



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 1 • p 67-78

Exposição a agentes perturbadores naturais e antropogénicos: consequências na diversidade genética de populações de dafnídeos

A perda de diversidade genética devido a contaminação antropogénica pode aumentar o risco de extinção das populações expostas aquando sujeitas a ulteriores agentes de perturbação. O presente estudo pretendeu investigar o efeito de dois agentes perturbadores na diversidade genética de uma população laboratorial do cladóceros planctónico dulçaquícola *Daphnia longispina*: predação (dois níveis de intensidade) e contaminação por metais. Para tal, foram seleccionados cinco clones (*sensu* linhagens obtidas por partenogénese) de *D. longispina*, com diferentes sensibilidades a concentrações letais de um efluente rico em metais. Estes clones foram expostos conjuntamente à presença isolada de cada um dos dois agentes perturbadores e à presença simultânea de ambos (predação + metais). A densidade populacional foi monitorizada ao longo de toda a experiência, e, no final, foi determinada a frequência de cada clone nos diferentes tratamentos através da análise de perfis aloenzimáticos. Verificou-se que os clones mais sensíveis desapareceram das populações após serem expostas a contaminação por metais, quer na presença de predação, quer, sobretudo, na sua ausência. Esta experiência constitui mais uma evidência de ocorrência de erosão genética em populações expostas a contaminação química. Os resultados obtidos corroboram, ainda, a “hipótese do distúrbio intermédio”: níveis intermédios de agentes perturbadores promovem a manutenção da variabilidade genética de uma população.

Palavras-chave

diversidade genética

predação

metais

resistência

Daphnia longispina

Isabel Lopes^{1*}

Nelson Martins²

Donald J Baird³

Rui Ribeiro²

¹CESAM e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

²IMAR, Instituto do Mar, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.

³Environment Canada, Canadian Rivers Institute, Department of Biology, University of New Brunswick, New Brunswick, Canada.

*ilopes@ua.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

O estudo dos efeitos de exposição química na diversidade genética de populações naturais tem vindo a receber grande atenção em Ciência. Este tipo de contaminação pode provocar alterações na diversidade genética de populações naturais, principalmente através do efeito de gargalo e/ou de selecção natural (van Straalen e Timmermans, 2002). No primeiro caso, a perda de diversidade genética ocorre devido a um aumento na mortalidade e/ou a efeitos adversos na reprodução dos indivíduos que constituem a população. O segundo caso ocorre devido à eliminação de fenótipos sensíveis na população, e, conseqüentemente, ao desaparecimento ou diminuição drástica na frequência dos alelos correspondentes (Theodorakis, 2003). Esta perda de diversidade genética pode reduzir a resiliência (*sensu* tempo decorrido até a população retomar o equilíbrio após ter sofrido uma perturbação) das populações naturais aquando expostas a ulteriores agentes perturbadores (Bagley et al., 2002; Theodorakis, 2003). Paralelamente à contaminação química, agentes perturbadores naturais (competição, predação,...) podem também provocar efeitos adversos nas populações. Assim, a capacidade de populações naturais persistirem em ambientes contaminados pode depender em muito dos efeitos combinados resultantes da interacção de agentes perturbadores naturais e antropogénicos.

O presente estudo visou investigar os efeitos provocados pela exposição isolada e combinada a dois agentes perturbadores: predação não selectiva e um pulso de um efluente de drenagem ácida rico em metais (EDA), na diversidade genética de uma população, simulada em laboratório, de um microcrustáceo planctónico, o cladóceros *Daphnia longispina* O.F. Müller. Os dafnídeos são particularmente vantajosos neste tipo de estudos porque podem ser mantidos em laboratório cumprindo ciclos de reprodução exclusivamente assexuada por partenogénese ameiótica, o que permite manter, ao longo de várias gerações, linhagens geneticamente constantes (clones).

Na literatura científica, já foram publicados estudos que descrevem a influência de agentes perturbadores naturais, como a predação, nos efeitos adversos provocados por agentes perturbadores antropogénicos. Por exemplo, Beketov e Liess (2006) observaram que os efeitos adversos causados pelo pesticida esfenvalerato em populações do microcrustáceo *Artemia* sp. eram mais intensos na presença de predação.

Pelo exposto, torna-se imprescindível a compreensão dos efeitos provocados pela exposição combinada a agentes perturbadores naturais e antropogénicos nos ecossistemas. Este conhecimento permitirá uma maior capacidade para avaliar os efeitos de exposição a agentes perturbadores múltiplos na avaliação de risco ecológico¹.

¹ *Sensu* avaliação da probabilidade de ocorrência e intensidade de efeitos ecológicos adversos, como resultado da exposição a um ou mais agentes de perturbação.



MATERIAL E MÉTODOS

Foram seleccionados 5 clones de *D. longispina* (designados por C1 a C5 de acordo como o seu perfil aloenzimático – isto é, perfil de bandas obtidas em géis de acrilamida para várias enzimas²). A sensibilidade destes clones à contaminação por metais foi previamente testada. A sua selecção para o presente estudo baseou-se no facto de apresentarem um intervalo largo de sensibilidade a contaminação por metais (diminuição de sensibilidade de C1 a C5). Cada clone foi mantido individualmente em laboratório no meio artificial ASTM (2002), com suplemento vitamínico e extracto de algas Marinure 25 (Glenside, Stirling, UK) (Baird et al., 1989), sob condições controladas de temperatura (25 °C) e fotoperíodo (14:10 horas, luz:escuro). Os organismos foram alimentados diariamente com a alga verde unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (3×10^5 células mL⁻¹ d⁻¹, correspondente a 1.0×10^5 células dafnídeo⁻¹ d⁻¹). O meio de cultura (ASTM) foi mudado a cada 2 dias. Todos os organismos usados nas experiências eram provenientes de terceiras ninhadas nascidas nestas culturas.

Foram realizadas duas experiências diferentes: (i) experiência de ciclo de vida, com o intuito de caracterizar os parâmetros do ciclo de vida de cada clone e poder inferir sobre as suas taxas de crescimento populacional comparando-as com as taxas de crescimento observadas na experiência de microcosmos; (ii) experiência de exposição aos agentes perturbadores em microcosmos³ com o intuito de avaliar os efeitos de exposição a predação não selectiva (isto é, predação não diferenciada por tamanho dos indivíduos da população) e contaminação química isoladamente e em combinação.

Experiências de ciclo de vida

Os parâmetros do ciclo de vida de cada clone foram monitorizados através da realização de experiências de ciclo de vida. Estas experiências consistiram na exposição individual de 10 neonatos (com idades compreendidas entre 6 a 24 horas), de cada clone, em frascos de vidro de 42 mL preenchidos com 30 mL de meio ASTM e sob as mesmas condições de renovação de meio, alimentação, temperatura e regime de fotoperíodo que as descritas na secção anterior. Cada um dos 10 indivíduos de cada clone foi observado diariamente até à sua morte, tendo sido registados: o tempo decorrido até à libertação da primeira ninhada, o número de neonatos libertados por ninhada e a longevidade. Estes parâmetros permitiram calcular a taxa de crescimento populacional para cada clone através de sucessivas aproximações à equação de Lotka (Pianka, 2000)⁴:

$$\sum_{t=0}^n l_t m_t e^{-r_m t} = 1$$

² Aloenzimas são enzimas cujas partes constituintes são transcritas por mais do que um alelo. Assim, no caso de uma aloenzima codificada por 2 alelos (A e B) poderão existir indivíduos heterozigóticos, ou seja produzem 3 tipos de aloenzimas, uma com as 2 partes codificadas pelo alelo A, outras com as duas partes codificadas pelo alelo B e outra com uma parte codificada pelo alelo A e outra parte codificada pelo alelo B. Os homozigóticos apenas terão um tipo de aloenzima que terá as duas partes codificadas por um dos alelos. Eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a sua migração num gel, durante a aplicação de um potencial eléctrico. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Esta técnica resulta num gel onde se podem observar várias bandas, cada uma correspondendo a uma determinada molécula. No caso das aloenzimas estes padrões de bandas permitem identificar indivíduos geneticamente diferentes, isto é, que apresentam um padrão de presença de aloenzimas diferente entre si.

³ Simulação de sistemas biológicos em pequenas escalas. No presente caso o microcosmo consiste na representação de populações do cladóceros *Daphnia longispina* constituídas por cinco clones diferentes.

⁴ Em 1925, Lotka provou que uma população fechada (isto é, sem migração) com mortalidade e idade específica de fertilidade constantes teriam eventualmente uma taxa de crescimento constante. Esta taxa foi denominada por Lotka como taxa de crescimento intrínseco natural, aqui designada por taxa de crescimento populacional.

em que I_t representa a idade específica de sobrevivência, m_t o número de neonatos no dia t e t a idade em dias.

Experiências de microcosmos

As experiências de microcosmos foram realizadas em frascos de vidro circulares com 16 cm de altura e 9,5 cm de diâmetro, colocados numa sala com temperatura controlada entre 24 e 26°C e fotoperíodo 14:10 horas (luz:escuro). Sobre os microcosmos, foram colocadas lâmpadas fluorescentes de luz branca e fria ($100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de modo a uniformizar a intensidade de luz a que estariam expostos durante o decorrer da experiência.

A experiência foi iniciada com 8 microcosmos com 1 L de meio ASTM e teve a duração de 52 dias. Em cada microcosmo foram introduzidos 2 neonatos (com idades entre 6 e 24 horas) de cada um dos 5 clones, num total de 10 (2 neonatos \times 5 clones) neonatos por frasco (Figura 1). Durante 20 dias, os organismos cresceram e reproduziram-se sob as condições acima referidas, com renovação de metade do meio a cada dois dias e alimentação diária com 1.5×10^5 células mL^{-1} de *P. subcapitata* (7.5×10^3 células $\text{dafnídeo}^{-1} \text{dia}^{-1}$) e, a partir do dia 20, com 3×10^5 células mL^{-1} . No período compreendido entre o dia 10 e o final da experiência (dia 52), a densidade de dafnídeos em cada frasco foi monitorizada cada 2 dias através da análise de 6 amostras de 12 mL recolhidas ao acaso em cada um dos microcosmos. Os organismos recolhidos nos 12 mL foram contados na totalidade e re-introduzidos no respectivo microcosmo, o qual foi também re-preenchido com ASTM para o volume inicial (1 L). Além das densidades, foi também monitorizada a composição clonal nos dias 20 (antes da aplicação de predação) e 52 (no final da experiência). No dia 20, começaram a ser simulados os dois níveis de predação não selectiva (10% - baixa predação, BP; e 20% - alta predação, AP) em 4 dos 8 microcosmos iniciais, deixando 4 frascos restantes sem predação (controlo - C). De modo a simular os níveis de predação BP e AP, foram recolhidos, respectivamente, 100 mL e 200 mL de cada um dos 4 microcosmos, com um tubo de sucção (garantindo assim a simulação de predação não diferenciada de dafnídeos). O volume inicial (1 L) do microcosmo foi re-estabelecido adicionando meio ASTM (sem organismos). Foram aplicados 10 episódios dos dois níveis de predação com intervalos de 2 dias, até ao dia 38. Neste dia (38), o conteúdo de cada microcosmo de 1 L foi dividido em quatro partes iguais usando um fraccionador de Folsom (Figura 2). Cada uma destas partes (250 mL) foi transferida para frascos de vidro de 400 mL, resultando num total de 32 frascos (16 C, 8 BP e 8 AP). Estes microcosmos (250 mL) estabilizaram durante 2 dias, e, no dia 40, foi simulado um pulso de contaminação química, adicionando uma amostra de um efluente de drenagem ácida rico em metais⁵ (EDA; pH de 2,46 e condutividade de 4,78 mS cm^{-1}) proveniente de uma mina de pirite. Adicionaram-se 7 mL deste efluente, correspondentes a uma diluição de 2,80% do efluente, a 8 frascos do controlo (C), 4 frascos BP e 4 frascos AP. De modo a simular a recuperação do sistema, o meio de cada frasco foi parcialmente renovado com meio ASTM, aplicando um factor de diluição de 1,7 \times todos os dias até ao final da experiência. Os dois níveis de predação nos respectivos microcosmos foram mantidos com intervalos de 2 dias até ao final da experiência (dia 52) (Figura 1).

⁵ A produção deste tipo de efluente de drenagem ácida resulta da oxidação de minérios que contêm sulfuretos, aquando da actividade mineira. Na presença de oxigénio e água os sulfuretos são oxidados dando origem, entre outros, a elevadas concentrações de iões H^+ . Estes iões provocam um decréscimo acentuado do pH das águas promovendo a mobilização de metais presentes no minério para a coluna de água. Geralmente estes efluentes são drenados para corpos hídricos (lagos, rios, etc.), comprometendo seus ecossistemas.

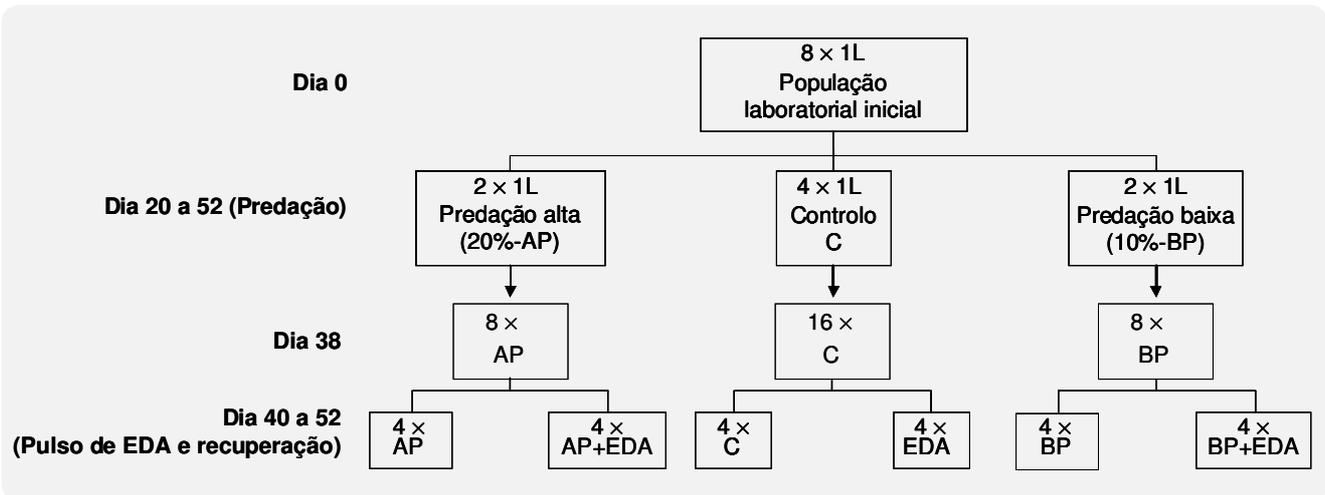


FIGURA 1: Representação esquemática do desenho experimental das experiências realizadas em microcosmos com os cinco clones do cladóceros *Daphnia longispina* (adaptado de Lopes et al., 2009) expostos a 2 níveis de predação (BP e AP), a um pulso de um efluente de drenagem ácida (EDA) e à combinação destes dois agentes e perturbação (BP+EDA e AP+EDA).

Identificação dos clones

A identificação de cada clone no dia 20 e no final da experiência (dia 52) foi realizada através de extracções de tecido, seguidas de determinações do correspondente perfil aloenzimático, seguindo as metodologias propostas por (Hebert e Beaton, 1993). As enzimas analisadas foram: glucose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9), peroxidase (EC 1.11.1.7) (Milone et al., 2003) e fosfoglucomutase (EC 2.7.5.1). A identificação da composição clonal permitiu determinar frequências observadas para cada clone (*sensu* proporção de indivíduos de cada clone relativamente ao tamanho total da população) e a diversidade clonal em cada tratamento.



FIGURA 2: Fotografia de um Fraccionador de Folsom usado para separar as amostras de populações de *Daphnia longispina* (imagem obtida em: http://www.aquaticresearch.com/folsom_plankton_splitter_files/Mvc-002f.jpg).

RESULTADOS

Experiências de ciclo de vida

Registaram-se diferenças significativas, entre os 5 clones, quer no número total de neonatos libertados durante a experiência quer na taxa de crescimento populacional (r_m). Os clones C1 e C5 libertaram significativamente mais neonatos do que o clone C4; enquanto os clones C2 e C3 exibiram, respectivamente, o menor e maior valor de r_m (Figura 3).

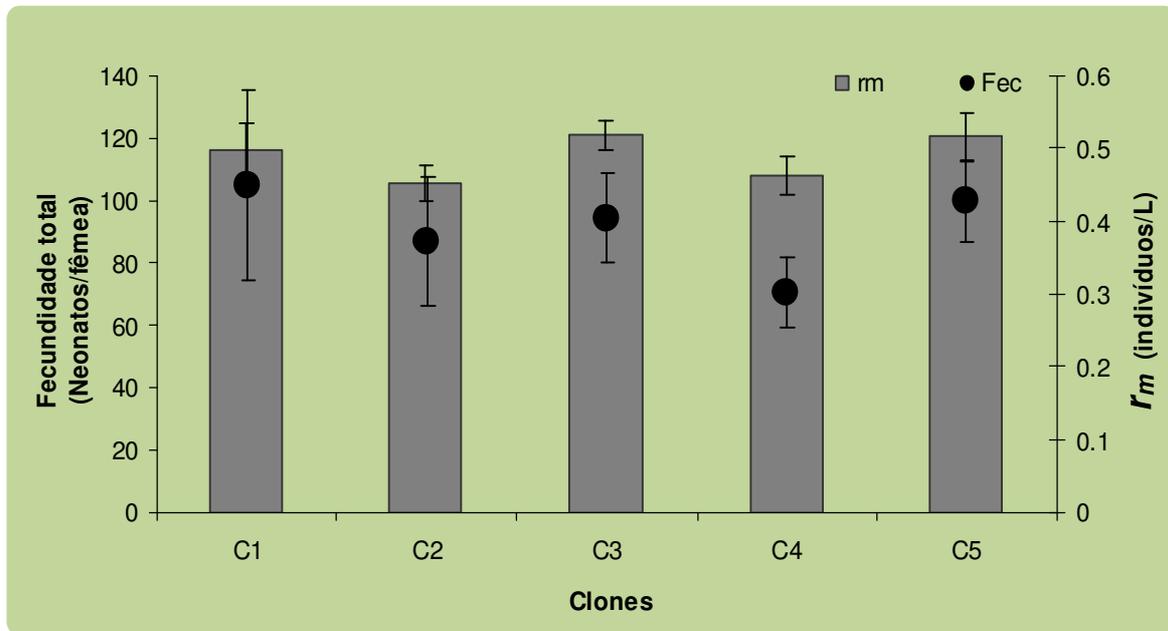


FIGURA 3: Médias aritméticas (\pm desvio-padrão) dos valores de fecundidade total e da taxa de crescimento populacional (r_m) calculadas para cada clone de *Daphnia longispina* com base nos parâmetros de ciclo de vida.

Tratamento sem agentes perturbadores

Na ausência de perturbação por predação (BP ou AP) ou por contaminação química (EDA), as densidades populacionais aumentaram exponencialmente até ao dia 18, atingindo um patamar de 11767 ± 277 organismos L^{-1} (média \pm desvio \pm padrão) (Figura 3). Como este valor foi próximo do valor esperado calculado para os dias 16 e 17 (1031 e 1385 organismos L^{-1} , respectivamente), foi considerado como a capacidade de carga do sistema (tamanho máximo estável da população que um habitat pode suportar durante um longo período de tempo). Relativamente às frequências clonais observadas no dia 20, não se registaram diferenças significativas comparativamente aos valores esperados (calculados com base nos parâmetros do ciclo de vida de cada clone): 19, 13, 27, 14 e 27% para os clones C1 a C5, respectivamente. Os clones C2 (15%) e C4 (11%) apresentaram frequências clonais baixas, enquanto os clones C1 (28%) e C3 (28%) as frequências mais altas (Figura 4). Apesar das frequências clonais serem similares, a diversidade clonal no dia 20 (0.729) foi significativamente diferente da esperada (estimada com base nos parâmetros do ciclo de vida) (0.780).

Não se registaram diferenças significativas entre frequências clonais observadas nos dias 20 e 52. No final da experiência (dia 52), similarmente aos resultados do dia 20, os clones C1 e C4 exibiram as frequências mais baixas enquanto os clones C1 e C5 as frequências mais altas, no controlo (Figura 4).

No dia 52 registaram-se diferenças significativas entre as frequências observadas e esperadas (frequências esperadas: 19, 13, 27, 14, e 27%, para os clones C1 a C5, respectivamente). Mais ainda, a diversidade clonal foi significativamente mais baixa no final da experiência (dia 52) comparativamente a quando a população atingiu o patamar de crescimento (dia 20) (11% de redução) e também mais baixa do que o valor esperado (0.895) (diferença entre a média da amostra e da população).

Predação não selectiva - dias 20 a 52

A aplicação de 10 e 20% de predação não selectiva (BP e AP, respectivamente) não afectou significativamente a densidade das populações (Figura 4); 18 dias após o início da simulação de predação (dia 38) não foram observadas diferenças significativas entre as densidades observadas (Figura 4). Em ambos os níveis de simulação de predação, a distribuição das frequências clonais não diferiu significativamente do controlo no final da experiência (dia 52) (Figura 4). No entanto, no tratamento AP foi observada uma pequena diferença na composição clonal, os clones C4 e C1 foram, respectivamente, o mais e o menos abundante (Figura 5). Apesar das frequências clonais serem semelhantes, foi registada uma diversidade clonal significativamente mais alta nos dois níveis de predação, relativamente ao controlo, no final da experiência (dia 52). Estas diferenças não foram observadas aquando da comparação da diversidade clonal entre o controlo de dia 20 e as populações expostas aos dois níveis de predação no dia 52.

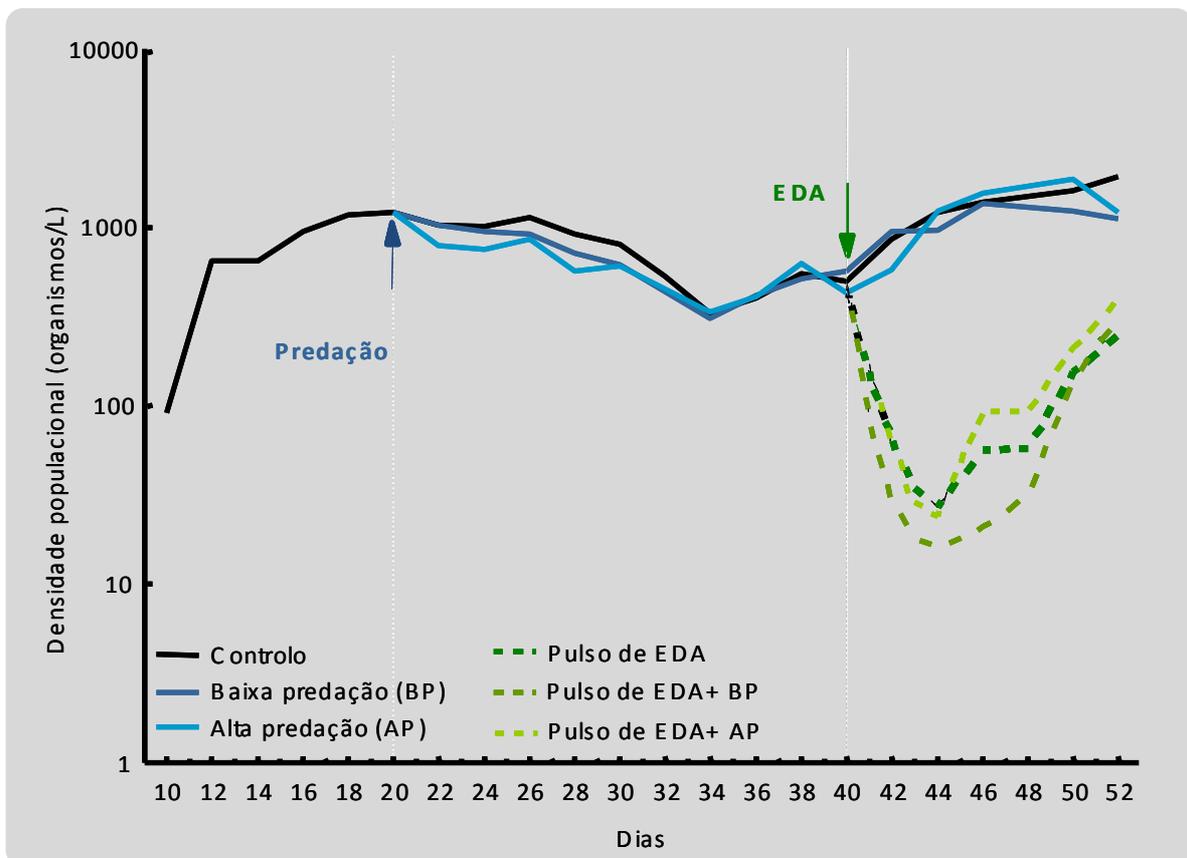


FIGURA 4: Densidades populacionais médias de *Daphnia longispina* registadas ao longo da experiência de microcosmos para os vários tratamentos (adaptado de Lopes *et al.*, 2009).

Pulso de drenagem ácida (EDA) - dias 40 a 52

A aplicação do pulso de EDA causou uma mortalidade elevada, com subsequente redução significativa da densidade populacional 24 horas após o pulso (Figura 4). A tendência de redução da densidade reverteu-se no dia 44 (Figura 4), e apenas 12 dias após o pulso de EDA (dia 52 - num período aproximadamente equivalente a 2 gerações) as densidades populacionais iniciais foram recuperadas na totalidade (Figura 4). No entanto, a densidade populacional manteve-se significativamente mais baixa relativamente ao controlo no final da experiência (dia 52) (Figura 4).

A aplicação do pulso de EDA provocou o desaparecimento dos clones mais sensíveis (C1 e C2) das populações expostas somente a EDA. As frequências dos clones C4 e C5 subiram para quase o dobro do

controlo no dia 52, e a frequência do clone C3 baixou comparativamente ao controlo do dia 52 (Figura 5). Relativamente à população controlo, no dia 52, o tratamento com EDA apresentou uma composição clonal significativamente diferente e índices de diversidade clonal significativamente mais baixos (Figura 5). Estas diferenças significativas também foram observadas aquando da comparação da diversidade clonal entre o controlo do dia 20 e as populações expostas a EDA no final da experiência (dia 52) (Figura 5).

Agentes perturbadores combinados – dias 40 a 52

Aquando da aplicação simultânea dos dois agentes de perturbação (predação e EDA), o pulso de EDA foi claramente o factor mais importante a influenciar a densidade e distribuição dos clones. Mais ainda, a predação não selectiva adicional a que os organismos estiveram expostos, não afectou significativamente a recuperação de densidades após o pulso de EDA (Figura 4). O clone C2 desapareceu completamente em todos os tratamentos com aplicação de EDA, enquanto o outro clone sensível (C1) apenas desapareceu nos tratamentos com EDA como agente perturbador único e no tratamento AP + EDA (Figura 5). Em todas as combinações de tratamentos, a frequência dos clones foi significativamente diferente do controlo do dia 52. No entanto, os valores de diversidade clonal apenas foram significativamente mais baixos no tratamento AP + EDA. A frequência dos clones diferiu entre os tratamentos; por exemplo, no tratamento com EDA, apesar das frequências serem similares entre EDA e predação + EDA, o clone C4 tornou-se dominante no último tratamento.

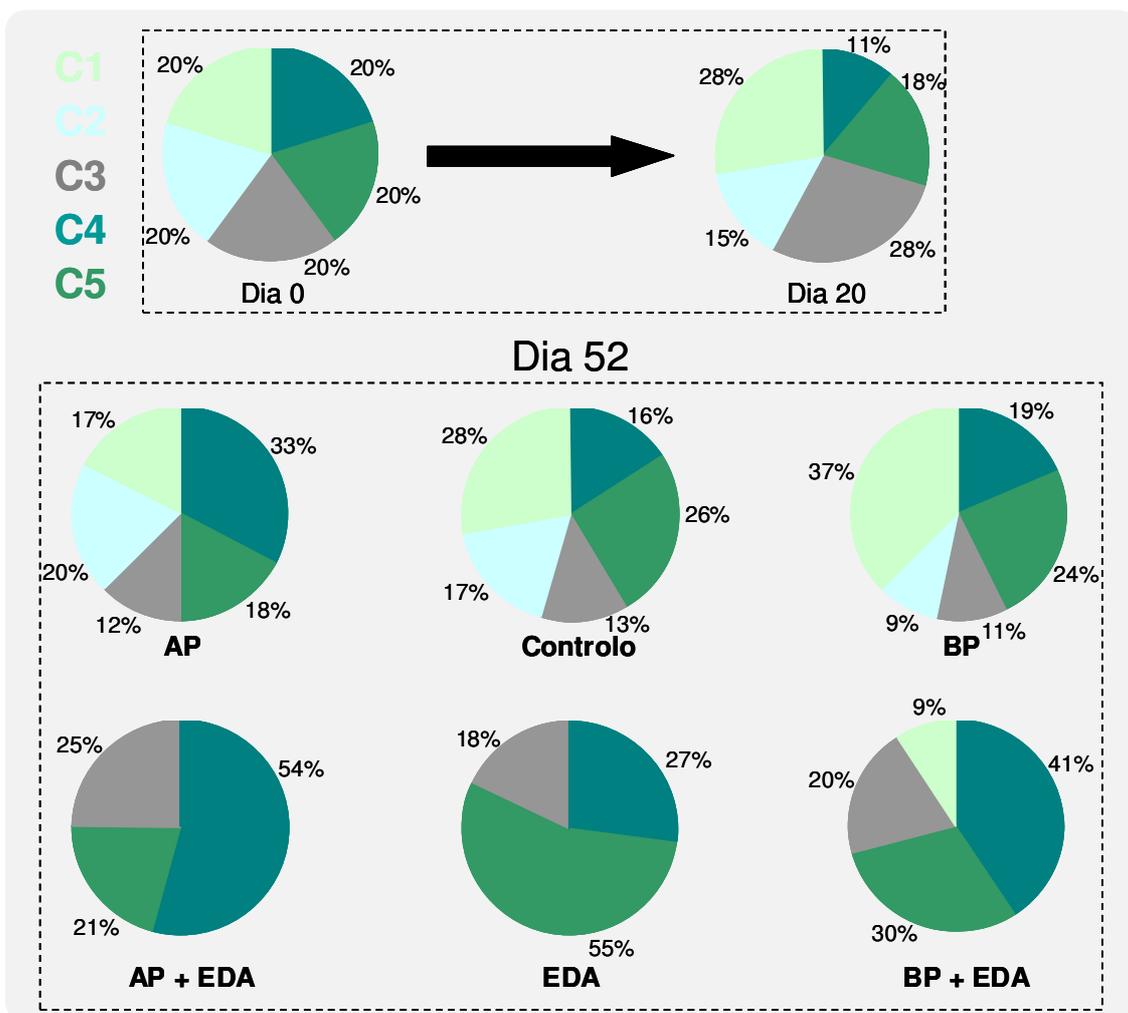


FIGURA 5: Frequências (%) observadas dos cinco clones de *Daphnia longispina* expostos em microcosmos aos vários tratamentos (adaptado de Lopes et al., 2009).

DISCUSSÃO

Tratamento sem agentes perturbadores

Os clones C2 e C4 revelaram ser os menos aptos, uma vez que partindo todos da mesma frequência (20%) no dia 0, as suas frequências diminuíram até atingirem um valor mínimo no dia 20, permanecendo estáveis, na ausência de agentes perturbadores, até ao final da experiência (dia 52). Este resultado era esperado uma vez que está em concordância com os resultados obtidos na experiência de ciclo de vida, onde estes dois clones apresentaram as taxas de crescimento populacionais mais baixas. No entanto, no final da experiência (dia 52), a frequência observada para o clone C3 (13%) não foi concordante com o valor esperado (27%), visto este clone exibir a taxa de crescimento populacional mais elevada de entre os cinco clones. Assumindo que todos os clones seriam competidores equivalentes, esperava-se obter, no final da experiência (dia 52), frequências iguais a 19, 27, e 27% em vez das observadas 28, 13 e 26% (para os clones C1, C3 e C5, respectivamente). De acordo com Weider (1992), esta falta de concordância entre as frequências clonais observadas e esperadas pode ser devida a uma relação inversa entre habilidades competitivas e taxas de reprodução, isto é, os melhores competidores (ex. por comida) tendem a ter taxas de crescimento populacionais mais baixas e vice-versa. Esta hipótese foi sugerida como uma explicação para a manutenção da diversidade clonal em populações partenogenéticas (como *Daphnia*): se o sucesso reprodutivo fosse o único factor a determinar a aptidão do indivíduo, então a população seria rapidamente dominada por um ou dois clones (os mais aptos, isto é com maior sucesso reprodutivo). Aparentemente, o clone com o potencial reprodutivo mais elevado (C3) foi o mais afectado pela perturbação induzida por competição, dando, assim, suporte à hipótese sugerida por Weider (1992).

Agentes perturbadores isolados

Após 32 dias de exposição (do dia 20 ao dia 52), nos tratamentos com perturbação por predação (BP e AP), não se registaram alterações significativas nas densidades populacionais, indicando que o patamar de densidades estaria próximo da capacidade máxima de crescimento da população, isto é, os clones não atingiram o seu potencial máximo de reprodução. Durante o mesmo período, as frequências clonais sofreram alterações ligeiras, não significativas, no nível de predação mais elevado (AP). No final da experiência (dia 52), a diversidade clonal das populações expostas aos dois níveis de predação foi significativamente mais elevada que a do controlo (0.728 e 0.720 *versus* 0.647, respectivamente). No decorrer da experiência não foram observadas alterações significativas na diversidade clonal nos dois níveis de predação (de 0.729, no dia 20, para 0.728 e 0.720, respectivamente). Estes resultados, suportam a hipótese do distúrbio intermédio, a qual tem sido sugerida como uma explicação para um aumento na diversidade da população ou da comunidade a níveis de distúrbio baixos ou médios (Shea et al., 2004). De acordo com esta hipótese, distúrbios pequenos ou médios são importantes na manutenção de níveis elevados de diversidade em populações ou comunidades.

Tal como esperado, o pulso de EDA provocou uma redução significativa nas densidades populacionais e uma alteração drástica nas frequências clonais, uma vez que os clones mais sensíveis desapareceram das populações. De acordo com os dados de sensibilidade de cada clone e do ciclo de vida, o clone C5 (com a menor sensibilidade e com uma das maiores taxas de crescimento populacional) dominou as populações. O clone C4, apesar de ter exibido a menor taxa de crescimento populacional, foi o segundo clone mais abundante no tratamento com EDA, provavelmente devido à sua elevada resistência a EDA.

Ward & Robinson (2005) reportaram uma redução na diversidade clonal quer no controlo quer em cenários de contaminação por metais no microcrustáceo plantónico congénere *Daphnia magna* Straus. Estes autores observaram em média uma redução de 53% na diversidade após 8 gerações cultivadas em condições controlo, de 68% após 8 gerações cultivadas em concentrações elevadas de cádmio e de 19% em condições de simulação de predação com intensidade 50%. No presente estudo, foi encontrado um padrão similar, isto é uma redução significativa na diversidade do controlo (sem distúrbio), uma grande redução sob condições de pressão selectiva forte (distúrbio elevado), e pequenas ou nenhuma reduções sob condições de agente perturbador selectivo (pequeno a médio distúrbio). Uma vez que as metodologias e a métrica para cálculo dos índices de diversidade usados neste estudo foram diferentes dos aplicados por Ward & Robinson (2005) (diversidade clonal *versus* índice de diversidade genética), não foi possível uma comparação directa dos índices. Comparando a diversidade clonal no dia 20 com a diversidade no final da experiência (dia 52), não se encontrou um decréscimo na diversidade clonal com predação não selectiva e a redução de diversidade sob condições controlo foi menos marcada (11%) do que nos cenários de exposição a EDA (17 e 43%).

Agentes perturbadores combinados

Durante a exposição à acção combinada dos dois agentes perturbadores, EDA foi claramente o factor que maior influência exerceu na distribuição dos clones. A diversidade clonal (0.667 e 0.605) obtida após exposição simultânea a EDA e BP foi similar ao valor de diversidade clonal obtido no controlo no final da experiência (0.647). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de que após a acção conjunta de AMD e BP, o clone C1 permaneceu na população, apesar de em frequências mais baixas do que no controlo. Mais ainda, dado este clone ter apresentado a maior densidade no tratamento BP, coloca-se a hipótese de que, após o pulso de EDA, alguns organismos de C1 sobreviveram e recuperaram rapidamente dada a sua elevada taxa de crescimento populacional.

Foi demonstrado por Morgan e Buckling (2004) que a combinação de uma pressão selectiva letal com uma pressão não selectiva elimina a relação directa entre perturbação e diversidade. Estes autores observaram que na bactéria *Pseudomonas fluorescens* Migula, o aumento da diversidade (induzido por um distúrbio de intensidade media provocado por um agente perturbador não selectivo: diluição das culturas) era contrariado por: (i) um aumento na frequência dos indivíduos com maior aptidão na presença de uma agente perturbador selectivo (presença de bacteriófagos) e por (ii) menor competição e taxas de reprodução na sua ausência, mantendo a diversidade no estado de equilíbrio. No presente estudo, a pressão selectiva diminuiu a diversidade (em vez de a aumentar, tal como no estudo anteriormente referido), pelo que é colocada a hipótese de que níveis baixos de pressão não selectiva (tratamento de baixa predação) ajudaram a população a atingir valores de diversidade clonal (0.667 and 0.605) semelhantes aos do controlo no final da experiência (0.647).

As diferentes densidades dos clones nos diferentes cenários de perturbação são concordantes com os resultados obtidos por Weider (1992), que observou que clones diferentes de *D. magna* apresentavam diferentes densidades, dependendo da frequência e da intensidade da predação simulada, e que padrões alternados de frequência clonal ocorreram durante o decurso de uma experiência similar. Weider (1992) constatou ainda que o resultado final da competição interclonal é dependente, não só da taxa de crescimento natural, mas também de diferentes aptidões competitivas em ambientes diferentes.

Comparando a sensibilidade dos clones aqui estudados a diferentes químicos, foi observado que os clones mais resistentes a níveis letais de EDA eram também os mais resistentes a concentrações letais de cobre (com o mesmo ranking de aumento de resistência: C1, C3, C4 e C5). No entanto, os dois clones mais resistentes (C4 e C5) a estes contaminantes, eram os mais sensíveis a concentrações letais do metal cádmio e de hidrogeniões (iões H^+). Mais ainda, um dos clones mais resistentes a cádmio (C1), também um dos mais resistentes a iões H^+ , era o mais sensível a EDA e cobre. Resultados semelhantes foram obtidos por Baird et al. (1991) com clones da espécie *D. magna*. Estes resultados têm implicações importantes na avaliação de risco ecológico e em conservação. É globalmente aceite que a resiliência dos ecossistemas depende da diversidade específica presente nos diferentes grupos funcionais (Naeem, 1997). Isto é, se várias espécies, pertencentes ao mesmo grupo funcional, desaparecerem, mas pelo menos uma sobreviver dentro deste mesmo grupo funcional, então o ecossistema pode manter essa sua função específica. A espécie sobrevivente aumentará em frequência e ocupará o espaço deixado pelas espécies que foram eliminadas/desapareceram. Este mesmo princípio pode ser aplicado a nível populacional. Uma população é constituída por vários indivíduos que exibem diferentes níveis de sensibilidade a várias substâncias químicas (ex. Barata et al., 2002; Lopes et al., 2005). Quando um tóxico contamina o habitat, os genótipos mais sensíveis podem desaparecer da população, permanecendo apenas aqueles que são mais tolerantes àquele tipo específico de contaminação. Devido à possível existência de contrapartidas associadas a uma maior resistência relativamente a um tóxico (ex. investimento de energia para mecanismos de destoxificação), os genótipos resistentes podem ser mais sensíveis a outros agentes perturbadores (Shirley e Sibly, 1999; Xie e Klerks, 2004), e, quando isto ocorre, a resiliência da população geneticamente erodida é reduzida drasticamente. Por outras palavras, se não existir co-tolerância (*sensu* o mesmo mecanismo confere tolerância a vários contaminantes) ou tolerância múltipla (*sensu* a tolerância vários contaminantes é conferida por vários mecanismos específicos) a vários contaminantes nos genótipos que permanecerem na população, então pulsos sucessivos de concentrações parcialmente letais de diferentes químicos pode levar ao desaparecimento da população, mesmo que o intervalo de tempo entre os pulsos de contaminação seja suficiente para a população recuperar os níveis iniciais de densidade.



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste estudo parecem apoiar a hipótese do distúrbio intermédio e constituem mais uma evidência de ocorrência de erosão genética em populações expostas a contaminação química. Estes factos evidenciam a necessidade de efectuar a avaliação da perda de diversidade genética em populações naturais aquando a realização de análises de risco ecológico. Tal como foi demonstrado por este trabalho, a avaliação de alterações nas densidades populacionais não é suficiente para avaliar os efeitos ecológicos que os contaminantes podem provocar no ambiente e informação referente a tolerância múltipla e co-tolerância é altamente importante para a prevenção da extinção de populações em ecossistemas perturbados.

agradecimentos • Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) (PRAXIS/BPD/22855/2005; SFRH/BD/10674/2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTM (2002). Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, microinvertebrates, and amphibians. *In: Annual Book of American Society of Testing and Materials Standards*, Philadelphia, PA, USA.
- Baird DJ, Barber I, Bradley MC, Soares AMVM, Calow P (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21: 257-265.
- Baird DJ, Soares AMVM, Giriling A, Barber MC, Calow P (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: Problems and prospects. *In: Proceedings 1st European Conference on Ecotoxicology*, Lyngby, Denmark, pp 144-148.
- Bagley MJ, Franson SE, Christ SA, Waits ER, Toth GP (2002). Genetic diversity as an indicator of ecosystem condition and sustainability: utility for regional assessment of streams in the eastern United States. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.
- Barata C, Baird DJ, Soares AMVM (2002). Determining genetic variability in the distribution of sensitivities to toxic stress among and within field populations of *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 36: 3045-3049.
- Beketov MA, Liess M (2006). The influence of predation on the chronic response of *Artemia* sp populations to a toxicant. *J ApplEcol* 43: 1069-1074.
- Hebert PDN, Beaton MJ (1993). *Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis*. Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA.
- Lopes I, Baird DJ, Ribeiro R (2005). Genetically determined resistance to lethal levels of copper by *Daphnia longispina*: Association with sublethal response and multiple/coreistance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1414-1419.
- Milone MT, Sgherri C, Clijsters H, Navari-Izzo F (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 50:265-276.
- Morgan AD, Buckling A (2004). Parasites mediate the relationship between host diversity and disturbance frequency. *Ecology Letters* 7: 1029-1034.
- Naeem S, Li SB (1997). Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390: 507-509.
- Pianka ER (2000). *Evolutionary Ecology*. Benjamin Cummings, New York, 512 pp.
- Shea K, Roxburgh SH, Rauschert ESJ (2004). Moving from pattern to process: coexistence mechanisms under intermediate disturbance regimes. *Ecology Letters* 7: 491-508.
- Shirley MDF, Sibly RM (1999). Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53: 826-836.
- van Straalen NM, Timmermans MJ (2002). Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Human & Ecological Risk Assessment* 8: 983-1002.
- Theodorakis CW (2003). Establishing causality between population genetic alterations and environmental contamination in aquatic organisms. *Human & Ecological Risk Assessment* 9: 37-58.
- Ward TJ, Robinson WE (2005). Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 2341-2349.
- Weider LJ (1992). Disturbance, competition and the maintenance of clonal diversity in *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 505-522.
- Xie L, Klerks PL (2004). Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1499-1503.