade dependentes da temperatura (Frank & Leggett, 1985), com a ecologia das fases larvares (Turner *et al.*, 1994), com o ciclo reprodutivo dos adultos e a desova (Holmes & Henderson, 1990; Palomera & Sabatés, 1990; Palomera, 1992) ou com os ciclos de produção planctónica primária e secundária (Buskey, 1993). Pelo contrário, não se obtiveram correlações significativas entre a maré e a distribuição das larvas, sendo, no entanto, de admitir a ocorrência de estratégias de retenção, aliás como observou Ré (1994) para larvas de anchova no rio Mira. Por outro lado, a menor importância da turbidez sobre a distribuição larvar observada neste estudo poderá relacionar-se com o número reduzido de casos em

que foi possível cruzar a informação. A turbidez poderá constituir uma desvantagem para a alimentação de algumas espécies, uma vez que as larvas são predadores visuais (Houde, 1982). No entanto, as larvas podem escolher locais mais "túrbidos" como forma de se protegerem dos predadores, em virtude da menor intensidade luminosa (Cyrus & Blader, 1987).

Vários estudos têm confrontado as abundâncias dos estados larvares e parâmetros hidrológicos do meio. Heufelder *et al.* (1982) verificou que eventos de ressurgimento no Lago Michigan (EUA) reduziam a densidade de larvas de *Alosa pseudoharengus*. Aqueles autores indicam a diminuição da profundidade da termoclina, e portanto do *habitat* ocupado pelas larvas, a mortalidade por choque térmico, ou movimentos das larvas e dos adultos em desova, como os factores responsáveis pela diminuição das densidades das larvas. Crecco & Savoy (1984, 1985), Robinson & Bain (1989), Turner *et al.* (1994) e Thiel *et al.* (1995) obtiveram correlações significativas entre alguns parâmetros físico-químicos e a abundância de larvas de peixe em alguns estuários dos EUA e Alemanha. Pelo contrário, Buskey (1993) não obteve relações claras entre a abundância de micro- e mesozooplâncton e a temperatura, a salinidade ou a concentração em clorofila *a* no estuário de Nueces (Texas, EUA).

O estudo das relações entre alguns parâmetros abióticos do meio e a abundância de ictioplactontes parece mais simples no caso dos ovos, em virtude sua incapacidade de contrapor os movimentos das massas de água em que se encontram, do que nas larvas que apresentam alguma capacidade de activamente se deslocarem em função de uma série de factores. Isso mesmo verificaram Ross *et al.* (1993) quando avaliaram o ajuste de um índice de adequação do *habitat* (Stier & Crance, 1985 *in* Ross *et al.*, 1993) à distribuição de ovos e larvas de *Alosa sapidissima* no rio Delaware (EUA).

5.2.2. Presas potenciais

A ocorrência simultânea de ovos de peixe e de *nauplii* de copépodes, de copepoditos, de *nauplii* de cirrípedes e de decápodes, indicada pelas correlações positivas obtidas neste estudo, poderá estar relacionada com a falta de mobilidade dos organismos e, conseqüentemente, com a dificuldade em contrapor os

movimentos das massas de água. No caso em que a abundância das larvas de peixe e microzooplantontes se correlacionaram significativamente, estes corresponderam aos *taxa* descritos na literatura como presas de larvas de peixe, e.g. *nauplii* de copépodes, copepoditos, larvas de bivalves, gastrópodes, *nauplii* de cirrípedes (Crecco & Blake, 1983; Conway *et al.*, 1991; Ferreira & Ré, 1993; Chícharo, 1996). Estas relações podem resultar da busca activa pelas larvas de maiores concentrações de alimento (Hunter, 1976) que favorecem a alimentação larvar (Laurence, 1982). Com efeito, quando integradas em agregados de presas, as larvas de peixe tendem a diminuir a actividade natatória (Wyatt, 1972; Hunter & Thomas, 1974), comportamento que lhes permite permanecer nesse agregado (Wyatt, 1972). Por outro lado, os agregados de presas aumentam a probabilidade de "encontros" entre as larvas e o alimento e favorecem o sucesso alimentar, uma vez que a distância a que as presas são "percebidas" pelas larvas de peixe é reduzida [em clupeiformes, por exemplo, não excede um comprimento-padrão larvar. Blaxter & Hunter (1982)] e o volume de água que podem efectivamente procurar não excede 10 litros/dia (Houde, 1982). A concordância entre resultados da análise espacial e temporal parece confirmar a preferência das larvas de peixe por determinado *taxon* (neste caso: *nauplii* de copépodes), pois significa que as larvas efectuam migrações verticais ou horizontais em função da distribuições desse(s) *taxon(a)* e tendem, por isso, a acumular-se nos estratos em que a concentração de alimento é maior (Fortier & Leggett, 1984).

No rio James (EUA), Burbridge (1974) também obteve correlações positivas e significativas ($r=0,84$) entre a abundância de *Alosa aestivalis* (idade 0+) e de zooplanctones. Recentemente, DeVries & Stein (1992) e Stein *et al.* (1995), com base nas distribuições coincidentes de larvas e presas, introduziram o conceito de "middle-out control" para descrever a importância do clupeídeo *Dorosoma cepedianum* na regulação da comunidade zooplactónica de lagos artificiais nos EUA. Contudo, a correspondência entre as distribuições das larvas e das potenciais presas pode resultar, apenas, de mortalidade diferencial, relacionada com diferenças na disponibilidade de alimento (Hunter, 1976). Fortier & Leggett (1984), utilizando a análise de espectros, verificaram que a magnitude da co-variabilidade entre larvas e presas difere consoante as espécies, profundidades, dimensão das larvas e escala espacio-temporal considerada. Sinclair & Iles (1985) e Taggart & Leggett (1987)

referem distribuições espaciais e temporais independentes entre larvas de *Clupea harengus* e *Mallotus villosus* e de potenciais presas planctónicas. Purcell & Grover (1990) minimizaram a importância da disponibilidade de alimento sobre a mortalidade larvar de *C. harengus*. Recentemente, Hugie & Dill (1994) desenvolveram um modelo de selecção de *habitats* e verificaram que os predadores parecem distribuir-se em função da produtividade de determinados locais e não em função da distribuição de potenciais presas.

De acordo com Fortier & Leggett (1984), o estudo das relações entre larvas de peixe e presas potenciais através de correlação simples não é suficiente para isolar os factores que as determinam. Neste estudo, pretendia-se obter informação complementar acerca das relações larvas de peixe/presas sem prejuízo da análise de condição nutricional (ver Secção 5.4.3.) pelo que se optou por uma análise de correlação preliminar. Por outro lado, Frank (1988) aponta os enviesamentos da amostragem de alguns dos trabalhos mencionados, que podem mascarar eventuais relações biológicas, designadamente a utilização duma única rede de colheita para amostrar micro- e ictioplâncton. No presente trabalho, a colheita de amostras foi realizada com redes diferentes consoante a fracção-alvo do zooplâncton (*cf.* Secção 3.1.), de modo a minimizar a influência dos erros referidos por aquele autor.

5.2.3. Potenciais predadores/competidores

As relações entre os ictioplanctontes e os grupos de predadores potenciais variaram de grau de ajuste e significância consoante os *taxa* considerados e a estratégia de amostragem. A abundância dos ictioplanctontes correlacionou-se com um conjunto de *taxa* referidos na literatura como predadores de ovos e larvas de peixe *e.g.* medusas, ctenóforos, quetognatos, copépodes, misidáceos, eufasiáceos, anfípodes, decápodes, apendiculários, e larvas de peixes planctívoros (Hunter & Kimbrell, 1980; Frank & Leggett, 1985; Bailey & Houde, 1989; Matsakis & Conover, 1991; Pepin *et al.*, 1992; Bamstedt *et al.*, 1994; Margonski & Horbowa, 1994, 1995, 1996). Destes grupos, as larvas de peixe correlacionaram-se mais significativamente com os quetognatos, misidáceos e apendiculários ($r > 0,50$) na estratégia espacial e com os cladóceros, ostrácodes, decápodes (*zoea/mysis*), apendiculários e larvas de outras espécies de peixe ($r > 0,50$) na estratégia nictemeral. A ocorrência simultânea de

larvas e predadores potenciais, indicada pela maioria de correlações positivas, poderá constituir uma vantagem trófica dos predadores relacionada com o potencial aumento da eficiência predadora sobre as larvas de peixe (Frank & Leggett, 1982; Purcell & Grover, 1990). No entanto, alguns autores (*e.g.* Moller, 1984, 1985; Suthers & Frank, 1990) basearam-se nas relações inversas da dinâmica populacional de larvas de peixe e de crustáceos, de medusas e de ctenóforos, para evidenciar o potencial predador destes *taxa*. Frank & Leggett (1985) criticam a evidência das correlações negativas se não forem considerados outros factores abióticos e referem que as relações inversas podem, apenas, reflectir respostas adaptativas das larvas ou dos adultos a padrões históricos de predação. Por outro lado, as correlações entre as abundâncias de larvas e predadores podem reflectir padrões semelhantes de busca de alimento, comum aos dois grupos (Baier & Purcell, 1997) ou comensalismo (Brodeur, 1998). Em algumas amostras formolizadas, foi possível observar casos de medusas a alimentarem-se de ovos e larvas de peixe, aliás como referem Moller (1984) ou Veer (1985), contudo não é possível excluir a hipótese de terem ocorrido no copo colector com a amostra particularmente condensada.

As medusas e os quetognatos têm sido considerados como os principais agentes reguladores das comunidades zooplanctónicas em vários ecossistemas (Peterman & Gatto, 1978; Moller, 1984, 1985; Frank & Leggett, 1985; Purcell, 1990; Purcell & Grover, 1990; Matsakis & Conover, 1991; Bamstedt *et al.*, 1994; Margonski & Horbowa, 1994, 1995, 1996; Schneider & Behrends, 1994; Baier & Purcell, 1997; Brodeur, 1998) e situações experimentais (Kuhlmann, 1977; Gamble & Hay, 1989). A referência a outros grupos de predadores é bastante menos comum e diz respeito a crustáceos (Moller, 1984, 1985) e peixes planctívoros (Pepin *et al.*, 1992; Pepin & Shears, 1995). Neste trabalho, não foi possível obter coeficientes de correlação elevados ($r \leq 0,40$) para as relações entre as distribuições de abundância de hidromedusas e larvas de peixe como seria de esperar relativamente a outros zooplanctontes, tendo em consideração o que vem referido na literatura e as densidades apreciáveis observadas em algumas estações no rio Mira. A ocorrência massiva, e por vezes exclusiva, de hidromedusas em algumas colheitas, originou a rápida colmatação da rede e contribuiu para a subestimação dos restantes zooplanctontes, desse modo reduzindo o número de correlações significativas.

5.2.4. Modelos empíricos

A temperatura e salinidade constituíram os parâmetros hidrológicos mais determinantes na distribuição, tanto espacial como nictemeral, da generalidade dos ictioplanctontes (cf. TABELA 9), integrando a maioria dos modelos de regressão obtidos. Contudo, no caso dos ovos de clupeiformes, a sua variação nictemeral no rio Mira dependeu, em parte, da maré. No caso dos ovos de sardinha, a temperatura influenciou positivamente a abundância, enquanto a densidade dos ovos de anchova foi influenciada negativamente, aliás como discutido anteriormente.

A maioria dos *taxa* envolvidos nas equações obtidas neste estudo para explicar a abundância dos ictioplanctontes correspondem a grupos de predadores potenciais (cf. TABELA 9). Estes resultados sugerem que a predação constitui o factor de maior importância na explicação da distribuição dos ovos e das larvas dos peixes, em conjunto com alguns parâmetros hidrológicos, e que poderá constituir a principal causa de mortalidade larvar. No entanto, será necessário considerar, por um lado, a similaridade entre metodologias de colheita das larvas e dos predadores potenciais e, por outro, que as correlações entre a abundância das larvas e dos predadores poderão reflectir estratégias de predação sobre presas comuns.

Dos grupos taxonómicos referidos na literatura como os mais importantes predadores potenciais de larvas de peixe, as hidromedusas não integraram os modelos de regressão calculados neste trabalho, apesar de constituírem um grupo bastante representativo do mesozoplâncton, especialmente no rio Mira. A maioria das hidromedusas colhidas no rio Mira encontrava-se no intervalo de dimensão 2 - 5 cm, pelo que o seu impacto sobre o plâncton deverá ser considerado. De acordo com Schneider & Behrends (1994), apenas as hidromedusas com <8 cm consomem larvas de peixe. Contudo, a ocorrência daquele *taxon* e de larvas de peixe poderá ser mutuamente exclusiva, *i.e.* podem reflectir respostas adaptativas das larvas que evitam concentrações de predadores, ou dos adultos a padrões históricos de predação, procurando locais de desova sujeitos a um menor impacto dos predadores (Frank & Leggett, 1985). Por outro lado, a rápida colmatação da rede durante as colheitas poderá originar subestimação dos resultados referentes aos restantes *taxa* zooplanctónicos.

5.3. Comparação de metodologias de quantificação dos ácidos nucleicos

Este estudo reforça a ideia de que as razões RNA/DNA calculadas para larvas individualmente variam com o método de extracção e de quantificação usado. Sem meios que permitam determinar qual dos procedimentos laboratoriais de quantificação dos ácidos nucleicos é o mais adequado e correcto, é importante estimar parâmetros de intercalibração que possibilitem comparar os resultados entre laboratórios e técnicas.

A percentagem de recuperação dos ácidos nucleicos após purificação dos homogeneizados pelo método de Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chícharo (1996) (CC) foi menor do que os resultados publicados por outros autores (Clemmesen, 1993; Canino & Caldarone, 1995; Chícharo, 1998; Chícharo *et al.*, 1998a). A purificação dos ácidos nucleicos proposta por Clemmesen (1988, 1993) pode: 1) originar a perda de DNA e RNA (Caldarone & Buckley, 1991; Canino & Caldarone, 1995), no caso do RNA possivelmente devido ao menor peso molecular (Clemmesen, 1993); 2) conduzir à contaminação do homogeneizado pelos solventes orgânicos utilizados (Grémare & Vétion, 1994); ou 3) resultar de actividade variável da ribonuclease (RNase). No caso do procedimento proposto por Caldarone & Buckley (1991) (CB), as percentagens de recuperação de RNA e DNA, assim como os coeficientes de variação associados às determinações, encontram-se no intervalo de valores referidos na literatura para aquele método (Canino & Caldarone, 1991; Wagner *et al.*, 1998). Pelo contrário, os coeficientes de variação associados às determinações através de CC foram maiores do que os valores referidos por Clemmesen (1988, 1993), Chícharo (1997, 1998) e Chícharo *et al.* (1998a, b). A temperatura ambiente não deverá ter afectado os resultados ou os coeficientes de variação obtidos, pois as análises foram realizadas em ambientes de temperatura controlada ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) como refere Caldarone & Buckley (1991). Os limites de detecção da técnica encontram-se entre os valores publicados na literatura (Clemmesen, 1987b, 1988; Caldarone & Buckley, 1991; Canino & Caldarone, 1995; Chícharo *et al.*, 1998a).

Os dois métodos estudados produziram resultados similares de Log(DNA) mas diferentes de Log(RNA) e Log(RNA/DNA). Se, por um lado, a actividade da RNase poderá ser responsável pelas diferenças obtidas entre métodos apenas para o RNA (e

por conseguinte para a relação RNA/DNA), por outro, a purificação dos homogeneizados poderá originar, por um lado, a perda de RNA, em virtude do seu menor peso molecular ou, por outro, a contaminação do homogeneizado (aumentando a fluorescência). O ajuste das metodologias às famílias estudadas variou com a população larvar (factor *Bacia x Família*), possivelmente em resposta à dimensão e fase ontogénica das larvas analisadas. McGurk & Kusser (1992) analisaram as diferenças entre as concentrações em ácidos nucleicos e razões RNA/DNA obtidas por três métodos fluorimétricos. Estes autores também obtiveram diferenças significativas entre o conteúdo em RNA, [RNA], e a razão RNA/DNA, que atribuíram à interferência de outros compostos nos procedimentos analíticos. De acordo com aqueles autores, estes compostos poderão ter: 1) absorvido parte da fluorescência; 2) contribuído para a fluorescência residual; ou 3) inibido a cinética da RNase. Mathers *et al.* (1994) compararam os métodos de Munro & Fleck (1966) e Clemmesen (1988) para a quantificação dos ácidos nucleicos (AN) e apenas obtiveram diferenças nas conteúdos em RNA em larvas com peso seco (PS) inferior a 200 µg. Para larvas com PS entre 200 - 800 µg, a modificação do método que introduziram resolveu as dificuldades referidas por Buckley (1984) para a quantificação de AN em larvas com PS inferior a 800 µg PS. As diferenças significativas entre [RNA], [DNA] e RNA/DNA observadas por Grémare & Vétion (1994), quando compararam sete métodos espectrofluorimétricos mostraram que: i) é absolutamente necessária a presença de um detergente na solução-tampão usada na homogeneização das larvas e na extracção dos ácidos nucleicos; ii) é essencial centrifugar os homogeneizados; e iii) existem vários problemas associados à purificação dos ácidos nucleicos com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, designadamente, a influência sobre a linearidade da resposta dos fluóforos. Aqueles autores propõem um protocolo alternativo, que incorpora estas recomendações. Recentemente, Chícharo (1996) comparou duas técnicas de determinação de ácidos nucleicos, espectrofotométrica de Schmidt & Tannhauser (1945) e fluorimétrica de Clemmesen (1988, 1990), para larvas de *Sardina pilchardus* e não obteve diferenças significativas nas concentrações de DNA e RNA, e nas relações RNA/DNA.

A comparação das concentrações em ácidos nucleicos e a intercalibração das metodologias através da análise de regressão linear providenciaram uma base razoável para a comparação, embora se tenham registado diferenças entre resultados.

Contudo, obtiveram-se modelos que, explicando uma parte da variabilidade, permitem transformar os resultados (*cf.* FIGURAS). Canino & Caldarone (1995) compararam um método automatizado de análise espectrofluorimétrica (FIA) com um procedimento modificado da espectrofluorimetria convencional (CFA) através de análise de regressão funcional (Tipo II), e obtiveram valores de correlação superiores. Inesperadamente, aqueles autores obtiveram melhores ajustes para [RNA], que foi indirectamente determinado a partir de [DNA+RNA] e [DNA]. McGurk & Kusser (1992), Grémare & Vétion (1994) e Mathers *et al.* (1994) descriminaram diferenças entre métodos mas não apresentam parâmetros para a intercalibração de resultados.

Embora seja necessário utilizar factores de correção para comparar os resultados obtidos pelos dois métodos testados, ambos os protocolos parecem produzir valores biologicamente aceitáveis. Os métodos fluorimétricos mais sensíveis (*e.g.* Clemmesen, 1993) requerem maior atenção do operador e procedimentos de extracção mais morosos, restringindo desse modo o número de amostras que podem ser processadas durante um dia (Canino & Caldarone, 1995). No entanto, o protocolo de Clemmesen (1988, 1993) é utilizado regularmente em muitos laboratórios. Os métodos relativamente mais simples (*e.g.* Caldarone & Buckley, 1991) permitem, por um lado, analisar mais rapidamente os conteúdos em RNA e DNA de larvas de peixes, com grau razoável de sensibilidade, e recuperar os otólitos para posterior estudo da idade e crescimento, e por outro, eliminam a purificação dos homogeneizados e facilitam a análise de um maior número de larvas de peixes capturadas *in situ* (até um máximo de 100 larvas/dia).

Diferentes metodologias podem produzir diferentes resultados, impossibilitando a comparação directa de estimativas. A standardização e intercalibração dos procedimentos analíticos tem sido encorajada (Clemmesen, 1993). Vários autores têm comparado metodologias de extração e quantificação de ácidos nucleicos (McGurk & Kusser, 1992; Grémare & Vétion, 1994; Canino & Caldarone, 1995; Chicharo, 1996) e obtido diferenças significativas. Contudo a maioria não apresenta factores de correção dos resultados. Neste trabalho, apresentam-se equações para a intercalibração de resultados entre métodos. A comparação entre metodologias ao nível específico, reduzirá o intervalo de concentrações em ácidos nucleicos e poderá confirmar os resultados obtidos neste estudo para os clupeídeos, blenídeos, gobídeos e aterinídeos dos rios Mira e Guadiana.

5.4. Condição nutricional das larvas de peixe *vs.* parâmetros hidrológicos e biológicos

5.4.1. Índices de Condição

De modo a descrever a condição nutricional de larvas de peixe, utilizaram-se índices compostos, elaborados a partir das concentrações em ácidos nucleicos e proteínas, RNA/DNA, PROT/DNA, PROT/RNA ou Gpi. A simples quantificação de macromoléculas, *e.g.* DNA/larva ou RNA/larva, não parecem adequadas para comparações entre o estado nutricional de larvas com dimensões diferentes (Chícharo, 1996), uma vez que se verificou existirem relações (exponenciais ou lineares) entre aquelas quantidades e o comprimento-padrão das larvas. A resposta dos vários índices de condição calculados variou consoante as macromoléculas consideradas, contudo a maioria correlacionou-se significativamente entre si. As correlações são mais fortes quando se compararam índices calculados a partir de informação obtida com métodos similares (por exemplo RNA/DNA [CC] *vs.* Gpi ou PROT/RNA *vs.* PROT/DNA, e *vice-versa*). As diferenças encontradas entre os vários índices poderão relacionar-se com a aplicabilidade dos índices de condição a determinado *taxon* (*cf.* Secção 5.3.) ou com a resposta diferencial dos processos de síntese das várias macromoléculas às condições do meio (Suthers, 1992; Suthers *et al.*, 1992). De acordo com Robinson & Ware (1988), as larvas podem atingir a taxa máxima de crescimento para um nível não muito elevado da razão RNA/DNA.

De modo a ultrapassar a variabilidade dos resultados que obtiveram com [AN]/larva e RNA/DNA em larvas de *Solea solea* ou em virtude das diferenças nas respostas de índices mais comuns e os erros que podem incluir as metodologias de determinação de RNA/DNA, Bergeron *et al.* (1991, 1997) e Suthers *et al.* (1992) propuseram novos índices, DNA/Peso Seco, $\text{Ln}[\text{Res}(\text{RNA})+1]$ e DNA/[Carbono] respectivamente, como métodos mais fiáveis e sensíveis para determinar a condição nutricional de larvas de peixe. Contudo, e tendo em consideração os vários aspectos eco-fisiológicos discutidos, a utilização da razão RNA/DNA, como sugerem Clemmesen (1988, 1993) e Chícharo (1996), permite a comparação com um número apreciável de trabalhos publicados sobre as espécies em questão e outras afins. Por

outro lado, a metodologia empregue neste estudo possibilita o cálculo de índices complementares por forma a estudar aspectos particulares da resposta fisiológica das larvas às condições do meio.

A análise individual das larvas de peixe permitiu recolher, para um mesmo indivíduo, informação relativa a vários índices bioquímicos, possibilitando analisar a sua variabilidade e comparar a sua resposta às condições observadas no meio, bem como estudar os diferentes aspectos do impacto das condições ambientais e biológicas através de índices que equacionam outras variáveis (e.g. PROT/[AN]).

5.4.2. Condição nutricional larvar

O número de larvas de clupeiformes (<60 ind.) e restantes famílias (~350 ind.) analisadas impõem a consideração dos resultados como aproximativos. Quando comparáveis, os valores de concentração em ácidos nucleicos, proteínas e razões RNA/DNA obtidos para os clupeiformes encontram-se no intervalo de valores publicados para *Sardina* sp. (Chícharo, 1996, 1997, 1998; Chícharo *et al.*, 1998a, b), para *Engraulis* sp. (Garcia *et al.*, 1998) e *Clupea* spp. (Buckley, 1984; Robinson & Ware, 1988; Clemmesen, 1989, 1994; McGurk & Kusser, 1992; McGurk *et al.*, 1992). Quanto aos blenídeos, gobiídeos e aterinídeos, o presente trabalho constitui a primeira referência conhecida para estudos da análise da condição nutricional baseada nos conteúdos em RNA e DNA. A concentração em ácidos nucleicos, proteínas e índices de condição proteínas/ácidos nucleicos parecem aumentar com o comprimento-padrão, aliás como referem Buckley (1984), Robinson & Ware (1988), Shimizu *et al.* (1989), McGurk & Kusser (1992), McGurk *et al.* (1992), Chícharo (1996), Chícharo *et al.* (1998b) e Garcia *et al.* (1998) para clupeiformes, ou Canino *et al.* (1991), Bailey *et al.* (1995), Rooker & Holt (1996) e Suthers *et al.* (1996) para outras espécies de peixe. Os tipos de equações encontrados para as relações com o comprimento estarão, concerteza, relacionados com estratégias específicas de crescimento das espécies estudadas e reforçam a relação entre a concentração das macromoléculas e a dimensão das larvas. A correlação generalizada entre os índices do tipo proteínas/ácidos nucleicos e o comprimento-padrão coloca algumas reservas à sua utilização para a comparação da condição nutricional de larvas de comprimentos diferentes.

Os valores obtidos para a percentagem de larvas em inanição encontram-se dentro do intervalo referido na literatura para larvas de clupeiformes (Robinson & Ware, 1988; Clemmesen, 1989, 1994; McGurk *et al.*, 1992; Mathers *et al.*, 1994; Chícharo, 1996, 1997, 1998; Chícharo *et al.*, 1998a, b) e para outras espécies (Buckley, 1984; Buckley & Lough, 1987; McGurk *et al.*, 1992). As diferenças entre os resultados obtidos e os valores publicados por outros autores poderão relacionar-se com a influência de factores como a temperatura ou a abundância relativa de algumas presas e predadores potenciais, que têm sido apontados como determinantes para a condição nutricional de larvas de peixe (Lasker, 1975; Buckley, 1982; Robinson & Ware, 1988; Canino *et al.*, 1991; Pepin, 1991; Mathers *et al.*, 1993; Chícharo, 1996). Curiosamente, as maiores percentagens de larvas de clupeídeos e blenídeos em estado de inanição no rio Mira estão associadas a maiores densidades de microzooplantontes, *i.e.* apesar da maior disponibilidade de alimento as larvas encontram-se em piores condições. A ocorrência de larvas em estado de inanição poderá indicar a presença de larvas "anormais", que respondem à disponibilidade de alimento de forma variável (em função do desenvolvimento ontogénico das capacidades natatórias e sensoriais) ou que não conseguiram aproveitar a quantidade de alimento disponível (McGurk *et al.*, 1992). Não obstante, estes resultados poderão reflectir o impacto da predação sobre as população larvares, designadamente por remoção das larvas em piores condições. Com efeito, a densidade de predadores potenciais foi relativamente superior no rio Mira (*cf.* Secção 4.1.), assim como se verificou existirem relações de causa-efeito entre a distribuição e condição das larvas de peixe e a densidade de alguns *taxa* de predadores (*cf.* Secções 4.2.4 e 4.6., respectivamente). Por outro lado, as menores percentagens de inanição parecem corresponder a valores de temperatura mais elevados, designadamente para clupeídeos e gobídeos. A temperatura é um dos parâmetros que influencia a distribuição e a condição nutricional das larvas, e neste trabalho integrou modelos de regressão (*cf.* Secção 4.6.). Em alguns casos, designadamente nos blenídeos, as dimensões reduzidas das larvas poderão ser responsáveis pelas maiores percentagens de larvas em estado de inanição relativamente às restantes famílias, uma vez que os limites de detecção dos protocolos de extracção e quantificação dos ácidos nucleicos poderão ser demasiado elevados.

A influência daqueles factores sobre o metabolismo das larvas, e designadamente sobre a actividade do RNA e síntese proteica (ver Bergeron, 1997), impõem algumas reservas à comparação directa entre percentagens de larvas em processo de inanição obtidas a partir da razão RNA/DNA. Assim, utilizou-se um índice composto, Gpi, que afere os resultados da análise bioquímica (RNA/DNA) e da temperatura, e que indirectamente indica o "nível crítico" de sobrevivência (Buckley, 1984; Robinson & Ware, 1988). Os valores médios de Gpi obtidos neste trabalho variaram entre $10,27 \pm 7,10$ %/dia em blenídeos do rio Mira e $46,01 \pm 43,11$ %/dia em clupeídeos do rio Guadiana e encontram-se no intervalo de valores referidos na literatura (Buckley, 1984; Robinson & Ware, 1988; McGurk & Kusser, 1992; Chícharo 1996; Chícharo *et al.*, 1998b). A variabilidade encontrada deverá estar relacionada com a influência das condições etremas que por vezes ocorrem em meio natural (Chícharo, 1996). Por outro lado, e de acordo com Pepin (1989), o aumento da variabilidade da taxa de crescimento proteico resulta do incremento do alimento. Neste contexto, parece confirmar-se a importância relativa da disponibilidade de alimento na determinação da condição nutricional larvar. Comparativamente, os valores obtidos para *Sardina* sp. colhidas no estuário do rio Guadiana são superiores aos referidos por Chícharo (1996) para larvas amostradas ao largo da foz do rio Guadiana em 1992. As condições potencialmente favoráveis ao desenvolvimento das larvas que se verificam no estuário do rio Guadiana, e que têm sido consideradas como responsáveis pela escolha dos estuários como zonas de *nursery* (e.g. Cabral, 1998), poderão explicar as diferenças encontradas.

Quando comparáveis, as percentagens de larvas de peixe em estado de inanição, quando se considerou $Gpi \leq 0$, são relativamente semelhantes aos referidos por McGurk *et al.* (1992) para larvas de *Clupea* e *Ammodytes* e por Chícharo *et al.* (1998b) para larvas de *Sardina*. No entanto, os resultados da análise da percentagem de larvas em estado de inanição através do índice Gpi parecem confirmar genericamente os obtidos com RNA/DNA $< 1,3$ ou $< 1,0$. As diferenças, designadamente para os atherinídeos, poderão relacionar-se com o desajuste do valor da razão RNA/DNA igual a 1,0 como indicador de inanição, uma vez que resulta de trabalhos realizados com outras espécies (*cf.* Clemmesen, 1994). Por outro lado, verificou-se que o valor crítico da razão RNA/DNA é relativamente superior no rio

Mira, o que poderá indicar as dificuldade de sobrevivência das larvas, que exigirão condições ambientais (hidrológicas e biológicas) mais favoráveis.

5.4.3. *Condição nutricional vs. parâmetros abióticos e bióticos*

A temperatura foi o único parâmetro hidrológico estudado que se correlacionou com a condição nutricional larvar. A temperatura é um dos parâmetros que influenciam a distribuição e abundância das larvas (Frank & Leggett, 1985; Holmes & Henderson, 1990; Palomera & Sabatés, 1990; Palomera, 1992; Buskey, 1993; Turner *et al.*, 1994) e regula as taxas de crescimento e mortalidade das larvas de peixe (Crecco & Savoy, 1984; Houde, 1989; Palomera & Leonart, 1989; Battini *et al.*, 1995). As correlações com a temperatura, geralmente negativas, poderão estar associadas à diminuição da actividade dos ribossomas quando a temperatura diminui, pelo que é necessária uma maior concentração de RNA para assegurar o mesmo nível de actividade (Bulow, 1987) enquanto que o conteúdo em DNA, [DNA], se mantém estável. Pelo contrário, McGurk *et al.* (1992) verificaram-se não existirem relações entre a razão RNA/DNA e as condições ambientais do meio.

Por outro lado, a maioria das variáveis que integraram os modelos empíricos obtidos são indicadores da abundância de presas potenciais. Estes resultados, indicam uma relação mais próxima entre a alimentação e a condição nutricional das larvas de peixes. A quantidade e disponibilidade de alimento disponível têm sido referidas na literatura como condicionantes da sobrevivência, da condição nutricional e do crescimento larvar (Buckley, 1979; Buckley *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1985; Setzler-Hamilton *et al.*, 1987; Canino *et al.*, 1991; Canino, 1994; Bailey *et al.*, 1995; Battini *et al.*, 1995; Bergeron, 1997). A determinação da densidade de presas potenciais necessita, entre outros aspectos, do conhecimento prévio do tipo de organismos que as larvas ingerem, o que permitirá a sua quantificação no meio natural (Chícharo, 1996). Neste trabalho, utilizaram-se, entre outros, os trabalhos de Hunter (1981), Blaxter *et al.* (1982), Crecco & Blake (1983), Ferreira & Ré (1993), Chícharo (1996) e Pepin & Penney (1997) para estabelecer uma metodologia de recolha compatível (*cf.* Secção 3.1.). Potencialmente, o volume de água filtrado poderia: 1) não conter número suficiente de organismos, situação que ocorreu poucas vezes; ou 2) não representar a distribuição "real" dos microzooplancantes, "erro" que

poderia ser ultrapassado com a amostragem integrada da coluna de água. Frank (1988) afirma que a realização de arrastos com a integração de toda a coluna de água obscurece a existência de micro-agregados com elevadas densidades de presas. No entanto, pretendia-se obter informação complementar à análise de condição que permitisse estimar a densidade "potencial" do alimento. Por outro lado, as correlações significativas e os modelos matemáticos obtidos parecem confirmar que a metodologia escolhida para a colheita e análise do microzooplâncton se adequou aos objectivos do presente trabalho, e quantificou a disponibilidade de alimento para as larvas de peixe. Uma outra questão relacionada com o estudo da inanição em meio natural, é a determinação da densidade de presas necessária para assegurar a sobrevivência das larvas. Vários autores têm abordado esta questão laboratorialmente e têm verificado que as densidades limitantes para a sobrevivência das larvas de peixe são superiores às registadas em meio natural. A distribuição agregada das presas (Valiela, 1995), não reflectida pela densidade média e com CV ~100% (e.g. Buckley & Lough, 1987), e o comportamento condicionado das larvas quando integradas naqueles agregados (Wyatt, 1972; Hunter & Thomas, 1974; Frank & Leggett, 1985), poderão explicar a discrepância entre os resultados obtidos no laboratório e *in situ*.

Por fim, algumas variáveis relacionadas com a abundância de predadores explicaram parte da variabilidade da condição nutricional das larvas de peixes. Nestes casos, os predadores poderão remover as larvas em piores condições, *i.e.* com reduzida capacidade de fuga, ou superar as larvas na competição por itens alimentares comuns, e, por conseguinte, acelerar o processo de inanição e morte das larvas de peixe. São escassos os trabalhos sobre larvas de peixe que dediquem simultaneamente alguma atenção aos potenciais predadores (Bailey & Houde, 1987). A influência das condições experimentais (Peterson & Black, 1994) e a dificuldade em estudar *in situ* a mortalidade por predação, uma vez que predadores de vários *taxa* podem actuar sobre as larvas e podem não ser capturados pelo(s) método(s) de colheita usado(s), constituem as críticas mais frequentes às experiências de predação em situações controladas. Estes argumentos, têm incentivado a implementação de métodos indirectos com base na diferença entre a mortalidade total e a mortalidade por inanição. Estes métodos presupõem que as outras fontes de mortalidade são desprezáveis (Hewitt *et al.*, 1985) ou que se podem subtrair as perdas por dispersão

(Fortier & Leggett, 1985). Por outro lado, Frank & Leggett (1985) constestam as metodologias baseadas na recoha simultânea de larvas e predadores, alegando que a estratégia de postura da maioria das espécie de peixe evita zonas de elevadas abundâncias de predadores. Neste trabalho, a ocorrência massiva e praticamente exclusiva de hidromedusas no rio Mira poderá constituir um exemplo desta estratégia. No entanto, obtiveram-se correlações entre as distribuições de alguns predadores potenciais e das larvas de peixe, assim como, se integraram algumas variáveis relacionadas com a abundância de predadores nos modelos empíricos que pretendiam explicar a variabilidade da condição nutricional.

Buckley *et al.* (1984) apresentam uma série de equações que relacionam alguns índices de condição nutricional (RNA/DNA e Gpi) de larvas de *Ammodytes americanus* cultivadas laboratorialmente com a temperatura, a idade de larvas e a densidade de planctontes. McGurk *et al.* (1992) verificaram que a influência da concentração de presas na variação da razão RNA/DNA era marginal ou inexistente, e que possivelmente a predação constituiria um factor adicional (com carácter sazonal) que explicava a variabilidade da razão RNA/DNA. Chícharo (1996) obteve relações significativas entre a condição nutricional e alguns parâmetros ambientais e biológicos, designadamente a temperatura, a velocidade do vento, e as densidades de *nauplii* de crustáceos e de quetognatos. Contudo, aquela autora apresenta um modelo final polinomial que integra a temperatura e a densidade de quetognatos ($r^2=0,81$, $n=17$, $p<0,001$). Pelo contrário, Canino (1997) não obteve relações significativas entre índices de condição e densidades de presas num estudo realizado no Alasca (EUA) sobre larvas de *Theragra chalcogramma*. No presente trabalho, a variabilidade da condição nutricional da condição nutricional larvar parece relacionada principalmente com parâmetros indicadores da abundância de presas potenciais, integrando modelos matemáticos que explicaram $\leq 95\%$ da variância da razão RNA/DNA.

5.4.4. Comparação entre bacias

Neste trabalho, as diferenças relativas entre os valores da temperatura e das densidades de presas e de predadores entre rios, poderão explicar as diferentes percentagens de inanição. Em algumas famílias, como por exemplo nos clupeídeos, a

dependência da condição nutricional da disponibilidade alimentar reflecte-se na maior percentagem de inanição observada no rio Mira, em que a abundância de microzooplâncton é menor. Noutros casos (*e.g.* blenídeos ou gobídeos), a relação da condição das larvas com a abundância de predadores poderá explicar as maiores percentagens de larvas em inanição verificadas no rio Guadiana. Os predadores poderão eliminar as larvas em piores condições ou impedir a sua alimentação, quando competem pelo mesmo alimento, contribuindo para aumentar a condição nutricional média das populações larvares. No entanto, apenas se obtiveram diferenças significativas entre valores médios da razão RNA/DNA para gobídeos. Neste estudo, verificou-se que o período do dia (factor *Noite/Dia*, $p=0,49$) e o *taxon* (factor *Família*, $p<0,01$) influenciou a razão RNA/DNA das larvas de peixe. As diferenças entre noite e dia na razão RNA/DNA poderão relacionar-se com variações circadianas da condição nutricional das larvas. A periodicidade da actividade endócrina (Bates *et al.*, 1989), que através de hormonas de crescimento específicas influencia a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Weatherley & Gill, 1987), será responsável por ritmos circadianos observados para aqueles índices (Rooker & Holt, 1996). Buckley & Lough (1987) também obtiveram diferenças significativas entre noite e dia (com valores superiores durante o dia) nos valores da razão RNA/DNA de larvas de *Melanogrammus aeglefinus* e *Gadus morhua* colhidas no Banco Georges (América do Norte). Recentemente, Rooker & Holt (1996) verificaram existirem diferenças circadianas na condição nutricional (RNA/DNA) de larvas cultivadas de *Sciaenops ocellatus* que não dependiam da temperatura. Por outro lado, a interação entre factores, designadamente *Bacia x Família* e *Noite/Dia x Família*, mostram a importância das características populacionais dos *taxa* estudados sobre a condição nutricional larvar. Será necessário considerar, por um lado, a aplicabilidade dos protocolos a cada família para a determinação dos ácidos nucleicos (*cf.* Secção 3.1.) e, por outro, a resposta fisiológica distinta das populações larvares às diferentes condições hidrológicas e biológicas dos rios estudados.

Os vários índices de condição determinados neste trabalho parecem indicar diferentes respostas das larvas às condições do meio. As diferenças entre as bacias dos valores médios das razões RNA/DNA e PROT/[ácidos nucleicos], de gobídeos e clupeídeos respectivamente, poderão estar relacionados com o impacto distinto da disponibilidade de alimento e da abundância de predadores sobre a condição

nutricional larvar. As razões RNA/DNA de gobídeos e clupeídeos, independentemente do método usado para determinar os ácidos nucleicos, parecem indicar larvas em melhores condições no rio Guadiana. A disponibilidade de alimento similar ($4,37 \times 10^6$ presas/100m³ vs. $4,25 \times 10^6$ presas/100m³) e a menor densidade de predadores ($5,59 \times 10^5$ ind./100m³ vs. $2,52 \times 10^5$ ind./100m³) relativamente ao rio Mira, e as correlações observadas entre a densidade de presas e a condição nutricional das larvas e entre a predação e a abundância ictioplanctónica (cf. Secção 4.6.), poderão explicar os resultados obtidos. Contudo, a variabilidade dos resultados, designadamente das razões PROT/[ácidos nucleicos], poderá, por um lado, mascarar a influencia dos vários factores estudados sobre a condição nutricional larvar e, por outro, impedir a utilização daqueles índices para comparações entre populações larvares (Bergeron & Boulhic, 1994). Assim, a condição das larvas de peixe parece depender da disponibilidade de presas, aliás como também verificaram Buckley *et al.* (1984), Wright & Martin (1985), Bailey *et al.* (1995) ou Canino (1997), sendo, no entanto, controlada pela predação, através da sua acção sobre a mortalidade larvar, como sugerem Laurence (1982), Frank (1988), Bailey & Houde (1989) e Matsuura & Hewitt (1995).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os parâmetros hidrológicos diferiram entre rios, especialmente quando se compararam as variações circadianas da temperatura e salinidade. Nestes casos, os valores no rio Guadiana são bastante mais variáveis. As dimensões relativas do rio Guadiana e a maior influencia da maré poderão explicar os resultados obtidos.
- As comunidades zooplanctónicas são substancialmente diferentes entre os rios. Os *nauplii* de copépodes dominaram a fracção microzooplantónica, tanto espacial como nictemeralmente. Os copepoditos, no rio Mira, e as larvas de bivalves, no rio Guadiana, constituíram os grupos complementares mais importantes. Por outro lado, os hidrozoários e os misidáceos, no rio Mira, e os copépodes e os cladóceros, no rio Guadiana, dominaram a fracção mesozoplantónica em termos espaciais. Nictemeralmente, os decápodes (*nauplii*, *zoea/mysis*) e os copépodes foram os grupos mais importantes no rio Mira, enquanto no rio Guadiana, os cladóceros e as fases *zoea/mysis* de decápodes constituíram os *taxa* mais abundantes.
- Os ovos e larvas de peixe foram relativamente pouco comuns. Os estados larvares ocorreram geralmente em densidades inferiores a 100 ind./100m³, excepto nos ciclos de e ocorreram de forma diferente à descrita na literatura. A distribuição espacial e nictemeral dos ictioplanctontes pare reflectir, por um lado, o comportamento reprodutivo dos adultos e, por outro, a influencia de factores hidrológicos. A anchova, os gobídeos e os blenídeos parecem incluir-se no primeiro grupo, enquanto os clupeídeos integraram o segundo.
- Entre os parâmetros estudados, a temperatura e abundância de alguns *taxa* de predadores potenciais explicaram parte significativa da variabilidade da densidade ictioplanctónica ($R^2 \leq 0.88$). A temperatura constitui um factor estruturante de *habitats* e biologicamente limitante, enquanto a predação determina a mortalidade larvar.

- Os resultados da comparação de metodologias de quantificação de ácidos nucleicos confirmaram a ideia de que os valores obtidos variam com o protocolo usado. Alguns aspectos das metodologias, designadamente a interferência dos compostos utilizados para purificar os homogeneizados ou a actividade variável da ribonuclease, poderão explicar as diferenças encontradas. Por outro lado, verificou-se que os métodos se aplicam de modo diferente às populações larvares estudadas. No entanto, calcularam-se equações para intercalibração de resultados entre técnicas. Em função dos aspectos metodológicos discutidos neste estudo, o método de Caldarone & Buckley (1991) apresentou vantagens importantes (simplicidade, rapidez e maior número de larvas analisadas por período de tempo) e que aconselham a sua utilização para estudos de rotina da condição nutricional larvar.
- Os vários índices de condição calculados neste trabalho correlacionaram-se significativamente entre si. Contudo, a utilização da razão RNA/DNA permitiu comparar os resultados deste estudo com um número apreciável de trabalhos publicados. Por outro lado, a razão RNA/DNA não se correlacionou com o comprimento larvar, situação que poderia colocar reservas à sua utilização para comparar a condição nutricional de larvas de comprimentos diferentes.
- Os valores dos índices de condição dos clupeíformes encontram-se no intervalo referido na literatura. Os valores obtidos para as restantes famílias constituem os primeiros resultados referidos na literatura. A generalidade das larvas encontravam-se em boas condições nutricionais, sendo que as percentagens de larvas com RNA/DNA < 1,3 ou 1,0 não ultrapassaram 14% (11-13% nos blenídeos e < 7,1% nas restantes famílias). Os resultados da análise das percentagens de larvas em estado de inanição através de $G_{pi} < 0\%$ /dia confirmaram genericamente os referidos acima.
- A condição nutricional larvar correlacionou-se significativamente com a temperatura e com maior número de variáveis indicadores da abundância de potenciais presas relativamente aos predadores potenciais ($R^2 \leq 0.95$). A temperatura influencia o metabolismo das larvas e a disponibilidade de alimento condiciona a sobrevivência larvar.

- Apenas se obtiveram diferenças significativas entre rios nos valores médios da razão RNA/DNA para gobídeos. O número de larvas analisadas, a aplicabilidade das metodologias e o impacte distinto dos factores abióticos e bióticos estudados poderão explicar aqueles resultados. As maiores percentagens de larvas em estado de inanição ($\geq 5,6\%$) verificaram-se no rio Mira, designadamente em clupeídeos e blenídeos. Pelo contrário, os gobídeos e aterinídeos encontravam-se em piores condições no rio Guadiana ($\geq 2,9\%$). Tendo em consideração que a disponibilidade de alimento foi relativamente semelhante nos dois rios, a temperatura e abundância de predadores parecem ter sido os factores mais determinantes. A temperatura influencia a distribuição e a condição nutricional larvar, através do seu efeito sobre as taxas de crescimento e mortalidade, enquanto os predadores poderão remover as larvas em piores condições.
- Em conclusão, a distribuição das larvas de peixe parece condicionada pela temperatura e pela pressão da predação, enquanto a condição nutricional parece depender da temperatura e da disponibilidade de alimento, sendo, no entanto, controlada pela predação, através da sua acção sobre a mortalidade larvar. Os modelos empíricos obtidos para a distribuição ($R^2 \leq 0.88$) e para análise de condição larvar ($R^2 \leq 0.95$) parecem confirmar estas hipóteses.
- Os resultados deste trabalho levantaram algumas questões, que não foram completamente respondidas, e permitem perspectivar novas linhas de investigação, designadamente: 1) esclarecer as relações entre as condições ambientais e biológicas do meio e a abundância e condição nutricional dos estados larvares dos peixes; para tal, será necessário amostrar a fracção zooplanctónica (incluindo o ictioplâncton) de forma localizada e intensiva, o que permitirá, por um lado, colher um maior efectivo de larvas e, por outro, consolidar as estimativas de densidades dos ictioplanctontes; assim como obter informação acerca de outros parâmetros abióticos não considerados neste trabalho (e.g. oxigénio dissolvido, pluviosidade, caudal, poluentes); 2) estudar a médio-prazo as alterações qualitativas e quantitativas no

recrutamento das espécies com maior interesse económico resultantes das modificações climáticas inter-anuais (*e.g.* pluviosidade, caudal, temperatura).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandrino, P.J. (1995) Peixes migradores anádromos existentes nas águas continentais portuguesas. *Comunicação* apresentada no Colóquio "Gestão e Conservação da fauna piscícola das águas continentais portuguesas" - 28 de Outubro de 1995. Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa.
- Alexandrino, P.J. (1996) *Estudo de populações de sável (Alosa alosa L.) e savelha (Alosa fallax Lacépède). Análise da diferenciação interespecífica, subestruturação e hibridação.* Tese Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 187pp.
- Almeida, A.J.T. (1988) *Estrutura, dinâmica e produção da macrofauna acompanhante dos povoamentos de Zostera noltii e Zostera marina do Estuário do Rio Mira.* Tese Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 363pp.
- Almeida, P.M.R. (1996) *Biologia e ecologia de Liza ramada (Risso, 1826) e Chelon labrosus (Risso, 1826) (Pisces: Mugillidae) no estuário do Mira (Portugal). Inter-relações com o ecossistema estuarino.* Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 331pp.
- Andrade, F.A.L. (1986) *O Estuário do rio Mira: caracterização geral e análise quantitativa da estrutura dos macropovoamentos bentónicos.* Tese Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 393pp.
- Antunes, M.M., Cunha, P.L., Duarte, A.P. & Mendonça, E.P. (1988) Ria de Alvor as a spawning place and a nursery ground. *J. Fish Biol.* 33(Suppl. A): 185-190
- Aprahamian, M.W. (1988) The biology of the twaite shad, *Alosa fallax fallax* (Lacépède), in the Severn Estuary. *J. Fish Biol.* 33(Suppl. A): 141-152
- Assis, C.A. (1990) threats to the survival of anadromous fishes in the River Tagus, Portugal. *J. Fish Biol.* 37(Suppl. A): 225-226
- Baier, C.T. & Purcell, J.E. (1997) Trophic interactions of chaetognats, larval fish, and zooplankton in the South Atlantic Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146: 43-53
- Bailey, K.M. & Houde, E.D. (1989) Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. *Adv. Mar. Sci.* 25: 1-83

- Bailey, K.M., Canino, M.F., Napp, J.M., Spring, S.M. & Brown, A.L. (1995) Contrasting years of prey levels, feeding conditions and mortality of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the western Gulf of Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119: 11-23
- Bain, M.B., Finn, J.T. & Booke, H.E. (1988) Streamflow regulation and fish community structure. *Ecology* 69(2): 382-392
- Bamstedt, U., Martinussen, M.B. & Matsakis, S. (1994) Trophodynamics of the two scyphozoan jellyfishes, *Aurelia aurita* and *Cyanea capillata*, in western Norway. *ICES J. mar. Sci.* 51: 369-382
- Bates, D.J., Barrett, B.A. & Mckeown, B.A. (1989) daily variations in plasma growth hormone of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Can. J. Zool.* 67: 1246-1248
- Battini, M.A., Alonso, M.F. & Cussac, V.E. (1995) Growth and nutritional condition of the larvae of *Odontesthes microlepidotus* (Atherinidae): an experimental approach. *Env. Biol. Fish.* 42: 391-399
- Bergeron, J.-P. (1997) Nucleic acids in ichthyoplankton ecology: a review, with emphasis on recent advances for new perspectives. *J. Fish Biol.* 51(Suppl. A): 284-302
- Bergeron, J.-P. & Boulhic, M. (1994) Rapport ARN/AND et évaluation de l'état nutritionnel et de la croissance des larves de poissons marins: un essai de mise au point expérimentale chez la sole (*Solea solea* L.). *ICES J. mar. Sci.* 51: 181-190
- Bergeron, J.-P. & Person-Le Ruyet, J. (1997) Teneur en ADN de la larve de *Dicentrarchus labrax*: évolution ontogénétique et effet de la privation de nourriture. *Aquatic Living Resour.* 10: 247-250
- Bergeron, J.-P., Boulhic, M. & Galois, R. (1991) Effect de la privation de nourriture sur la teneur en ADN de la larve de sole (*Solea solea* L.). *ICES J. mar. Sci.* 48: 127-134
- Bergeron, J.-P., Person-Le Ruyet, J. & Koutsikopoulos, C. (1997) use of carbon rather than dry weight to assess the DNA content and nutritional condition index of sole larvae. *ICES J. mar. Sci.* 54: 148-151
- Blaxter, J.H.S. (1971) Feeding and condition of Clyde herring larvae. *Rapp. P. v.-Reun. Cons. Perm. int. Explor. Mer* 160: 128-136

- Blaxter, J.H.S. & Hunter, J.R. (1982) The biology of clupeoid fishes. *Adv. Mar. Biol.* 20: 1-223
- Boisneau, P., Mennesson-Boisneau, C. & Baglinière, J.L. (1990) Description d'une frayère et comportement de reproduction de la grande alose (*Alosa alosa* L.) dans le cours supérieur de la Loire. *Bull. Franc. Pêche et Piscic.* 316: 15-23
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brodeur, R.D. (1998) *In situ* observations of the association between juvenile fishes and scyphomedusae in the Bering Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 163: 11-20
- Buckley, L.J. (1979) Relationships between RNA-DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) larvae. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 36: 1497-1502
- Buckley, L.J. (1980) Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and effect of starvation. *Fish. Bull.* 77: 703-708
- Buckley, L.J. (1982) Effects of temperature on growth and biochemical composition of larval winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8: 181-186
- Buckley, L.J. (1984) RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* 80: 291-298
- Buckley, L.J. & Bulow, J.F. (1987) Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*M. aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges Bank. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 14-25
- Buckley, L.J. & Lough, R.G. (1987) Recent growth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges Bank. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 14-25
- Buckley, L.J., Turner, S.I., Halavik, T.A., Smigielski, A.S., Drew, S.M. & Laurence, G.C. (1984) Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 15: 91-97

- Buckley, L.J., Smigielski, A.S., Halavik, T.A. & Laurence, G.C. (1990) Effects of water temperature on size and biochemical composition of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* at hatching and feeding initiation. *Fish. Bull.* 88: 419-428
- Bulow, F. (1970) RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 27: 2343-2349
- Bulow, F. (1987) RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. In Summerfelt, R.C. & Hall, G.E. (eds.) Age and growth of fish. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 45-64
- Burbridge, R.G. (1974) Distribution, growth, selective feeding, and energy transformations of young-of-year blueback herring, *Alosa aestivalis* (Mitchill), in the James River, Virginia. *Trans. Am. Fish. Soc.* 2: 297-311
- Buskey, E.J. (1993) Annual pattern of micro- and mesozooplankton abundance and biomass in a subtropical estuary. *J. Plankt. Res.* 15(8): 907-924
- Cabral, H.M. (1998) Utilização do estuário do Tejo como área de viveiro pelos linguados, *Solea solea* (L., 1758) e *Solea senegalensis* Kaup, 1858, e robalo, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758). Tese Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 396pp.
- Caldarone, E.M. & Buckley, L.J. (1991) Quantitation of DNA and RNA in crude tissues extracts by flow injection analysis. *Anal. Biochem.* 199: 137-141
- Canino, M.F. (1994) Effects of temperature and food availability on growth and RNA/DNA ratios of walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) eggs and larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175: 1-16
- Canino, M.F. (1997) Nucleic acid contents and growth of first-feeding walleye pollock larvae in response to prey densities typical of sub-Artic ecosystems. *J. Fish Biol.* 51: 41-52
- Canino, M.F. & Caldarone, E.M. (1995) Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. *Fish. Bull.* 93: 158-165
- Canino, M.F., Bailey, K.M. & Incze, L.S. (1991) Temporal and geographical differences in feeding and nutritional condition of walleye pollock larvae *Theragra chalcogramma* in Shelikof Strait, Gulf of Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 27-35

- Cartaxana, A. (1994) Distribution and migrations of the prawn *Palaemon longirostris* in the Mira river Estuary (Southwest Portugal). *Estuaries* 17(3): 685-694
- Chícharo, L.M.Z. (1988) Contribuição para o estudo do ictioplâncton no estuário do Guadiana. Relatório de Estágio, Universidade do Algarve, Faro, 75pp.
- Chícharo, M.A. (1998) Nutritional condition and starvation in *Sardina pilchardus* (L.) larvae off southern Portugal compared with some environmental factors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 225: 123-137
- Chícharo, M.A. (1991) Estado nutricional em larvas de peixe. Interesse e métodos de estudo. Provas Aptidão Pedagógico-Científica, Universidade do Algarve, Faro, 137pp.
- Chícharo, M.A. (1993) Estado nutricional em larvas de peixe: análise dos ácidos nucleicos e proteínas. *Bol. UCA, U. Algarve, UCTRA*, 1: 653-669
- Chícharo, M.A. (1996) Métodos de avaliação do estado nutricional em larvas de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) aplicados ao estudo das condições de sobrevivência no meio natural. Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve, Faro, 317pp.
- Chícharo, M.A. (1997) Starvation percentages in field caught *Sardina pilchardus* larvae off southern Portugal. *Sci. Mar.* 61(4): 507-516
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., Valdez, L., López-Jamar, E. & Ré, P. (1998a) Estimation of starvation and diel variation of the RNA/DNA ratios in field-caught *Sardina pilchardus* larvae off the north of Spain. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 164: 273-283
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., Valdés, L., López-Jamar, E. & Ré, P. (1998b) Does the nutritional condition limit survival potential of sardine *Sardine pilchardus* (Walbaum, 1792) larvae off the north coast of Spain? RNA/DNA ratios and their variability. *Fish. Res.* 790: 1-12
- Chícharo, M.A., Chícharo, L.M., Marques, H., Gouveia, I., Barros, P., Esteves, E., Barbosa, A. & Galvão, H. (1998c) Diel and tidal variation of mesozooplankton in the Guadiana Estuary (South Portugal). *Eos, Trans. Am. Geophys. Union* 79(1): OS 24
- Clemmesen, C. (1987a) A highly sensitive method to determine RNA and DNA contents in individual marine fish larvae. *ICES, CM: 1987/L* 22: 14p.

- Clemmesen, C. (1987b) Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 43: 122-128
- Clemmesen, C. (1988) A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforsch.* 32: 134-143
- Clemmesen, C. (1989) RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. *J. Fish Biol.* 35(Suppl. A): 331-333
- Clemmesen, C. (1990) Improvements in the determinations of the RNA and DNA content in individual marine fish larvae. *I.C.E.S., C.M. 1990/L* 98: 14 pp.
- Clemmesen, C. (1993) Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 177-183
- Clemmesen, C. (1994) The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. *Mar. Biol.* 118: 377-382
- Conover, W.J. (1980) *Practical nonparametric statistics*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 493pp.
- Conway, D.V.P., Tranter, P.R.G., Puelles, M.L.F & Coombs, S.H. (1991) Feeding of larval sprat (*Sprattus sprattus* L.) and sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum). *ICES C.M. 1991/L* 76: 7p.
- Costa, M.J., Bruxelles, A. & Rosado, D. (1987) Ictiofauna do estuário do Mira, abundância e diversidade. *2º Congresso sobre o Alentejo, Beja, I*: 226-230
- Costa, M.J., Costa, J.L., Almeida, P.R. & Assis, C.A. (1994) Do eel grass beds and salt marsh borders act as preferential nurseries and spawning grounds for fish? - An example of the Mira Estuary in Portugal. *Ecol. Engineer.* 3: 187-195
- Crecco, V.A. & Blake, M.M. (1983) Feeding ecology of coexisting larvae of American shad and blueback herring in the Connecticut River. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112: 498-507
- Crecco, V.A. & Savoy, T.F. (1984) Effects of fluctuations in hydrographic conditions on year-class strength of American shad (*Alosa sapidissima*) in the Connecticut River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1216-1223

- Crecco, V.A. & Savoy, T.F. (1985) Effects of biotic and abiotic factors on growth and relative survival of young American shad, *Alosa sapidissima*, in the Connecticut River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1640-1448
- Crecco, V.A. & Savoy, T.F. (1987a) Effects of climatic and density-dependent factors on intra-annual mortality of larval American shad. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 2: 69-81
- Crecco, V.A. & Savoy, T.F. (1987b) Review of recruitment mechanisms of the American shad: the critical period and match-mismatch hypothesis reexamined. American shad. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 1: 455-468
- Crecco, V.A., Savoy, T.F. & Gunn, L. (1983) Daily mortality rates of larval and juvenile American shad (*Alosa sapidissima*) in the Connecticut River with changes in year-class strength. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 1719-1728
- Crecco, V., Savoy, T. & Whitworth, W. (1986) Effects of density-dependent and climatic factors on American shad, *Alosa sapidissima*, recruitment: a predictive approach. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 457-463
- Cunha, P.L. (1995) Aspectos gerais da ictiofauna de estuários e lagoas da costa portuguesa. *Comunicação apresentada no Colóquio "Gestão e Conservação da fauna piscícola das águas continentais portuguesas" - 28 de Outubro de 1995. Faculdade Ciências da Universidade de Lisboa.*
- Cushing, D.H. (1975) *Marine ecology and fisheries*. Cambridge University Press, Cambridge, 278pp.
- Cyrus, D.P. & Blader, S.J.M. (1987) The influence of turbidity on juvenile marine fishes in estuaries. Part 2. Laboratory studies, comparisons with field data and conclusions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 109: 71-91
- DeVries, D.R. & Stein, R.A. (1992) Complex interactions between fish and zooplankton: quantifying the role of an open-water planktivore. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1216-1227
- Edinger, J.E., Buchak, E.M. & McGurk, M.D. (1993) Analyzing larval fish distributions using hydrodynamic and transport modelling. In Spaulding, M.L., Bedford, K., Blumberg, A., Cheng, R. & Swanson, C. (Eds.) *Estuarine and coastal modelling III. Proceedings of the 3rd International Conference*. American Society of Civil Engineers, New York, 536-550

- Erlich, K.F. (1974) Chemical changes during growth and starvation of herring larvae. In Blaxter, J.S. (Ed.) *The early life history*. Heidelberg Springer-Verlag, Berlin, 301-323
- Ehrlich, K.F., Blaxter, J.H.S. & Pemberton, R. (1976) Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar. Biol.* 35: 105-118
- Ferreira, P.L. & Ré, P. (1993) Feeding of larval anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), in the Mira Estuary (Portugal). *Portug. Zool.* 2(3): 25-37
- Fives, J. (1979) Blennidae of the North Atlantic. *ICES Ident. Sheets Fish Eggs Larv.* 3: 4pp.
- Fortier, L. & Leggett, W.C. (1984) Small-scale covariability in the abundance of fish larvae and their prey. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 502-512
- Fortier, L. & Leggett, W.C. (1985) A drift study of larval fish survival. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25: 245-257
- Fortier, L. & Villeneuve, A. (1996) Cannibalism and predation on fish larvae by larvae of Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*: trophodynamics and potential impact on recruitment. *Fish. Bull.* 94: 268-281
- Frank, K.T. (1988) Independent distribution of fish larvae and their prey: natural paradox or sampling artefact. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 48-59
- Frank, K.T. & Leggett, W.C. (1982) Environmental regulation of growth rate, efficiency and swimming performance in larval capelin (*Mallotus villosus*) and its application to the match/mismatch hypothesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 691-699
- Frank, K.T. & Leggett, W.C. (1985) Reciprocal oscillations in densities of larval fish and potential predators: a reflection of present or past predation. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 42: 1841-1849
- Gamble, J.C. & Hay, S.J. (1989) Predation by the scyphomedusan *Aurelia aurita* on herring larvae in large enclosures: effects of predator size and prey starvation. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 191: 366-375
- Garcia, A., Cortés, D. & Ramírez, T. (1998) Daily larval growth and RNA and DNA content of the NW Mediterranean anchovy *Engraulis encrasicolus* and their relations to environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 166: 237-245

- Garcia, A.M.A. & Moyano, P.D. (1990) *Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz*. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Cádiz, 163pp.
- Geffen, A.J. (1982) Otolith ring deposition in relation to growth rate in herring (*Clupea harengus*) e turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Mar. Biol.* 71: 317-326
- González, J.A.M. (1995) *Sedimentología del estuario del río Guadiana (S.O. España-Portugal)*. Industrias Químicas y Básicas de Huelva e Universidad de Huelva, Huelva, 309pp.
- Grémare, A. & Vétion, G. (1994) Comparison of several spectrofluorimetric methods for measuring RNA and DNA concentrations in the deposit-feeding bivalve *Abra ovata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B: 297-308
- Hayman, R.A. & Tyler, A.V. (1980) Environment and cohort strength of the Dover sole and English sole. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 54-70
- Heufelder, G.R., Jude, D.J. & Tesar, F.J. (1982) Effects of upwelling on local abundance and distribution of larval alewife (*Alosa pseudoharengus*) in the eastern Lake Michigan. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1531-1537
- Hewitt, R. (1981) The value of pattern in the distribution of young fish. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 178: 229-236
- Hewitt, R.P., Theilacker, G.H. & Lo, N.C. (1985) Causes of mortality in young jack mackerel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26: 1-10
- Hjort, J. (1914) Fluctuation in the great fisheries of northern Europe. Viewed in the light of biological research. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 20: 1-228
- Hjort, J. (1926) Fluctuations in year classes of important food fishes. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 1: 5-38
- Holme, D.J. & Peck, H. (1983) *Analytical biochemistry*. Longman Scientific & Technical, U.K., 460pp.
- Holmes, R.H.A. & Henderson, P.A. (1990) High fish recruitment in the Severn Estuary: the effect of a warm year? *J. Fish Biol.* 36: 961-963
- Houde E.D. (1982) *Micro- and fine-scale biology*. in Rothschild, B.J. & Rooth, C.G.H. (Eds.) *Fish Ecology III. A foundation for REX - A Recruitment Model*. University of Miami, Tech. Report 82008: 96-122

- Houde, E.D. (1987) Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.* 2: 17-29
- Houde, E.D. (1989) Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. *Fish. Bull.* 87: 471-495
- Houde, E.D. (1997) Patterns and trends in larval-stage growth and mortality of teleost fish. *J. Fish Biol.* 51(Suppl. A): 52-83
- Hugie, D.M. & Dill, L.M. (1994) Fish and game: a game theoretic approach to habitat selection by predators and prey. *J. Fish Biol.* 45(Suppl. A):151-170
- Hunter, J.R. (1976) Report on a colloquium on larval fish mortality studies and their relation to fishery research. January 1975. *Natl. Oceanic Atmos. Adm. Tech. Rep. NMFS CIRC.* 395: 5pp.
- Hunter, J.R. & Kimbrell, C.R. (1980) Egg cannibalism in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 78: 811-816
- Hunter, J.R. & Thomas, G.L. (1974) Effect of prey distribution and density on the searching and feeding behaviour of larval anchovy *Engraulis mordax* Girard. In Blaxter, J.H.S. (Ed.) *The early life history of fish*. Springer-Verlag, New York, 559-574
- Karsten, U. & Wollenberger, A. (1972) Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissue by surface fluorometry. *Anal. Biochem.* 46: 135-148
- Karsten, U. & Wollenberger, A. (1977) Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 77: 464-470
- Kuhlmann, D. (1977) Laboratory studies on the feeding behaviour of the chaetognats *Sagitta setosa* J. Miller and *S. elegans* Verrill with special reference to fish eggs and larvae as food organisms. *Meeresforsch.* 25: 163-171
- Lasker, R. (1975) Field criteria for survival of anchovy larvae: the relation between inshore chlorophyll maximum layers and successful first feeding. *Fish. Bull.* 73: 453-462
- Laurence, G.C. (1982) *Nutrition and trophodynamics of larval fish - review, concepts, strategic recommendations and opinions*. In Rothschild, B.J. & Rooth, C.G.H. (Eds.) *Fish Ecology III. A foundation for REX - A Recruitment Model*. University of Miami, Tech. Report 82008: 123-171

- Lehman, J.T. (1982) *Nutrition significance of nutrient patches to the phytoplankton productivity and species composition*. In Rothshild, B.J. & Rooth, C.G.H. (Eds.) *Fish Ecology III. A foundation for REX - A Recruitment Model*. University of Miami, *Tech. Report* 82008: 210-219
- LePecq, J.-B. & Paoletti, C. (1966) A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal. Biochem.* 17: 100-107
- LePecq, J.-B. (1972) Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids of various conformational forms and measurements of their associated enzymes. *Methods Biochem. Anal.* 20: 41-86
- Lorda, E. & Crecco, V.A. (1987) Stock-recruitment and compensatory mortality of American shad in the Connecticut River. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 1: 469-482
- Loureiro, J., Nunes, M.N. & Botelho, O. (1984) *Monografia hidrológica do rio Mira*. Direcção-Geral dos Recursos e Aproveitamentos Hidráulicos. Comissão de Coordenação da Região do Alentejo, Évora, 19pp.
- Margonski, P. & Horbowa, K. (1994) Co-occurrence of medusae and cod eggs in the Bornholm Basin. *ICES C.M. 1994/J* 18: 11pp.
- Margonski, P. & Horbowa, K. (1995) Vertical distribution of cod eggs and medusae in the Bornholm Basin. In Anon. (Ed.) *Polish-Swedish Symposium on Baltic Cod*. (Meddelande Fran Havsfiskelaboratoriet). *IMR - Report* 327: 7-17
- Margonski, P. & Horbowa, K. (1996) Predation on cod eggs - impact of medusae size. *ICES C.M. 1996/L* 29: 15p.
- Marr, J.C. (1956) The "critical period" in the early history of marine fishes. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 21(1): 160-170
- Martin, F.D., Wright, D.A., Means, J.C. & Setzler-Hamilton, E.M. (1985) importance of food supply to nutritional state of larval striped bass in the Potomac river estuary. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114: 137-145
- Mathers, E.M., Houlihan, D.F. & Burren, L.J. (1994) RNA, DNA and protein concentrations in fed and starved herring *Clupea harengus* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 107: 223-231
- Mathers, E.M., Houlihan, D.F., McCarthy, I.D. & Burren, L.J. (1993) Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. *J. Fish Biol.* 43: 245-263

- Matsakis, S. & Conover, R.J. (1991) Abundance and feeding of medusae and their potential impact as predators on other zooplankton in Bedford Basin (Nova Scotia, Canada) during Spring. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1419-1430
- Matsuura, Y. & Hewitt, R. (1995) Changes in the spatial patchiness of Pacific mackerel, *Scomber japonicus*, larvae with increasing age and size. *Fish. Bull.* 93: 172-178
- McGurk, M.D. (1984) Ring deposition in the otolith of larval Pacific herring *Clupea harengus pallasii*. *Fish. Bull.* 82: 113-120
- McGurk, M.D. & Kusser, W.C. (1992) Comparison of three methods of measuring RNA and DNA concentrations of individual Pacific herring, *Clupea pallasii*, larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 967-974
- McGurk, M.D., Warburton, H.D., Galbraith, M. & Kusser, W.C. (1992) RNA-DNA ratio of herring and sand lance larvae from Port Moller, Alaska. Comparison with prey concentration and temperature. *Fish. Oceanogr.* 1.3: 193-207
- Miller, J.C. & Miller, J.N. (1988) *Statistics for analytical chemistry*. 2nd Edition, Ellis Horwood, New York, 227pp.
- Moller, H. (1984) Reduction of a larval herring population by jellyfish predator. *Science*, 224: 621-622
- Moller, H. (1985) Effects of jellyfish predation on fishes. In Anon. (Ed.) *Workshop on jellyfish blooms in the Mediterranean*. United Nations Environment Programme, Atenas, 45-59
- Munro, H. & Fleck, A. (1966) The determination of nucleic acids. *Meth. Biochem. Anal.* 14: 114-165
- Newell, G.E. & Newell, R.C. (1963) *Marine plankton, a practical guide*. 5th Edition, Hutchinson of London, London, 244pp.
- O'Connell, C.P. (1976) Histological criteria for diagnosing the starving condition in the early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* G. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 25: 285-312
- Oliveira, M.R.L., Monteiro, M.T. & Coutinho, M.T.P. (1989) Estudo da estrutura e dinâmica das comunidades planctónicas do rio Tejo, nos troços de Fratel, Barquinha e Valada. *Relat. Técn. Cient. INIP* 11: 53p.
- Omori, M. & Ikeda, T. (1992) *Methods in marine zooplankton ecology*. Krieger Publishing Company, Florida, 279pp.

- Palmer, C.J. & Culley, M.B. (1984) The egg and early life history of the sand smelt *Atherina presbyter* Cuvier. *J. Fish Biol.* 24: 537-544
- Palomera, I. (1992) Spawning of anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Northwestern Mediterranean relative to hydrographic features in the region. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 215-223
- Palomera, I. & Lleó, J. (1989) field mortality estimates of anchovy larvae, *Engraulis encrasicolus*, in the western Mediterranean. *J. Fish Biol.* 35(Suppl. A): 133-138
- Palomera, I. & Sabatés, A. (1990) Co-occurrence of *Engraulis encrasicolus* and *Sardinella aurita* eggs and larvae in the northwestern Mediterranean. *Scient. Mar.* 54(1): 61-67
- Pepin, P. (1989) Predation and starvation of larval fish: a numerical experiment of size- and growth-dependent survival. *Biol. Oceanogr.* 6: 23-44
- Pepin, P. (1991) Effects of temperature and size on development, mortality and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 48: 508-518
- Pepin, P. & Penney, R.W. (1997) Patterns of prey size and taxonomic composition in larval fish: are there general size-dependent models? *J. Fish Biol.* 51(Suppl. A): 84-100
- Pepin, P. & Shears, T.H. (1995) Influence of body size and alternate prey abundance on the risk of predation to fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 128: 279-285
- Pepin, P., Shears, T.H. & DeLafontaine, Y. (1992) Significance of body size to interaction between a larval fish (*Mallotus villosus*) and a vertebrate predator (*Gasterosteus aculeatus*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 81: 1-12
- Pestana, M.G. (1989) Manacial ibérico-atlântico de sardinha (*Sardinha pilchardus*, Walb.) sua avaliação e medidas de gestão. Dissertação, Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa, 192pp.
- Peterman, R.M. & Gatto, M. (1978) Estimation of functional responses of predators on juvenile salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35: 797-808
- Peterson, C.H. & Black, R. (1994) An experimentalist's challenge: when artefacts of intervention interact with treatments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 289-297
- Pombeiro, A.J.L.O. (1991) *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1069pp.

- Purcell, J.E. (1990) Soft-bodied zooplankton predators and competitors of larval herring (*Clupea harengus pallasii*) at herring spawning grounds in British Columbia. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 48: 505-515
- Purcell, J.E. & Grover, J.J. (1990) Predation and food limitation as causes of mortality in larval herring at a spawning ground in British Columbia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59: 55-61
- Purcell, J.E., Grosse, D. & Grover, J.J. (1990) Mass abundance of abnormal Pacific herring larvae at a spawning ground in British Columbia. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 463-469
- Quignard, J.P. & Douchement, Cl. (1991) *Alosa alosa* e *Alosa fallax fallax*. In Hoestlandt, H. (Ed.) The freshwater fishes of Europe. Vol. 2. Clupeidae, Anguillidae. AULA - Verlag Wiesbaden, Germany.
- Raymont, J.E.G. (1983) *Plankton and productivity in the ocean. Volume 2 - zooplankton*. 2nd Edition, Pergmon Press, Oxford, 824pp.
- Ré, P. (1984) Ictioplâncton da região central da costa portuguesa e do estuário do Tejo. Ecologia da posturae da fase planctónica de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) e de *Engraulis encrasicolus* (Linné, 1758). Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade da Lisboa, Lisboa, 425pp.
- Ré, P. (1986) Otolith microstructure and the detection of life history events in sardine and anchovy larvae. *Ciênc. Biol. Ecol. Syst.* (Portugal) 6: 9-17
- Ré, P. (1987) Ecology of the planktonic phase of the anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), within Mira estuary (Portugal). *Inv. Pesq.* 51(4): 581-598
- Ré, P. (1990) Diversidade, abundância e composição do ictioplâncton nos estuários do Tejo e do Mira. *Actas do I Congresso do Tejo*, Associação dos Amigos do Tejo, 2: 231-236
- Ré, P. (1992) Estudo micro-estrutural de otólitos de estados larvares de peixe recorrendo ao processamento digital de imagem. *Bol. UCA, U. Algarve, UCTRA*, 1: 637-652
- Ré, P. (1994) Anchovy spawning in Mira Estuary. *Arq. do Museu Bocage*, Nova Série, II(27): 423-454
- Ré, P. & Gonçalves, E. (1993) Ecologia da fase planctónica da anchova (*Engraulis encrasicolus*) no estuário do rio Mira. Resultados de 8 anos de estudo (1985/1992). *Bol. UCA, UCTRA, U. Algarve*, 1: 527-542

- Ré, P., Rosa, H.C. & Dinis, M.T. (1988) Daily microgrowth increments in otoliths of *Solea senegalensis* Kaup larvae reared in the laboratory. *Ciênc. Biol. Ecol. Syst.* (Portugal) 8(1/2): 37-41
- Ré, P., Silva, R.C., Cunha, E., Farinha, A., Menezes, I. & Moita, I. (1990) Sardine spawning off Portugal. *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas* 15: 31-44
- Reichow, D., Largiader, C., Klingenberg, Ch., Clemmesen, C., Froese, R. & Ueberschar, B. (1991) The use of multivariate morphometrics to determine the nutritional condition of marine fish larvae. *ICES, CM: 1991/L* 15: 9pp.
- Richard, P., Bergeron, J.-P., Boulhic, M., Galois, R. & Person-Le Ruyet, J. (1991) Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72: 69-77
- Robinson, C.L. & Bain, M.B. (1989) Determinants of estuarine nursery habitat for fish. In Magoon, O.T., Converse, H., Miner, D., Tobin, T. & Clark, D. (Eds.) *Coastal Zone '89*. Volume 2, American Society of Civil Engineers, New York, 997-1010
- Robinson, S.M.C. & Ware, D.M. (1988) Ontogenic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA-DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1422-1429
- Rodrigues da Costa, A.B. (1980) A navegabilidade do rio Guadiana. *Anais Clube Militar Naval* 110: 661-682
- Rojo Mattos, M.A. (1995) Distribuição espaço-temporal do zooplâncton no estuário do rio Mira. *Relat. Cient. Técn. IPIMAR* 11: 29pp.
- Roman, M.R. (1982) Zooplankton nutrition. In Rothschild, B.J. & Rooth, C.G.H. (Eds.) *Fish Ecology III. A foundation for REX - A Recruitment Model*. University of Miami, Tech. Report 82008: 230-250
- Rooker, J.R. & Holt, G.J. (1996) Application of RNA:DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mar. Freshwater Res.* 47: 283-290
- Ross, R.M., Bennett, R.M. & Backman, T.W. (1993) Habitat use by spawning adult. Egg, and larval American shad in the Delaware river. *Rivers* 4(3): 227-238
- Rothschild, B.J. & Rooth, C.G.H. (Eds.) *Fish Ecology III. A foundation for REX - A Recruitment Model*. University of Miami, Tech. Report 82008: 389pp.
- Russel, F.S. (1976) *The eggs and planktonic stages of British marine fishes*. Academic Press, London.

- Santos, R.S. (1989) Observações sobre os intervalos de desenvolvimento de *Parablennius sanguinolentus* (Pallas) (Pisces: Blennidae) dos Açores: períodos embrionário, larval e juvenil. *Arq. Mus. Bocage, Nova Série*, I(19): 293-310
- Scheidegger, K.J. & Bain, M.B. (1995) Larval fish distribution and microhabitat use in free-flowing and regulated rivers. *Copeia* 1995(1): 125-135
- Schmidt, G. & Tannhauser, S.J. (1945) A method for the determination of DNA, RNA and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 161: 83-89
- Schneider, G. & Behrends, G. (1994) Population dynamics and the trophic role of *Aurelia aurita* medusae in the Kiel Bight and western Baltic. *ICES J. mar. Sci.* 51: 359-367
- Setzler-Hamilton, E.M., Wright, D.A., Martin, F.D., Millsaps, C.V. & Whitlow, S.I. (1987) Analysis of nutritional condition and its use in predicting striped bass recruitment: field studies. *Am. Fish. Soc. Symp.* 2: 115-128
- Shelbourne, J.E. (1957) The feeding and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 36: 539-552
- Shimizu, H., Nakata, K. & Nakano, H. (1989) Comparison of nutritional condition of sardine larvae, *Sardinops melanosticus* (T & S) taken from the coastal and offshore region of the Kuroshio Current. *Nipp. Suisan Gakkaishi* 55(1): 179
- Sinclair, M. (1988) *Marine populations. An essay on population regulation and speciation.* (Books in Recruitment Fishery Oceanography). Washington Sea Grant, Washington, 252pp.
- Sinclair, M. & Iles, T.D. (1985) Atlantic herring (*Clupea harengus*) distributions in the Gulf of Maine-Scotian shelf area in relation to oceanographic features. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 42: 872-880
- Smith, P.E. (1973) The mortality and dispersal of sardine eggs and larvae. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 164: 282-291
- Smith, D.L. (1977) *A guide to marine coastal plankton and marine invertebrate larvae.* Kendall/Hunt Company, Dubuque-Iowa, 161pp.
- Snedecor, G. & Cochran, W. (1982) *Statistical methods.* Iowa State University Press, Ames-Iowa, 503p.
- SNPRCN (1993) *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal.* Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa.

- Stein, R.A., DeVries, D.R. & Dettmers, J.M. (1995) Food-web regulation by a planktivore: exploring the generality of the trophic cascade hypothesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 2518-2526
- Steinhart, M. & Eckmann, R. (1992) Evaluating the nutritional condition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. *J. Fish Biol.* 40: 791-799
- Strussmann, C.A. & Takashima, F. (1990) Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish Biol.* 35: 59-66
- Suthers, I.M. (1992) The use of condition indices in larval fish. *Bur. Rural Res., Proc.*, 15: 49-55
- Suthers, I.M. (1996) Spatial variability of recent otolith growth and RNA indices in pelagic juvenile *Diaphus kapalae* (Myctophidae): an effect of flow disturbance near an island? *Mar. Freshwater Res.* 47: 273-282
- Suthers, I.M. & Frank, K.T. (1990) Zooplankton biomass gradient off south-western Nova Scotia: nearshore ctenophore predation or hydrographic separation? *J. Plankt. Res.* 12(4): 831-850
- Suthers, I.M., Cleary J.J., Battaglione S.C. & Evans, R. (1996) Relative RNA content as a measure of condition in larval and juvenile. *Mar. Freshwater Res.* 47: 301-307
- Suthers, I.M., Fraser, A. & Frank, K.T. (1992) Comparison of lipid, otolith and morphometric condition indices of pelagic juvenile cod *Gadus morhua* from the Canadian Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 31-40
- Taggart, C.T. & Leggett, W.C. (1987) Short-term mortality in post-emergent larval capelin *Mallotus villosus*. II. Importance of food and predator density, and density-dependence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 41: 219-229
- Teodósio, M.A.A. (1988) Caracterização geral do ictioplâncton do Canal de Faro (Ria Formosa). Relatório de Estágio, Universidade do Algarve, Faro, 61pp.
- Theilacker, G.H. & Watanabe, Y. (1989) Midgut cell height defines nutritional status of laboratory raised larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 87(3): 457-470
- Thiel, R., Sepúlveda, A., Kafemann, R. & Nellen, W. (1995) Environmental factors as forces structuring the fish community of the Elbe Estuary. *J. Fish Biol.* 46: 47-69

- Thiel, R., Sepúlveda, A. & Oesmann, S. (1996) Occurrence and distribution of twaite shad (*Alosa fallax* Lacépède) in the lower Elbe river, Germany. In Kirchoffer, A. & Hefti, D. (Eds.) *Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe*. Birkhauser Verlag basel, Switzerland, 157-170
- Todd, C.D. & Laverack, M.S. (1991) *Coastal marine zooplankton. A practical manual for students*. Cambridge University Press, Cambridge, 859pp.
- Troadec, J.P. (1978) La pêche et la evaluation des stocks. *FAO Circ. Pêches*, 701: 3-11
- Turner, T.F., Trexler, J.C., Miller, G.L. & Toyer, K.E. (1994) Temporal and spatial dynamics of larval and juvenile fish abundance in a temperate floodplain river. *Copeia* 1994(1): 174-183
- Ueberschar, B.F.R. (1988) A highly sensitive method for the determination of proteolytic enzymes activities in individual marine fish larvae. *Meeresforsch.* 32: 144-154
- Ueberschar, B.F.R. (1993) Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In Walther & Fynh (Eds.) *Physiological and biochemical aspects of fish development*. University of Bergen, Norway, 233-239
- Valiela, I. (1995) *Marine ecological processes*. 2nd Edition, Springer-Verlag, New York.
- Veer, H. W. van der (1985) Impact of coelenterate predation on larval plaice *Pleuronectes platessa* and flounder *Platichthys flesus* in the western Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25: 229-238
- Wagner, M., Durbin, E. & Buckley, L. (1998) RNA:DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod *Calanus finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162: 173-181
- Weatherley, A.H. & Gill, H.S. (1987) *The biology of fish growth*. Academic Press, New York, 443pp.
- Weinholtz, M.B. (1978) *Rio Guadiana. Elementos para o estudo da sua embocadura*. Direcção Geral de Portos, 11p.
- Wright, D.A. & Marin, F.D. (1985) The effect of starvation on RNA:DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Fish Biol.* 27: 479-485
- Wroblewski, J.S., Richman, J.G. & Mellor, G.L. (1989) Optimal wind conditions for the survival of larval northern *Engraulis mordax*: a modelling investigation. *Fish. Bull* 87(3): 387-398

- Wyatt, T. (1972) Some effects of food density on the growth and behaviour of plaice larvae. *Mar. Biol.* 14: 210-216
- Yáñez-Arancibia, A., Domínguez, A.L.L. & Pauly, D. (1994) Coastal lagoons as fish habitats. In Kjerfve, B. (Ed.) *Coastal lagoon processes*. (Elsevier Oceanography Series, 60) Elsevier Science Publishers B.V., 363-376
- Zar, J.H. (1996) *Biostatistical analysis*. 3rd Edition, Prentice Hall International Editions, N.J.

8. ANEXOS

ANEXO I

Descrição das estações amostradas

<i>Bacia</i>	<i>Estação nº</i>	<i>Designação</i>	<i>Dist. à foz (km)</i>
Guadiana	0	“Pluma”	0
	1	Vila Real Sto. António	6
	2	Sapal Castro Marim	11
	3	Foz Odeleite	23
	4	Alcoutim	39
	5	Mértola	67
	6	Pulo Lobo	80
	7	Pedrogão	127
	8	Estrela	159
	9	Mourão	178
Mira	0	Vila Nova Milfontes	0,5
	1	Moinho Asneira	3
	2	Várzea Grande	6
	3	Moinho Louraz	10
	4	Casão D. Soeiro	13
	5	Ribeira Torgal	19
	6	Roncão	20
	7	Odemira	25

ANEXO II

Preparação dos reagentes/soluções

a. Tris-EDTA

- Dissolver 2,22g de Trizma®-Hydrochloride (Sigma) e 1,32g de Trizma®-Base (Sigma) em 500mL de água destilada. Corrigir a solução para pH=8,0.

b. Tris-NaCl

- Dissolver 0,635g de Trizma®-Hydrochloride (Sigma) e 0,118g de Trizma®-Base (Sigma) em 500mL de água destilada. Corrigir a solução para pH=7,5.

c. Sarcosina 1%

- Dissolver 0,5g de *N*-lauril-sarcosinato (Fluka) em 50 mL de Tris-NaCl.

d. Ribonuclease

- Dissolver 0,012g de Ribonuclease A (Boehringer-Mannheim) em 1mL de Tris-NaCl e aquecer em banho-maria a 100°C durante 15 minutos. Após arrefecimento da solução, preparar soluções de trabalho adicionando 0,1mL da solução anterior a 0,9mL de Tris-NaCl. Conservar soluções de trabalho congeladas a -20°C.

e. EB

- Dissolver 10mg de Brometo de Etídio (Sigma) em 100mL de água destilada.

f. Rectas-padrões DNA-EB

- Adicionar 60 uL da solução-padrão de λ -DNA (0,25 ug/uL, Boehringer-Mannheim) a 540 uL de Tris-NaCl (pH=7,5), por forma a obter um solução de trabalho (0,025 ug/uL). A partir desta solução de trabalho preparar quaduplicados com concentrações crescentes como indicado na TABELA seguinte.

Volume Solução Trabalho (uL)	Volume de Tris-NaCl (uL)	Volume de Brometo de Etídio (uL)	Concentração Final (ugDNA/uL)
0	600	50	0.00
10	590	50	0.25
20	580	50	0.50
30	570	50	0.75
40	560	50	1.00
50	550	50	1.25

g. Padrões RNA

- Preparar solução de trabalho a partir de 10 uL de RNA (4 ug/uL, Boehringer-Mannheim) e 390 uL de Tris-NaCl (pH=7,5). Desta solução (0,1 ug/uL) preparar quaduplicados como descrito na Tabela seguinte.

Volume Solução Trabalho (uL)	Volume de Tris-NaCl (uL)	Volume de Brometo de Etídio (uL)	Concentração Final (ugRNA/uL)
0	600	50	0,0
10	590	50	1,0
15	585	50	1,5
20	580	50	2,0
25	575	50	2,5
30	570	50	3,0

h. Tampão - NaCl 0.15M

- Diluir 8,766 g de NaCl (Merck) em 1000 ml de água destilada.

i. Reagente de Coomassie

- Adicionar a 50 mg de Azul Brilhante de Coomassie G - 250 (Sigma), 25 ml de etanol a 95% e 50 ml de ácido ortofosfórico 85% (w/v) (J.M.G.S. Lda.). Diluir até 500 ml em solução tampão NaCl 0,15 M.

j. Rectas-padrão Albumina-Reagente de Coomassie

- Preparar solução de trabalho de Albumina Pura de Bovino (Sigma) diluindo 5 mg daquele reagente em 1 ml de solução tampão NaCl 0,15 M. A partir desta solução preparar triplicados de concentração crescente (Tabela seguinte).

Volume Solução de Trabalho (uL)	Volume de Solução Tampão (uL)	Reagente (uL)	Concentração Final (ug PROT/mL)
0	200	900	0,00
5	195	900	2,09
10	190	900	4,09
15	185	900	6,18
20	180	900	8,27
25	175	900	10,36

l. Ácido nítrico (60% v/v)

- Adicionar 73,9mL de ácido nítrico 65% (Riedel-de Haen) a 6,1mL de água destilada.

ANEXO III

Resultados da análise de correlação

Coefficientes de correlação de Spearman significativos ($p > 0,0001$) obtidos para a análise das relações entre a condição larvar e alguns parâmetros hidrológicos e biológicos. T - temperatura, (a) Caldarone & Buckley (1991) e (b) Clemmesen (1988, 1993) adaptado por Chícharo (1996).

<i>Ictioplâncton</i>	<i>Bacia</i>	<i>Índice</i>	<i>Parâmetro/Taxon</i>	<i>R</i>	
Clupeidae	Mira	RNA/DNA (b)	Cirripedia (>500 µm)	0,67	
			Amphipoda	0,67	
		Gpi	Annelida	-0,71	
			Cirripedia	-0,81	
			Copepoditos	-0,71	
			Cirripedia (>500 µm)	0,66	
		Guadiana	RNA/DNA (a)	Cladocera (>500 µm)	-0,66
				nauplii Copepoda	0,53
				Polychaeta (>500 µm)	0,56
				Cumacea (>500 µm)	0,63
				Mysidacea (>500 µm)	0,70
			RNA/DNA (b)	Amphipoda (>500 µm)	0,52
				T	-0,50
				Copepoditos	0,56
				Gastropoda	0,64
				Cirripedia (>500 µm)	0,49
	Guadiana	PROT/DNA (a)	Amphipoda	0,58	
			Isopoda	0,47	
			nauplii Decapoda	0,46	
			Pelecypoda (>500 µm)	0,48	
			nauplii Copepoda	0,62	
		PROT/DNA (b)	Cumacea	0,66	
			Pelecypoda (>500 µm)	-0,70	
			nauplii Copepoda	0,68	
			Cumacea	0,65	
			Pelecypoda (>500 µm)	-0,65	
	Guadiana	PROT/RNA (b)	nauplii Copepoda	0,60	
			Cumacea	0,60	
			Pelecypoda (>500 µm)	-0,70	
			Copepoditos	0,51	
			Gastropoda	0,55	
		Gpi	Amphipoda	0,55	
nauplii Decapoda			-0,47		
Pelecypoda (>500 µm)			0,48		
Siphonophora			-0,73		
Euphasiacea			-0,73		
Blennidae	Mira	PROT/RNA (a)	nauplii Decapoda	-0,71	
			Temperatura	-0,65	
			Dinoflagellata	0,44	
			Annelida	-0,39	
		Guadiana	PROT/DNA (b)	nauplii Copepoda	0,55
				Pelecypoda	-0,40
				Hidrozoa (>500 µm)	0,62
				Siphonophora	0,53
	Guadiana		RNA/DNA (a)	Cladocera (>500 µm)	0,39
				Cumacea	0,56
				Amphipoda	0,63
				nauplii Decapoda	-0,46
		Guadiana	RNA/DNA (b)	Decapoda	0,60
				Ciliata	0,41
				Annelida	-0,62
				Ostracoda	0,70
Guadiana	RNA/DNA (b)		Pelecypoda	-0,63	
			Chaetognata	-0,46	
			Cladocera (>500 µm)	0,50	
			Mysidacea	-0,45	
Guadiana	Guadiana	RNA/DNA (b)	Isopoda	-0,42	

(continuação)

(cont.)

			<i>nauplii</i> Decapoda	-0,58	
			Pelecypoda (>500 µm)	0,63	
		PROT/RNA (b)	Copepoda	0,38	
		Gpi	T	0,40	
			Ciliata	0,41	
			Annelida	-0,66	
			Ostracoda	0,71	
			Pelecypoda	-0,69	
			Chaetognata	-0,45	
			Cladocera	0,49	
			Mysidacea	-0,45	
			Amphipoda	0,40	
			Isopoda	-0,42	
			<i>nauplii</i> Decapoda	-0,53	
			Pelecypoda (>500 µm)	0,62	
		PROT/RNA (a)	Gastropoda	0,39	
		PROT/RNA (b)	Gastropoda	0,46	
			Hydrozoa (>500 µm)	0,40	
			Cumacea	0,43	
		PROT/DNA (a)	Foraminifera	-0,38	
			Copepoditos	-0,37	
			Gastropoda	0,55	
			Hydrozoa (>500 µm)	0,42	
			Ostracoda	0,44	
			Cumacea	0,42	
		Gpi	<i>nauplii</i> Copepoda	-0,51	
			Cumacea	-0,42	
		Guadiana	RNA/DNA (a)	Gastropoda	0,48
			Polychaeta (>500 µm)	-0,37	
			Cirripedia (>500 µm)	-0,38	
		RNA/DNA (b)	Annelida	-0,41	
			Copepoditos	-0,50	
			Pelecypoda	-0,50	
			Siphonophora	-0,44	
			Bryozoa (>500 µm)	-0,46	
			Cladocera	-0,44	
			<i>nauplii</i> Decapoda	-0,49	
			Pelecypoda (>500 µm)	-0,38	
			Gastropoda (>500 µm)	-0,51	
		PROT/DNA (a)	Annelida	0,45	
			<i>nauplii</i> Copepoda	0,41	
			Hydrozoa (>500 µm)	-0,48	
			Isopoda	-0,42	
			Decapoda	-0,45	
		PROT/DNA (b)	T	-0,42	
			Annelida	0,45	
			<i>nauplii</i> Copepoda	0,42	
			Hydrozoa (>500 µm)	-0,54	
			Copepoda	-0,39	
			Isopoda	-0,48	
			Decapoda	-0,52	
		PROT/RNA (a)	Siphonophora	0,41	
		PROT/RNA (b)	Annelida	0,64	
			<i>nauplii</i> Copepoda	0,54	
			Copepoditos	0,48	
			Pelecypoda	0,53	
			Siphonophora	0,41	
			Bryozoa	0,52	
			Amphipoda	-0,46	
			<i>nauplii</i> Decapoda	0,41	
			Decapoda	-0,44	
			Gastropoda (>500 µm)	0,44	
		Gpi	Annelida	-0,40	
			Copepoditos	-0,51	
			Pelecypoda	-0,49	
			Siphonophora	-0,40	
			Bryozoa (>500 µm)	-0,49	
			Cladocera (>500 µm)	-0,37	

(cont.)

(continuação)

			<i>nauplii</i> Decapoda	-0,50
			Pelecypoda (>500 µm)	-0,39
			Gastropoda (>500 µm)	-0,56
Atherinidae	Mira	-----	-----	-----
	Guadiana	PROT/DNA (a)	T	-0,84
			<i>nauplii</i> Copepoda	0,57
			Bryozoa (>500 µm)	0,78
			Gastropoda (>500 µm)	0,70
		PROT/DNA (b)	T	-0,76
			Bryozoa	0,77
			Chaetognata	-0,73
			Gastropoda (>500 µm)	0,72
		PROT/RNA (a)	T	-0,75
			Bryozoa	0,75
			Chaetognata	-0,71
			Cirripedia (>500 µm)	0,55
			Copepoda	-0,56
			Decapoda	-0,58
			Gastropoda (>500 µm)	0,70
		PROT/RNA (b)	T	-0,79
			Bryozoa (>500 µm)	0,75
			Chaetognata	-0,77
			Copepoda	-0,58
			Decapoda	-0,59
			Gastropoda (>500 µm)	0,69
