

Contributo para o conhecimento da biodiversidade regional – estudos em *Megabalanus azoricus* (Pilsbry, 1916).

Dionísio, M.¹, A. Pagarete² & Costa, A.³

^{1,2,3} CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Pólo Açores, Portugal; 2 – Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Rua da Mãe de Deus Apartado 1422, 9501-855 Ponta Delgada, Açores, Portugal. Tel. +351 296650100; Fax: +351 296650101

e-mail: ¹ anamdionisio@gmail.com; ² pagarete@sb-roscoff.fr; ³ accosta@notes.uac.pt

RESUMO:

Megabalanus azoricus (Pilsbry, 1916) é uma espécie nativa do arquipélago que apesar de ser reconhecida em toda a região onde sofre uma elevada exploração, só agora foi objecto de um estudo alargado. Apresentam-se aqui os primeiros resultados do projecto POCI/MAR/58185/2004 financiado pela FCT que visa o estudo dos aspectos da biologia desta espécie considerada pela OSPAR em risco e com necessidade de estudo urgente. A descrição de *Megabalanus azoricus* foi revista e pela primeira vez obtiveram-se larvas em laboratório. Iniciou-se uma inventariação de populações em várias ilhas do Arquipélago. Os estudos de reprodução realizados, baseados no estudo macroscópico e estereológico das gónadas de uma população de São Miguel permitiram verificar que estas cracas nos Açores apresentam-se sexualmente maduras ao longo de todo o ano, embora não se tenha registado produção de ovos em Novembro, Março e Agosto. Foram comparadas algumas populações provenientes de várias ilhas através da comparação das respectivas sequências de DNA de dois fragmentos COI-COII e 18S-ITS1 tendo-se verificado uma baixa variabilidade nos haplotipos de ambos os marcadores, o que não suporta níveis de diferenciação significativos entre as populações.

Introdução

O estudo da biologia reprodutiva de *M. azoricus* foi realizado na Ilha de São Miguel, no Arquipélago dos Açores. As linhas de costa destas ilhas não apresentam habitats abrigados, nomeadamente em São Miguel, onde a costa apresenta maioritariamente situações de exposição elevada. Durante o Inverno ocorrem tempestades marítimas bastante violentas (Macedo, 2002) e, mesmo no Verão, ondas geradas longinquamente

atingem frequentemente a costa

A descrição destes organismos e sua inclusão numa classe foi fonte de muitas polémicas entre os primeiros naturalistas. Em 1758, Lineu, na sua obra *Systema Naturae*, classificou-os como moluscos. No entanto, Thompson (1930) e Burmeister (1934) demonstraram definitivamente que os cirrípedes eram crustáceos. No entanto, a confusão com moluscos, marcou a descrição dos cirrípedes, afectando a designação de algumas partes do corpo, como por exemplo, a denominação de manto, que é utilizada para os moluscos como a cavidade do manto, designação pouco utilizada nos crustáceos (Love, 2002).

A maioria dos cirrípedes são hermafroditas, estratégia sexual pouco utilizada pela maioria dos crustáceos. As populações de cirrípedes, regra geral, são densas o que assegura que um indivíduo tenha um ou mais parceiros para perpetuar a espécie (Walker, 1992; Høeg, 1995). Existem também espécies que vivem mais isoladas, com densidades mais baixas, com outras estratégias que não a fertilização cruzada. Em caso de não existir nenhum parceiro os indivíduos podem recorrer à autofertilização (Ghiselin, 1969; Stubbings, 1975; Furman & Yule, 1990; Walker, 1992; Southward, 1998).

A reprodução pode ter vários padrões tal como: uma grande postura uma vez ao ano ou posturas durante todo o ano (Dando, 1987; Harris, 1990; Anderson, 1994). Crisp (1986), após comparar o ciclo reprodutivo de várias espécies em vários locais chegou à conclusão que espécies de cracas que vivem em latitudes mais elevadas têm apenas uma postura por ano ao passo que, espécies que habitam em latitudes mais baixas onde as temperaturas são mais altas e com condições mais favoráveis, realizam várias posturas ao longo do ano (Walker, 1992).

Para a eclosão dos ovos é necessário que os indivíduos se encontrem bem alimentados uma vez que Clare (1987) observou que apenas cracas nestas condições libertavam náuplios. O ciclo de vida de uma craca inclui quatro grandes fases: ovos, larvas planctónicas (náuplios), larvas planctónicas lecitotróficas (cipris) e adultos sésseis (Brind'Amour *et al.*, 2002). Na generalidade as cracas apresentam VI fases larvares de náuplios e uma de cipris, todas planctónicas (Nilsson-Cantell, 1978).

As primeiras descrições de cirrípedes açorianos foram realizadas por Drouët (1858) e, posteriormente, por Barrois (1896). Mais recentemente Young (1998) e Southward (1998) reviram e efectuaram adições à lista de cirrípedes açorianos. Registando-se actualmente a presença de 57 espécies de cirrípedes, a maioria das quais, em grandes profundidades ao longo da plataforma atlântica, mas a diversidade costeira de cirrípedes é reduzida (Southward, 1998). As relações filogenéticas básicas dos cirrípedes foram revistas por Newman & Ross (1976) e as mais de 50 espécies de Megabalaninae em todo o mundo foram, então, divididas em 3 géneros por Newman (1979), nos quais está incluída *Megabalanus azoricus*.

Megabalanus azoricus foi descrita vez sob o nome de *Balanus tintinnabulum azoricus* por Pilsbry em 1916. Esta espécie foi inicialmente denominada como *Lepas tintinnabulum* (Linnaeus, 1758). A sua revisão taxonómica tem sido alvo de inúmeras alterações e Newman & Ross (1976) propuseram uma ascensão do subgénero *Megabalanus* para a categoria de género, pelo que *M. azoricus* passou a constituir espécie.

M. azoricus é relativamente bem distribuída no Arquipélago dos Açores, sendo mais abundante entre 1-2m de profundidade, nas costas rochosas entre a zona intertidal inferior e infralitoral (Young, 1998; Morton *et al.*, 1998; Southward 1998). Hawkins *et al.* (2000) descrevem também o habitat desta espécie, reforçando a ideia que *M. azoricus* está maioritariamente distribuída junto à linha de maré baixa e acrescentam a preferência da espécie por zonas mais expostas da costa, apresentando adaptações a este tipo de habitat, tal como, a forma da muralha, que minimiza a resistência às correntes e às ondas, conferindo-lhe vantagens adaptativas no que respeita à dissecação, de acordo com as condições envolventes (Southward, 1998).

Esta craca faz parte dos recursos vivos marinhos explorados artesanalmente nos Açores (Santos *et al.*, 1995). Os indivíduos “bicos” são capturados manualmente a baixas profundidades com o auxílio de um martelo e um escopro (Santos *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1998). Os valores da descarga em lota desta espécie apresentam aumentos superiores a 115% na última vintena de anos tendo atingido o maior volume em 2004, após o que se tem vindo a observar uma queda abrupta nas descargas até 2006 (Figura 1).

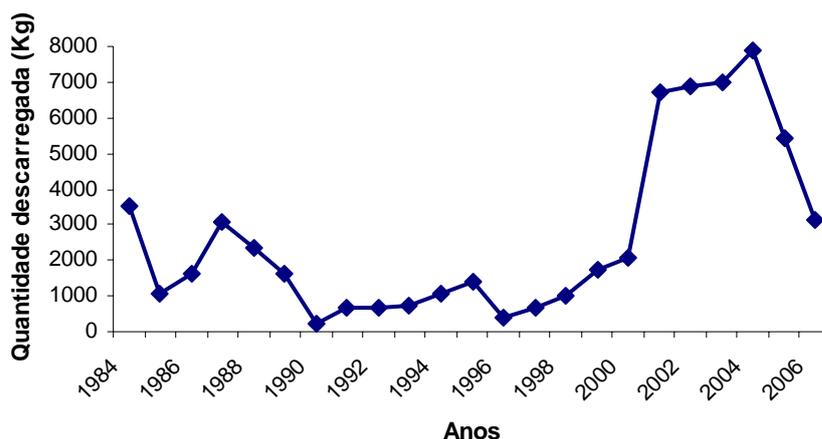


Figura 1 -Descargas de *M. azoricus* nas lotas Região Autónoma dos Açores entre 1984-2007. Fonte dos dados – LotaAçor (Serviço Açoriano de Lotas, E. P.)

Segundo Santos *et al.* (1995) este recurso natural parece estar a sofrer uma sobre-exploração. Em 1986, foi proibida a captura de cracas nos Açores (Portaria 81/84 do Jornal Oficial). Esta proibição durou apenas um ano, e actualmente, a actividade de exploração, legalmente autorizada, carece de regulamentação. A convenção para a protecção do meio ambiente do Atlântico Nordeste (OSPAR), após a convenção de Oslo (1972) e a convenção de Paris (1974), vem anualmente declarando que *M. azoricus* necessita de um estudo urgente para subsequente e eficaz protecção da espécie. (e. g. OSPAR 1998 a 2006). A *World Wildlife Foundation* (WWF) reforçou em 2004 o apelo da OSPAR.

Assim do mesmo modo que os estudos sobre a reprodução de uma espécie de interesse comercial dão valiosas informações para uma gestão de um recurso vivo também a genética populacional pode contribuir para avaliar até que ponto as várias populações contribuem para o respectivo recrutamento. De facto o papel principal na genética de recursos marinhos tem sido a identificação de unidades de reprodução e gestão: “stocks”. A mobilidade muito pequena da maioria dos invertebrados adultos e frequentemente também das suas larvas pode indicar uma dispersão reduzida e um tamanho de stock também pequeno. Por outro lado, os estudos até agora realizados têm vindo a indicar uma especiação críptica relativamente elevada em invertebrados marinhos. Assim e embora a exploração de invertebrados marinhos não tenha recebido o mesmo nível de atenção por parte dos geneticistas, que as pescas, parece ser claro que os dados genéticos são nesse caso muito mais importantes para garantir uma exploração

sustentada (Thorpe *et al.*, 2000). De facto, já foram nestas latitudes feitos alguns trabalhos especialmente dirigidos a espécies com interesse comercial, como as lapas (*e.g.* Corte-Real *et al.*, 1996 a,b). Níveis pequenos de fluxo genético podem reduzir largamente ou mesmo eliminar divergências de frequências genéticas, o que pode significar um “stock” com alguma dispersão espacial o que por seu lado poderá influenciar grandemente as medidas de gestão do recurso, já que para além da garantia de sustentabilidade há ainda que manter as unidades evolutivamente significativas e consequentemente garantir a diversidade genética da espécie (Avisé 2000).

Material e Métodos

Foram efectuadas amostragens em vários locais da ilha de São Miguel, entre o dia 15 e 20 de cada mês, no período entre Outubro de 2004 e Setembro de 2005. As recolhas foram efectuadas com martelo e escopro em mergulho de escafandro autónomo, entre os 0 e os 3 metros de profundidade e nos locais de melhor acessibilidade, tendo em conta as condições climáticas do dia de amostragem (Figura 2). A amostragem baseou-se nos procedimentos descritos por Cancino *et al.* (1998) e Chan & Williams (2004).



Figura 2 – Locais/ meses de amostragem na ilha de São Miguel.

Foi amostrado uma média de 19 indivíduos por mês. Nos exemplares com lamelas ovígeras, as mesmas foram retiradas e utilizadas para o estudo do desenvolvimento larvar. Os indivíduos dos quais foram retiradas as lamelas foram também utilizados para estudos histológicos.

Todos os indivíduos foram examinados cuidadosamente ao nível de anatomia interna e externa. Em cada indivíduo foram medidas com o auxílio de uma craveira digital os seguintes parâmetros: diâmetro máximo do opérculo, diâmetro máximo da base; altura

máxima da muralha (Carina) e altura mínima da muralha (Rostro); tergo direito e esquerdo (comprimento e largura); scuta direito e esquerdo (comprimento e largura); quando os indivíduos contêm massas de ovos estas são também medidas (comprimento máximo e largura máxima).

Após a dissecação dos indivíduos (separação da massa corporal da muralha), foram registados: peso húmido do indivíduo mais placas; peso das placas; peso das gónadas (masculina e feminina) e peso das massas de ovos (indivíduos maduros). Uma vez que se trata de uma espécie comercialmente explorada, a massa corporal sem placas será designada de massa edível (Regala, 1999).

Considerando o carácter hermafrodita e a anatomia interna de *M. azoricus*, que impede a obtenção do peso da gónada masculina com exactidão e fiabilidade, optou-se pelo cálculo do índice gonadossomático – IGS (Maddock *et al.*, 1998; Favaro *et al.*, 2003), apenas para as gónadas femininas. O cálculo do IGS foi efectuado para os 12 meses de amostragem, de acordo com a seguinte formula: $IGS = \text{Peso gónada} / \text{peso edível} * 100$

A estação reprodutora foi considerada como o período em que se observou presença de lamelas ovíferas nos indivíduos (Sastry, 1983). A fecundidade foi estimada pelo número de ovos contidos no manto de cada indivíduo (Cancino *et al.*, 1998; Dumont & D'Incao, 2004).

A determinação da fertilidade dos indivíduos foi calculada através do total de ovos das lamelas ovíferas. Estas foram pesadas e retiradas sub-amostras em cada uma delas onde foram contados os ovos (Abelló, 1986), estimando-se os valores para a totalidade da lamela (Murphy, 2003). Mediram-se cerca de 30 ovos de cada indivíduo ovado (eixo maior e o eixo menor) com microscópio óptico utilizando software Image Tools 2.0 (Podolsky, 2001). Ao todo analisaram-se os ovos de 8 indivíduos (Janeiro, Abril, Maio, Junho e Julho). O volume dos ovos foi determinado como $V = 4/3 \pi I^3$ (onde $I = (\text{comprimento} + \text{largura})/2$) (Murphy, 2003).

Foi calculada a percentagem mensal de indivíduos com ovos ou larvas na cavidade do manto (Cancino *et al.*, 1998; Chan & Williams, 2004). **% de indivíduos ovados** = $(N^\circ \text{ de indivíduos com ovos ou larvas} / N^\circ \text{ de indivíduos total colectado}) * 100$.

Para o desenvolvimento larvar foram retiradas as lamelas ovíferas e foram mantidas em

água do mar em goblets. A cultura foi mantida em condições de temperatura e salinidade semelhantes às do meio natural (Yan, 2003): fotoperíodo de 16:8 – Luz: Escuro e arejamento permanente (Chan, 2003). Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com microalgas, *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella sp.*, *Isochrysis sp.* (Okano *et al.*, 1996; Yan, 2003; Thiyagarajan *et al.*, 2003).

Para os estudos histológicos, foram utilizadas 10 gónadas femininas e 10 masculinas dos seguintes meses: Outubro 2004 (Outono); Janeiro 2005 (Inverno); Abril 2005 (Primavera) e Julho 2005 (Verão). Os Meses de amostragem foram seleccionados com base no estudo de Cúrdia (2005).

Após removidas as gónadas foram fixadas com formalina tamponada 10% em água do mar (Bancroft & Stevens, 1996). Decorridas 12 horas de fixação as gónadas foram sujeitas a procedimentos histológicos de rotina para microscopia óptica (Humanson, 1979) que consistiram na desidratação dos tecidos em etanol, impregnados com xilol e incluídos em parafina a 60°C. Os cortes foram efectuados no micrótomo com uma espessura de 7 µm, o método de coloração utilizado foi o de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Rodrigues, 2000).

A densidade volumétrica relativa dos gâmetas foi estimada por método estereológico com o sistema de teste “M168 Weibel Multipurpose Test System” que permite estimar o volume do órgão inteiro, avaliando apenas parte dele (Weibel, 1979). Foram identificados três tipos de células para a gónada feminina, aos quais foram associados três estádios de desenvolvimento celular: o ovócito pré-vitelogénico (PV); em vitelogénese (V) e maturo (M) (Cronin *et al.*, 2000; Favaro *et al.*, 2003; Dumont & D’Incao, 2004; Williams & Babcock, 2004). Para a gónada masculina foram identificados quatro estados de desenvolvimento celular: espermatogónia (sg), espermatócitos (st), espermátides (sts) e espermatozóides (sz) (Griffond *et al.*, 1991; Cronin *et al.*, 2000; Favaro *et al.*, 2003; Williams & Babcock, 2004).

Para a medição das células femininas foram analisadas em média 50 células diferentes por estádio. Foram registados o diâmetro maior e o diâmetro menor de cada célula e do respectivo núcleo. As células medidas foram escolhidas ao acaso com o cuidado de se medir apenas células com o núcleo visível de forma a se assegurar que estas estavam seccionadas a meio (Dumont & D’Incao, 2004). A metodologia utilizada para a

medição dos ovócitos foi a mesma que se utilizou para a medição dos ovos.

Para além dos trabalhos referidos em morfologia e reprodução de *M. azoricus*, foi efectuado também um estudo de genética populacional com vista a avaliar até que ponto é que as populações se encontram isoladas. Assim foram obtidas sequências de porções de DNA mitocondrial COI-COII (citocromo oxidase 1 e 2) e um fragmento do genoma entre o gene 18rRNA e o separador interno transcrito (18S-ITS1) num total de 34 indivíduos de quatro populações: Formigas (n=4), São Miguel (n=11), São Jorge (n=10) e Flores (n=9), correspondendo a diferentes pressões de captura.

Tabela 1: Origem dos exemplares utilizados na análise genética e quantidades de *M. azoricus* exploradas em 2004 (Lotaçor, 2005), data da análise e loci analisado e respectivo nº de espécimes por locus (N).

Ilha	Local	Esforço de captura		Locus	N
		(descargas em lota em kg)	Data da amostragem		
São Miguel	Lagoa	2622	Julho 2005	COI-COII	11
				18S-ITS1	11
Formigas	-	Inexistente	Agosto 2005	COI-COII	4
				18S-ITS1	4
São Jorge	Calheta	167	Setembro 2005	COI-COII	9
				18S-ITS1	10
Flores	Ponta da Caveira	Sem registos*	Setembro 2005	COI-COII	9
				18S-ITS1	8

* Sem registos mas o conhecimento local permite-nos dizer que pode ser considerado baixo provavelmente de magnitude equivalente a São Jorge.

Foi calculada para ambos os marcadores (mitocondrial e nuclear) a diversidade genética usando ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005) medida em termos de número de haplotipos, diversidade de haplotipos (\hat{H}) de acordo com o método de Nei's (Nei 1987), diversidade de nucleotídeos (π) de acordo com Tajima (1983), e o nº de locais polimórficos. Foram realizados testes de diferenciação de haplotipos globais entre todos os pares de populações (Raymond and Rousset 1995), e foram calculados para cada uma valores F_{ST} (Weir and Cockerham 1984), com 1000 permutações.

Resultados & Discussão

No início do presente trabalho, existiam apenas as descrições básicas da espécie *Megabalanus azoricus*. Assim, as observações dos espécimes de *M. azoricus* colectados

na costa de São Miguel, durante este trabalho permitiram rever e completar a descrição existente (e.g. descrição das peças operculares)

Os exemplares de São Miguel apresentam uma muralha cilíndrica com 6 placas: rostro, carina, laterais e carino-laterais pares, dispostas, por ordem de sobreposição 1 placa rostro – 2 placas laterais – 2 placas carino-laterais – 1 placa Carina. As cicatrizes de crescimento estão dispostas transversalmente, sendo pouco espessas mas contíguas. As placas da muralha apresentam uma cor rosa-pálido e riscada de um rosa forte, embora a cor não seja sempre óbvia devido à presença de epibiontes .

A abertura opercular é ampla e losangular, por vezes aparentemente triangular nos indivíduos maiores. Esta estrutura mede cerca de metade do tamanho do diâmetro basal – relação abertura opercular/diâmetro basal = 0,49.

O scuta apresenta-se orientado no sentido do rostro, possuindo uma bainha articular evidente que acompanha o segmento tergal até aproximadamente dois terços do seu comprimento. O segmento de inserção é estreito e ligeiramente inflectido. As peças operculares apresentam estrias de crescimento longitudinais, algumas delas fortemente proeminentes e frisadas. A margem da base é lisa e não apresenta protuberâncias. A bainha adutora está bem evidenciada, estabelecendo uma continuidade com a bainha articular. A zona de inserção do músculo adutor está bem definida por uma fenda moderadamente profunda, tal como a zona de inserção do músculo depressor lateral que se apresenta moderadamente profunda mas pouco vincada (Figura 3).

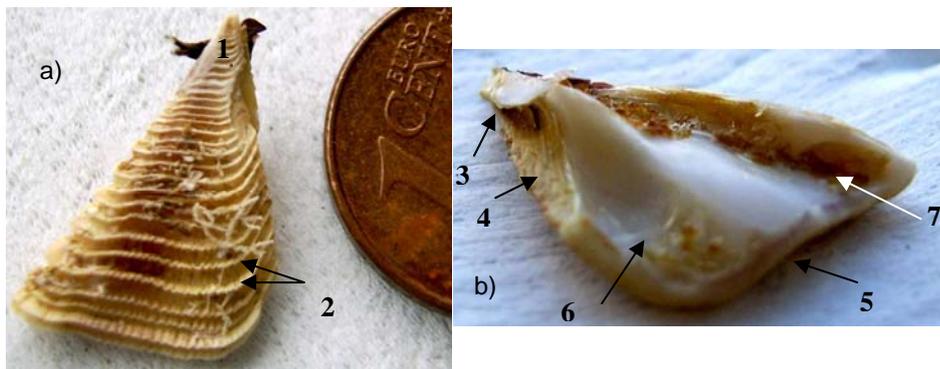


Figura 3 - Scuta de *M. azoricus* de onde a) face externa e b) face interna; 1- apex; 2- bandas ou estrias de crescimento; 3- segmento de inserção; 4- bainha articular; 5- margem da base; 6- zona de inserção do músculo adutor; 7- zona de inserção do músculo depressor

O tergo está orientado no sentido carinal, apresenta-se largo e com um apex contundente. Em *M. azoricus*, a base do tergo termina num apêndice calcário que é denominado de fossa da espora. A espora é moderadamente curta, separada do ângulo basicutal por, pelo menos duas vezes a sua largura. A margem basal descreve um declive em direcção ao lado carinal. As estrias de crescimento são proeminentes mas não frisadas, sendo mais evidentes e mais profundas em particular no lado scutal. Internamente, a bainha articular estende-se até três quartos da margem scutal. As franjas de inserção dos músculos depressores são pouco desenvolvidas. As cicatrizes de crescimento são muito visíveis, mas não são fáceis de ser contadas uma vez que a zona do apex da placa apresenta sempre um grande desgaste, o que “apaga” as cicatrizes macroscópicas. (Figura 4)

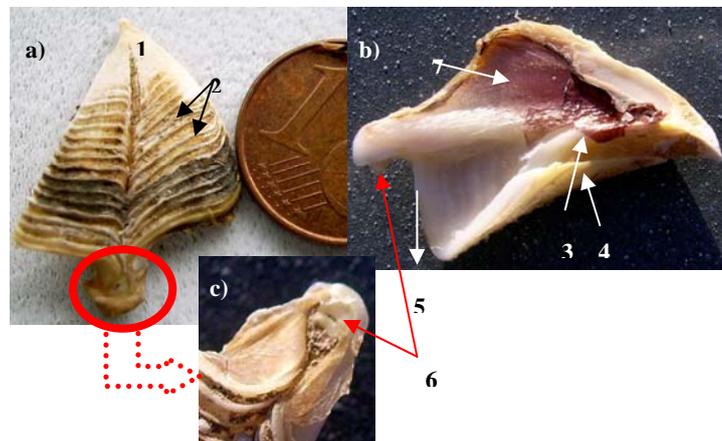


Figura 4 - Tergo de *M.azoricus* de onde a) face externa, b) fossa da espóra e c) face interna; 1- apex; 2- bandas ou estrias de crescimento; 3- segmento de inserção; 4- bainha articular; 5- margem da base; 6- fossa da espóra; 7- zona de inserção do musculo depressor.

A “re-descrição” e análise cuidada de toda a estrutura de *M. azoricus* foi essencial uma vez que foram acrescentadas algumas características importantes tais como a descrição da muralha, abertura opercular e peças operculares e estas são geralmente consideradas como boas característica diagnosticantes.

M. azoricus, à semelhança de maior parte das cracas é hermafrodita e apresenta as gónadas feminina e masculina separadas morfologicamente e fisicamente. Os ovários estão localizados pré-oralmente, nas porções basal e parietal do manto, variam de cor entre o branco/creme o laranja passando pelos amarelos. O pénis é tubular, situa-se basidorsalmente, ligando-se aos tubos seminíferos, que são longos e se encontram

enrolados num saco, que contém também o intestino e um par de testículos paralelos ao mesmo (Figura 5).

A cavidade do manto pode alojar os ovos, estes estão distribuídos por duas lamelas independentes, uma de cada lado do manto.

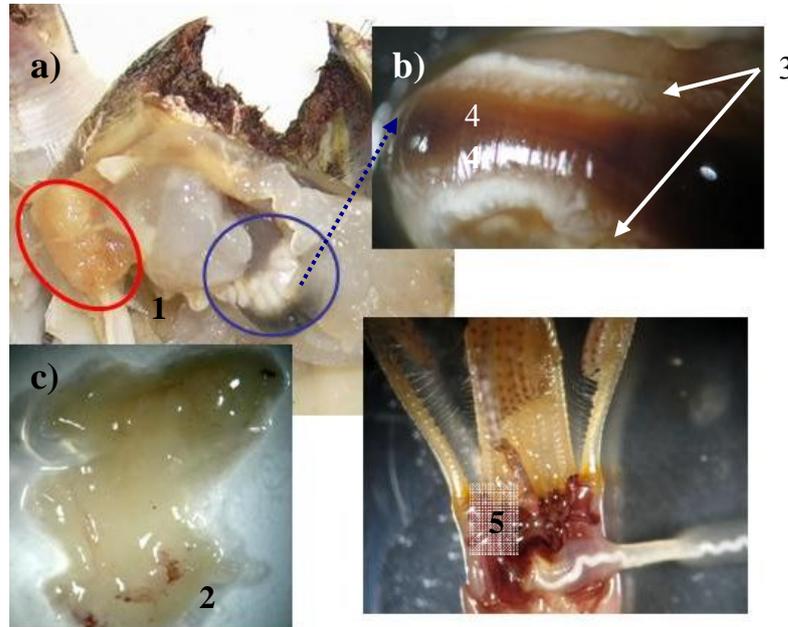


Figura 5 - Sistema reprodutor de *M. azoricus* de onde a) vista geral das gónadas, b) testículo, c) ovário e d) pénis. 1- Ovário com coloração laranja; 2- Ovário com coloração creme; 3- testículos; 4- intestino; 5 -pénis com inserção basidorsal.

Foram registados os parâmetros morfométricos num total de 215 exemplares colectados entre Outubro de 2004 e Setembro 2005. Na Tabela 1 pode observar-se que de todos os parâmetros morfométricos, o diâmetro da base é a maior dimensão enquanto que as peças de menor dimensão são as placas operculares. Observa-se que tantas as terga como as scuta apresentam medidas muito semelhantes com forte relação entre elas. Devido a esta forte relação entre comprimento e largura e lateralidade, optou-se por utilizar como parâmetro de referência, o comprimento do tergo direito. As regressões obtidas entre os diferentes parâmetros apresentam-se na tabela 2.

Tabela 2. Coeficiente de determinação - r^2 das funções calculadas para os parâmetros morfométricos e pesos *M. azoricus* de onde: Ø max do op – diâmetro máximo do opérculo; Ø max b – diâmetro máximo da base; m. maior – muralha maior; m. menor – muralha menor; t.d. comp. – tergo direito comprimento; PG – peso da gónada; PE- peso edível. As medidas lineares estão expressas em mm e os pesos em g.

r^2	Ø max op	Ø max b	m. maior	m. menor	td. comp	PE	PG ♂
Ø max b	0,38						
m. maior	0,36	0,45					
m. menor	0,30	0,32	0,34				
td. comp.	0,59	0,63	0,55	0,49			
PE	0,66	0,70	0,62	0,54	0,91		
PG ♂	0,53	0,67	0,47	0,43	0,72	0,76	
PG ♀	0,47	0,57	0,55	0,47	0,77	0,86	0,67

O estudo de morfometria evidenciou a simetria interna, denotada pela simetria das peças operculares, providenciando um leque de relações entre as diferentes medidas. Assim sendo, poder-se-á obter vários dados morfométricos com base na extração de apenas um.

As peças operculares e o peso da massa edível apresentam-se como boas medidas de referência para relacionar com outros parâmetros tais como o tamanho da muralha e abertura opércular. Estes dados contribuem não só para um futuro estudo de crescimento como também a possibilidade de estudo dos indivíduos com métodos não destrutivos, como por exemplo fotografia (Schmidt-Nielsen, 1984; Klingenberg & Monteiro, 2005). A boa relação existente entre os parâmetros lineares e a massa edível é muito importante uma vez que *M. azoricus* se trata de uma espécie muito valorizada comercialmente, em que a biomassa é um factor determinante.

À semelhança do já sucedido para outras espécies de *Megabalanus* não foi possível calcular o IGS (Índice Gonadossomático) para a gónada masculina uma vez que devido à localização e à anatomia dos testículos, a sua recolha independente de outros tecidos foi difícil de concretizar, o que poderia distorcer os valores de IGS (Newman & McConnaughey, 1987; Cancino *et al.*, 1998).

Os valores de IGS para a gónada feminina diminuíram entre Outubro e Janeiro mês no qual foram atingidos os valores mais baixos, com uma percentagem de 14. Aumentaram depois até ao mês de Abril onde o IGS atingiu o maior valor (26%). O IGS manteve-se alto em Maio e desceu no mês seguinte para 17% voltando a subir em Julho para voltar a baixar ligeiramente em Agosto e Setembro para perto de 15% (Figura 6). Estas tendências estão de acordo com o esperado após a observação das percentagens mensais

de indivíduos ovados. De facto os valores de IGS variaram inversamente às percentagens de indivíduos ovados, já que há uma impossibilidade de investimento energético simultaneamente na emissão de gâmetas e na sua formação e maturação

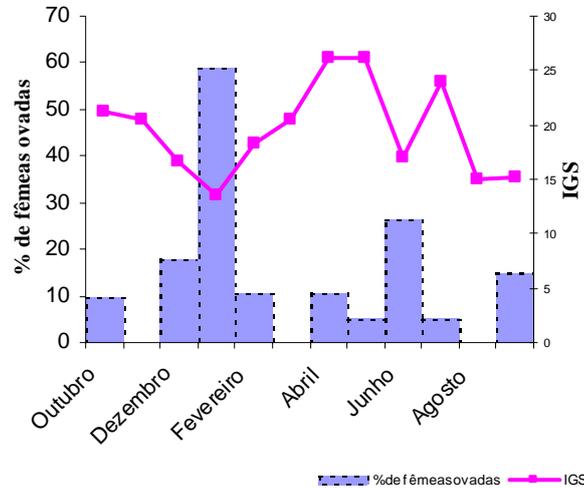


Figura 6 -Percentagens de fêmeas ovadas (em colunas) e os valores de IGS – índice gônado-somático (linha), ao longo dos meses de amostragem.

Quando se relaciona os valores de IGS com fotoperíodo, a temperatura e a percentagem de indivíduos com presença de ovos (Figura 6 e 7), verifica-se que, exceptuando o mês de Julho, o IGS acompanha a variação mensal de fotoperíodo e temperatura de água do mar. Por sua vez, a variação mensal da percentagem de indivíduos com lamelas ovíferas presentes é inversa à variação dos valores de IGS. Estes são significativamente diferentes para os vários meses de análise (ANOVA, $F=9,68$; $P<0,0001$)

No entanto, a interpretação do resultado do teste de Tukey foi difícil e inconclusiva, o que poderá dever-se a uma actividade reprodutiva mais continuo-a do que brusca na reprodução. De facto, os indivíduos da população não se reproduzirão todos ao mesmo tempo, investindo uns na desova enquanto outros estão a investir na maturação das gónadas, o que se reflecte nos valores calculados para de IGS e nos resultados do teste.

Parece existir uma relação entre o fotoperíodo e temperatura da água com o IGS, (Figura 7) que segundo Olivares *et al.* (1991) é bastante grande tal como se observa em *M. azoricus* e os mesmos podem actuar independentemente ou de forma sinérgica com o IGS. De facto, os processos ecológicos são influenciados pelos factores abióticos (condições climáticas) (Saether, 1997), já que o clima afecta o meio marinho,

particularmente na zona superficial da água (0-10 m), mais atreita a ser afectada pela temperatura da água e fotoperíodo (Clare, 1987; Planque *et al.*, 1996).

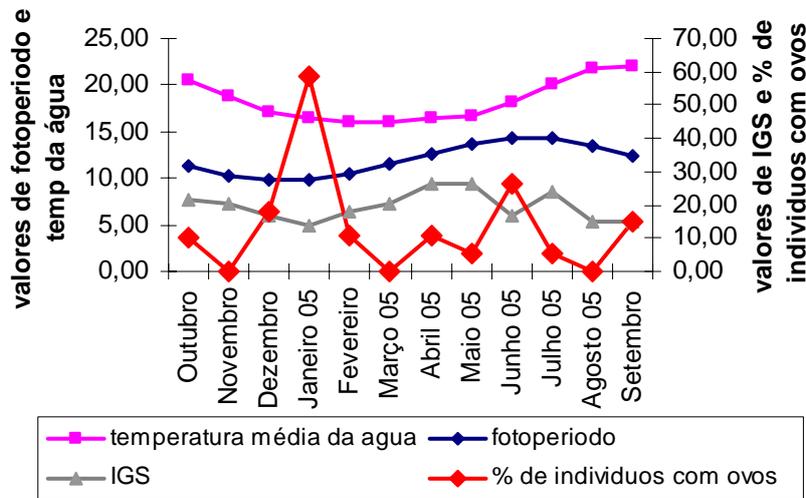


Figura 7 -Variação média da temperatura da água (°C), variação média do fotoperíodo, do IGS e do número de indivíduos com ovos para os meses de amostragem. Dados de temperatura de água e fotoperíodo fornecidos pela Secção de Química do DOP/UAç.

A estação reprodutora prolonga-se durante todo o ano havendo apenas três meses nos quais não foram encontrados indivíduos com ovos na cavidade do manto: Novembro, Março e Agosto (Figura 6 e 7). Podem também observar-se dois picos de abundância de indivíduos com lamelas ovíferas, um em Janeiro e outro em Junho, com uma percentagem de 59 e 26, respectivamente. Janeiro é o mês em que os indivíduos apresentam o IGS mais baixo e é o mês em que foi encontrado o maior número de indivíduos com ovos. Aliás, Janeiro foi o único mês em que mais de metade da população estava ovada, enquanto que em Junho esta condição ocorreu em apenas um quarto dos indivíduos amostrados.

Embora se tenham observado indivíduos com ovos todos os meses, pode observar-se dois picos de reprodução: um em que mais de 50% da população está ovada em Janeiro (Inverno) e outro em que 25% da população está ovada em Junho (Verão). Embora no Inverno as temperaturas sejam mais baixas e o fotoperíodo mais curto, é nesta altura do ano em que o hidrodinamismo é mais alto, o que facilita a dispersão larvar facilitada e aumento do oxigénio dissolvido na água, facto que promove uma melhor oxigenação dos tecidos permitindo menor dispêndio de energia na respiração, podendo essa energia ser investida noutros campos. O pico de Junho surge em sequência de um pico de

fitoplâncton primaveril (Couto, 2004), e consequentemente de um pico de maturação das gónadas femininas, surge também numa época temperatura de água mais altas e fotoperíodos mais longos, aliando também o facto de as diatomácias estimularem a produção de feromonas logo, a reprodução (Walker, 1992; Anderson, 1994).

M. azoricus apresentou uma fecundidade média de $9,8 \times 10^4$ ovos por indivíduo. Variando entre $5,9 \times 10^4$ no indivíduo mais pequeno (18,2 mm de comprimento do tergo direito) e $2,5 \times 10^5$ presentes no maior (22,6 mm de comprimento de tergo direito). Observou-se uma regressão linear (Figura 8), entre a fecundidade e o tamanho de tergo dos indivíduos ($r^2 = 0,93$).

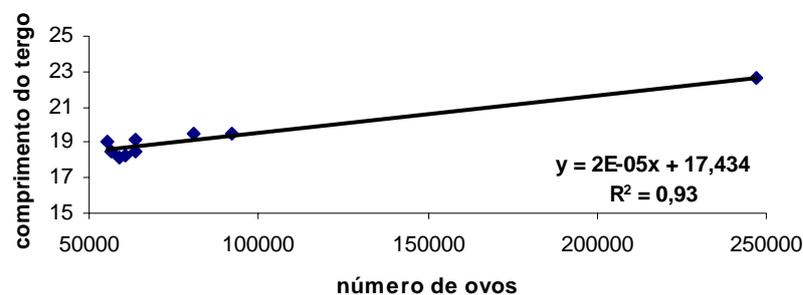


Figura 8. Relação entre os comprimentos do tergo e o número de ovos na cavidade do manto.

Analisando a relação entre o número de ovos e o comprimento de tergo dos indivíduos, observa-se que existe uma proporcionalidade entre o tamanho do animal e a sua fecundidade. De facto, Dhandapani & Fernando (1994) concluíram que o número de ovos estava intimamente ligado com o tamanho do indivíduo, ou seja quanto maior o indivíduo maior número de ovos pode conter. Não só uma maior cavidade do manto permite conter um maior o número de ovos, mas também um indivíduo de maiores dimensões possuirá maiores cirros e portanto com maior capacidade de alimentar, e de obter mais a energia que pode ser utilizada para a reprodução (Barnes & Barnes, 1968). Através da função apresentada na Figura 8 torna-se possível estimar o número de ovos de uma postura de um indivíduo de *M. azoricus* de um determinado tamanho, o que é importante para futuros estudos com a espécie podendo prever-se através do tamanho do indivíduo o número de ovos que ele potencialmente poderá produzir, isto é a sua capacidade reprodutiva, consequentemente a sua contribuição para a renovação de stocks.

Os ovos têm uma forma elipsóide, com um volume médio de $0,014 \text{ mm}^3$, o volume mais pequeno é de $0,0052 \text{ mm}^3$ determinado para um ovo pouco desenvolvido e $0,04 \text{ mm}^3$ para um ovo com desenvolvimento avançado. Pela primeira vez foram obtidas larvas em laboratório. Observou-se a eclosão e alguns estádios de náuplios foram obtidos e estão a ser descritos (Figura 9).

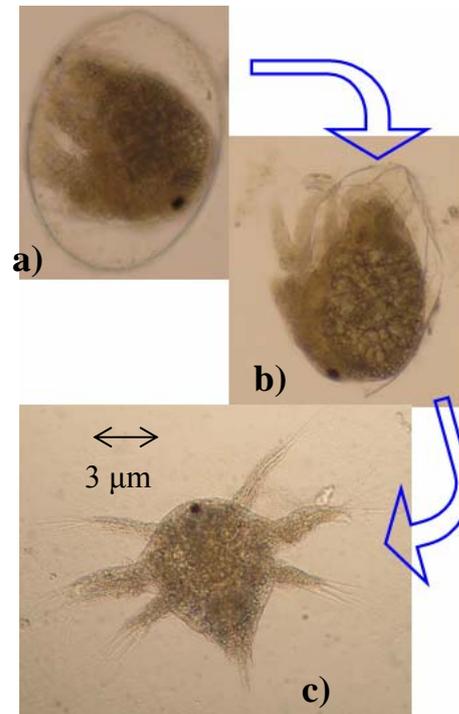


Figura 9. Desenvolvimento larvar de *M. azoricus* de onde a) ovo desenvolvido, b) eclosão do náuplio e c) náuplio.

Constatou-se que em *M. azoricus*, á semelhança do que foi relatado para a espécie de *A. psittacus* por Cancino *et al.* (1998), o desenvolvimento larvar ocorre internamente com o desenvolvimento embrionário até ao estado I de nauplius, altura em que são libertados desenvolvendo-se posteriormente na coluna de agua.

O ovário de *M. azoricus* apresenta-se composto por de numerosos lóbulos esféricos. O estroma é composto maioritariamente por tecido conjuntivo. Internamente no parenquima encontram-se umas bolsas esféricas, os acinos, que contêm em média 7 a 10 ovócitos. O estudo histológico da gonada femenina permitiu pela primeira vez para esta espécie de uma escala de maturação microscópica, escala essa fundamental para futuros estudos desta espécie.

Foram identificados três estádios histológicos de desenvolvimento da gônada feminina semelhantes aos descritos por Cancino *et al.* (1998), de acordo com as características das células observadas nos ovários, foram também acrescentadas á descrições desses estados as características seguintes: Estádio I – Pré-vitelogénico ou imaturo apresentando médias de comprimento do eixo maior $27,57 \pm 1,11 \mu\text{m}$ e de comprimento do eixo menor $21,22 \pm 0,84 \mu\text{m}$ para um volume médio de $7,2 \times 10^4 \pm 7,3 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. O núcleo não é visível; Estádio II – Em Vitelógenese que as células apresentam um comprimento médio de eixo $56,78 \pm 1,71 \mu\text{m}$ e de largura de eixo $43,78 \pm 1,54 \mu\text{m}$; volume $6,1 \times 10^5 \pm 5,8 \times 10^4 \mu\text{m}^3$. O seu núcleo apresenta um diâmetro médio de $18,03 \pm 0,37 \mu\text{m}$ e volume médio de $2,6 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, ocupando em média 4,3% da célula; Estádio III – Maduro com médias de comprimento de eixo das células são de $118,24 \pm 2,91 \mu\text{m}$ e de largura eixo $93,78 \pm 2,19 \mu\text{m}$ com volume médio de $5,3 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^5 \mu\text{m}^3$. O núcleo com um diâmetro médio de $25,65 \pm 0,47 \mu\text{m}$ e volume médio de $7,3 \times 10^4 \pm 3,9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, ocupa em média 1,4 % da célula.

Em todos os meses estudados, mais de 60% dos indivíduos encontravam-se no estágio III. Obtendo-se as maiores proporções destes nas amostras de Abril e Janeiro (79% e 72%, respectivamente) (Figura 10). No entanto não existem diferenças significativas entre as percentagens de indivíduos maduros nos meses analisados (ANOVA, $P > 0,05$).

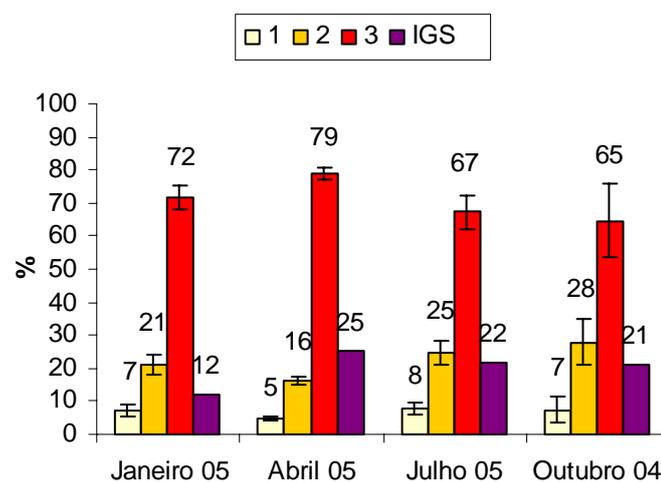


Figura 10 - Estados de desenvolvimento dos ovócitos nos meses estudados, de onde 1 - ovócitos pré-vitelogénicos, 2 - ovócitos em vitelógenese, 3 - ovócitos maduros.

A distribuição de frequências dos diâmetros dos ovócitos, sugere que os ovócitos maturam progressivamente em “lotes” (Figura 11), com os ovócitos maduros

apresentando uma maior variabilidade de tamanhos.

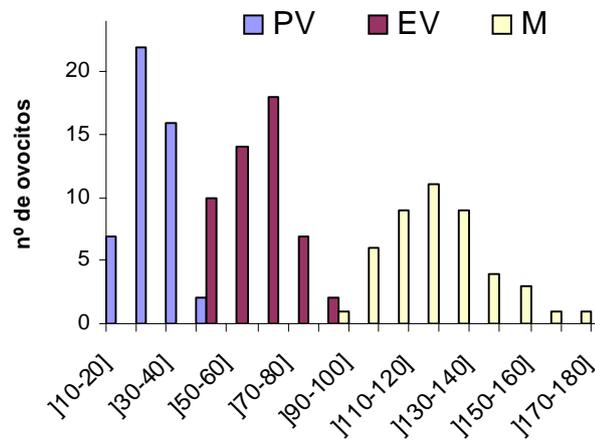


Figura 11 – Frequências dos diâmetros celulares (em µm) para diferentes estados de desenvolvimento células dos ovários de *M. azoricus*, (PV- Ovócitos previtelogénicos; EV – Ovócitos em vitelogénese; M – Ovócitos maduros)

A percentagem de indivíduos em ovulação, determinou-se mediante a análise microscópica das amostras mensais. Para determinar este valor foi necessário considerar tanto a frequência de indivíduos com ovócitos maduros como a frequência conjunta de ovócito pré – vitelogénico mais ovócito em vitelogénese. O início da ovulação coincidiu com uma baixa na frequência do estado II (maduros) da escala de maturação sexual da gónada feminina de *M. azoricus*, em simultâneo com o aumento do estado I (imaturos) da mesma escala (Figura 12).

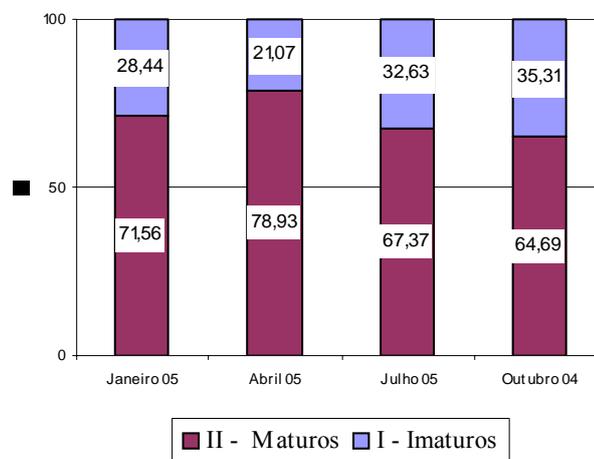


Figura 12 – Indivíduos maduros e imaturos, nos meses estudados segundo a escala de maturação sexual da gónada feminina de *M. azoricus*.

Considerando que os indivíduos com percentagens mais altas de ovócitos imaturos, infere-se que os indivíduos de *M. azoricus* estavam em ovulação no mês de Julho e Outubro (Figura 12). No entanto não se determinaram diferenças significativas entre as percentagens de estados da escala de maturação sexual da gónada feminina de *M. azoricus*, nas amostras analisados (ANOVA; $P > 0,05$).

Por observação das percentagens de indivíduos com ovos e gametogénese pode-se inferir que a população de *Megabalanus azoricus* de São Miguel à semelhança de *A. psittacus* no Chile (e. g. Cancino *et al.*, 1998), apresenta um processo de maturação gamética masculina e feminina durante todo o ano. Este fenómeno poderá dever-se ao facto de os Açores estarem localizados numa zona subtropical, pois existe uma relação entre a duração do tempo de reprodução e o tipo de desova com a latitude. Espécies de latitudes altas, onde o período estival é curto, apresentam uma desova curta com picos bem demarcados e uma desova total. À medida que se avança para o equador (zonas tropicais e subtropicais), o período de reprodução é mais alargado ou poderá mesmo durar todo o ano (Blaxter *et al.*, 1982, Arellano-Martínez *et al.*, 2001).

As análises esteriológicas revelaram a existência de ovócitos em diferentes estádios de maturação, simultâneas na mesma gónada. Pode-se afirmar que *M. azoricus* apresenta um desenvolvimento gonadal assíncrono, com desovas parciais, pois indivíduos com presença de lamelas ovíferas, apresentam simultaneamente ovócitos maduros nos seus ovários. Isto sugere que os ovócitos são maturados e libertados com diferentes tempos. O mesmo facto foi relatado para *A. psittacus* por Cancino *et al.* (1998). Em todas as estações do ano observa-se que pelo menos 65% da gónada está ocupada por ovócitos maduros. As diferenças de tamanho dos ovócitos e, conseqüentemente o espaço por eles ocupados, podem também influenciar os resultados pois um só ovócito maduro poderá ocupar o espaço de 73 células em estado pré-vitelogénico e 9 células em vitelogénese. Embora seja preciso ter em atenção que cada célula em estado maduro demora mais tempo a formar-se e representa um grande investimento energético por parte do indivíduo. Poderá inferir-se que a espécie apresenta desovas parciais uma vez que fêmeas ovadas apresentam simultaneamente lamelas ovíferas e uma percentagem alta de ovócitos maduros nos acinos. Ou então uma fêmea ovada poderá estar apta a ser

fecundada de novo.

Poderá apontar-se que para as fêmeas o Verão e Outono são épocas em que as gónadas estão em reposição dos stocks de células após os picos maiores de evacuação gamética. São as épocas em que se podem observar os valores de IGS maiores apoiando a ideia de que nestes meses os indivíduos estão a investir as suas energias na produção de ovócitos maduros (maturação das gónadas) embora havendo sempre uma parte da população que investe na fecundação e produção de ovos.

Foram identificados quatro estádios da espermatogénese, de acordo com as características morfológicas das células observadas ao microscópio óptico, com base na morfologia nuclear e posição topográfica em relação a outras células e à lâmina basal: Estádio I – Espermatogónias; Estádio II – Espermatócitos; Estádio III – Espermátides; Estádio IV – Espermatozóides

Pela análise mensal da distribuição dos estados descritos anteriormente observa-se que em todos os meses se encontrou uma grande proporção de estados I e II - imaturos e maduros. Obtendo-se as maiores proporções de indivíduos maduros nos mês de Julho com a percentagem de 57 e imaturos no mês de Janeiro e Outubro com percentagens de 55 e 52, respectivamente (Figura13).

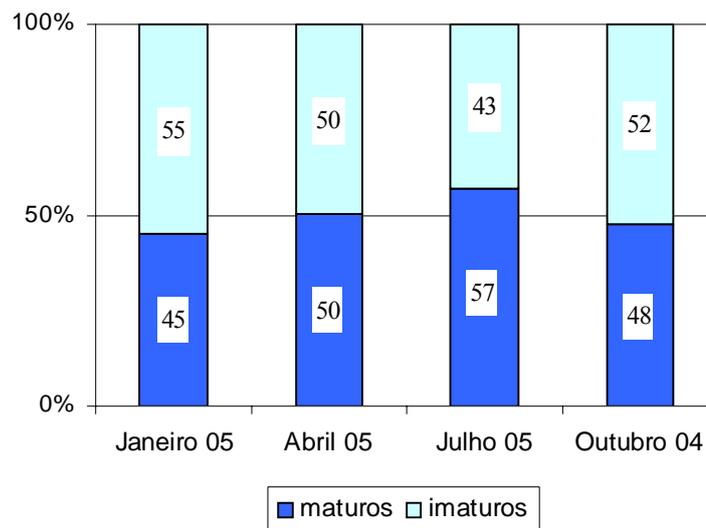


Figura 13-Percentagens de indivíduos maduros e imaturos segundo a escala de maturação sexual da gónada masculina de *M. azoricus*, para os meses em consideração.

Considerando que os indivíduos com percentagens mais altas de espermatogónias e espermatócitos (estados imaturos) estão em início de maturação (Cancino *et al.*, 1998), infere-se que os indivíduos de *M. azoricus* estavam em início de maturação das gónadas masculinas nos meses de Janeiro e Outubro.

A espermatogénese em *M. azoricus* ocorre de modo semelhante ao descrito para outras espécies de cracas (e.g. *Balanus amphitrite*, *Semibalanus balanoides*, *Austromegabalanus psittacus*). Os espermatozóides são filiformes com distinção clara de cabeça e cauda, à semelhança dos observados para os *thoracica*, *acrothoracica* e *rhizocefala*.

Aparentemente todos os indivíduos se apresentam permanentemente prontos para a emissão de gâmetas masculinos o que pode fazer crer que a estratégia de reprodução em *M. azoricus* será hermafroditismo simultâneo, com fertilização cruzada em que cada indivíduo está apto a desempenhar o papel de macho ou fêmea. Verifica-se este fenómeno nos indivíduos estudados de *M. azoricus*, todos os indivíduos flutuam numa percentagem de 50% de estádios masculinos maduros enquanto que as gónadas femininas nunca apresentam uma percentagem menor de 65% de estádios maduros. Esta percentagem distancia-se um pouco dos 50 porque os estudos de esterilogia efectuados consideram o volume ocupado pelas células e os ovócitos maduros ocupam um pouco mais espaço que os imaturos. O factor tamanho dos gâmetas não influencia no estudo da espermatogénese, tal como influencia na ovogénese, pois todos os gâmetas masculinos são significativamente ($P < 0,005$) mais pequenos que os femininos. A diferença deve-se ao facto de não ser utilizada tanta energia na produção de um espermatozóide, como na produção de um ovócito maturo.

Megabalanus azoricus apresenta uma quantidade relativa de espermatozóides que ronda os 50% independentemente da época. O mesmo sucede com as percentagens de espermatozóides para *Chthamalus malayensis* estudado por Yan *et al.* (2006) e *Austromegabalanus psittacus* estudado por Cancino *et al.* (1998), ambos apresentando produção contínua de espermatozóides, o que também ocorre com *M. azoricus*.

No fragmento de 137 pares de bases da região de DNA nuclear 18S-ITS1 a variação haplotípica revelou-se muito baixa. Apenas três haplotipos diferentes em três locais foram obtidos nos 33 indivíduos analisados. No fragmento de 982 pares de bases de

COI-COII de DNA mitocondrial analisado foram encontrados 11 haplotipos num total de 17 locais. A divergência entre os pares de haplotipos foi baixa (<1%). As frequências de haplotipos foram calculadas para as quatro populações (Fig. 14). O fragmento de nDNA apresentou um haplotipo privado em São Miguel, enquanto que os outros dois estavam presentes entre todas as populações. Em relação ao mtDNA as populações também se apresentam caracterizadas por dois haplotipos comuns presentes em todas as populações e vários haplotipos privados para cada população.

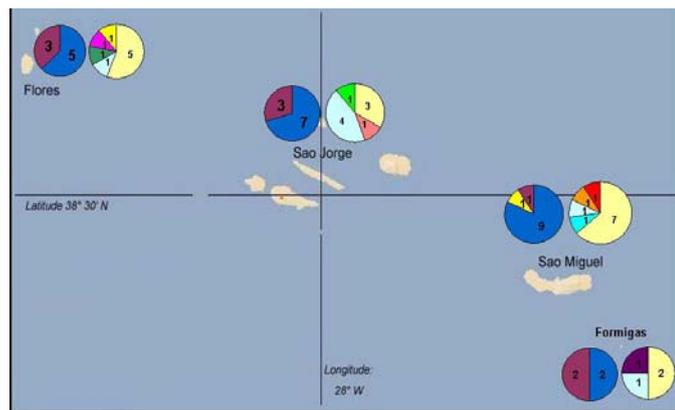


Figura 14 - Frequência de haplotipos nos marcadores 18S-ITS1 e COI-COII (diagramas da esquerda e da direita respectivamente) nas populações amostradas.

Os parâmetros de diversidade molecular para as quatro populações apresentam-se na Tabela 3. Para a região de 18S-ITS1 nDNA a diversidade de nucleotídeos variou entre 0,008 (Flores) e 0,019 (Formigas), e a diversidade de genes 0,346 (São Miguel) e 0,667 (Formigas). Enquanto que para COI-COII a diversidade de nucleotídeos variou entre 0,002 e 0,003, e a diversidade de genes entre 0,618 (São Miguel) e 0,833 (Formigas). Estes parâmetros de diversidade revelam um padrão regular entre as quatro amostras. As Formigas, onde a captura em princípio não ocorre, apresenta os valores mais elevados de diversidade genética para ambos os marcadores mesmo numa amostra pequena ($n=4$), enquanto que em São Miguel, onde ocorre a maior exploração apresenta o valor mais baixo de diversidade de haplotipos.

Tabela 3. Medidas de diversidade genética para os loci estudados (COI-COII e 18S-ITS1) de *Megabalanus azoricus* em quatro localidades (ilhas) do arquipélago. São apresentados os desvios padrões para a diversidade de haplotipos (H) e percentagens de diversidade de nucleotídeos (π), bem como os resultados dos testes de neutralidade por ilha e para a totalidade do arquipélago; a significância do teste D de Tajima foi determinada por 1000 permutações.

<i>Locus</i>	<i>Localidade</i>	<i>(H)</i>	<i>(π)</i>	<i>Tajima's D-test*</i>
<i>COI-COII</i>	São Miguel	0.618 +/- 0.164	0.002 +/- 0.001	-1.5209
	Formigas	0.833 +/- 0.222	0.002 +/- 0.002	1.3652
	São Jorge	0.750 +/- 0.112	0.002 +/- 0.002	0.8168
	Flores	0.722 +/- 0.159	0.003 +/- 0.002	-1.1122
<i>18S-ITS1</i>	São Miguel	0.346 +/- 0.172	0.011 +/- 0.008	-
	Formigas	0.667 +/- 0.204	0.019 +/- 0.016	-
	São Jorge	0.467 +/- 0.132	0.014 +/- 0.010	-
	Flores	0.536 +/- 0.123	0.008 +/- 0.006	-

*Nenhum valor significativo para $\alpha=0,05$

Os níveis mais baixo de diversidade de haplotipos para o nDNA comparativamente com o mtDNA são esperados considerando a mais rápida taxa de mutação é atribuída ao DNA mitocondrial (Avice 1994), o facto de o fragmento 18S rRNA codificar um gene mais conservado apropriado para análise filogenética (e. g. Pérez-Losada *et al.* 2004). A possibilidade de recombinação do nDNA (\square 140 bp) comparado com o mtDNA contribui para este resultado.

Esta abordagem de análise molecular mostrou evidencia de uma não diferenciação genética entre as populações estudadas o que pode estar relacionado com uma colonização recente e subsequente efeito de fundador (Avice 2000). De facto, a genética de populações marinhas, particularmente de espécies com larvas pelágicas tem sido frequentemente caracterizado por uma variabilidade genética baixa entre populações. Estudos anteriores com *Patella aspera* e *P. candei* nos Açores também demonstraram a ausencia de diferenciação genética entre populações (EUMAR Final Report Section 6, 2005).

No entanto é relevante a grande percentagem de alelos privados encontrada no fragmento COI-COII mtDNA. A distribuição destes alelos está provavelmente enviesada pelo pequeno número de amostras analisadas, mas parece haver uma consistência no padrão geral de poucos haplotipos comuns e vários privados. A presença destes alelos privados em *M. azoricus* indica a existência de mecanismos que permitem a esta espécie padrões elevados de variabilidade apesar da exploração. Uma hipótese é considerar que a capacidade de dispersão de *M. azoricus* não é assim tão grande permitindo às populações uma divergência lenta da homogeneidade inicial devida ao efeito fundador (Avice, 2000). Também assumindo que os tamanhos das populações ainda são grandes é possível considerar o efeito de uma selecção antropogénica que favoreça a presença de alelos privados nas populações de *M.*

azoricus. A probabilidade mais elevada da captura sobre os alelos mais comuns poderá permitir uma maior representatividade dos raros.

Considerações finais

O perigo de sobreexploração de *M. azoricus* é grande, embora o grande pico de reprodução seja no Inverno época na qual é difícil apanhar estas cracas. De qualquer modo a espécie é capturada quando está a iniciar o segundo pico de reprodução em Junho, com a agravante de o processo de colonização ocorrer geralmente dentro dos limites dos agrupamentos, são condensados. O que representa que por cada adulto capturado poderão estar fixados muitos juvenis.

Os resultados apresentados neste trabalho ainda não nos permitem tecer considerações sobre tamanho mínimo de captura, devido as características da amostra efectuada (não foram amostrados indivíduos pequenos). No entanto, podemos advogar o estabelecimento cautelar de épocas de em Janeiro e Julho (meses que correspondem aos dois picos de reprodução) e uma maior fiscalização em Julho pois trata-se da época em que existe maior captura dado que é a altura do ano em que se regista maior consumo de marisco, e as condições do mar favorecem a apanha uma vez que a mesma é efectuada em apneia e de martelo. Alternativamente pode sugerir-se que a época de defeso se estabelecesse em Julho já que em Janeiro o estado do mar condiciona fortemente a apanha. Sugere-se também que seja feito um maior controlo por parte das autoridades de modo a garantir a obrigatoriedade da passagem na lota de todas as cracas comercializadas e que sejam estabelecidos máximos de captura de bicos por apanhador por dia. Esta actividade deverá ser licenciada com emissão de licenças pessoais para os apanhadores, que deveriam possuir para além da referida a licença de caça submarina.

Após este estudo desenha-se a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre esta espécie, destacando-se a necessidade de completar o desenvolvimento larvar e estudar taxas de assentamento. Verifica-se ainda a necessidade de alargar a amostragem à recolha de indivíduos mais pequenos para determinação de tamanhos mínimos de captura, completar o estudo mensal da gametogénese e maturação e estudar o crescimento da espécie, particularmente determinando as suas taxas de crescimento.

È importante referir que a diversidade haplotípica era mais baixa em São Miguel, e mais

elevada nas Formigas, dois locais onde a pressão é maior e menor respectivamente. Não foi encontrada uma diferenciação genética entre estas populações mas é importante considerar o reduzido número de exemplares analisados particularmente os das Formigas. No entanto estes resultados preliminares deverão ser considerados como um aviso de que a exploração pode estar a causar uma redução na variabilidade genética deste recurso sobretudo nas ilhas em que esta pressão é mais elevada.

Literatura citada

- Abelló, P., 1986. *Anàlisi des poblacions de crustacis decapodes demersals al litoral Català: Aspectes biològics del brachiur *Liocarcinus depurator**. Resumo da tese apresentada para obtenção de grau de Doutor em Ciências Biológicas. Centre de Publicacions intercanvi i extenso universitària. Universitat de Barcelona. 46 pp.
- Anderson, D. T., 1994. *Barnacles: Structure, Function, Development and Evolution*. Chapman and Hall, London. xii+357 pp.
- Arellano-Martínez, M., A. Rojas-Herrera, García-Domínguez, F., Ceballos-Vázquez, B.; Villalejo-Fuerte, M. 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. *Revista de Biología Marina e Oceanografía* 36(1): 1-8.
- Avisé, J.C. 1994. *Molecular markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, NY.
- Avisé, J.C. 2000 *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Bancroft, J. D. & A. Stevens (Eds), 1996. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 4th Ed. Churchill Livingstone, New York. 765pp.
- Barnes, M. & H. Barnes, 1982. Effect of turbulence on the feeding and moulting of the ciecipede *Balanus balanoides* (L.). giving an algal diet. *Journal Experimental Marine Biology Ecology* 65:163-172.
- Barrois, Th. (1896), Recherches sur la faune des eaux douces des Açores. *Memoires de la Société des Sciences, de l'Agriculture et des Arts de Lille* (5^a série), fasc. 6: 1-272.
- Blaxter, J. H. S. & J. R. Hunter, 1982. The biology of the clupeoide fishes. *Advances in Marine Biology* 20: 1-223.
- Brind'Amour, A. B., E. Bourget and Tremblay, R., 2002. Fecundity, growth rate and survivorship at the interface between two contiguous genetically distinct groups of *Semibalanus balanoides*. *Marine Ecology Progress Series* 229: 173-184.

- Cancino, M. J., Hernandez, C., J. Chong, Otaiza, R., D. Iriarte and Aviles, F., 1998. *Estudio del ciclo vital del Piure Y Picoroco en la VIII region*. Velatorio final do projecto nº 96-49. Universidade Catolica da Santíssima concepção. Valparaíso. xi + 165 pp.
- Chan B. 2003. Studies on *Tetraclita Squamosa* and *Tetraclita japonica* (Cirripedia: Thoracica) II: larval morphology and development. *Journal of Crustacean Biology* 23(3): 522-547.
- Chan, B. K. & G. A. Williams, 2004. Popolation dynamics of the corn barnacles, *tetraclita squamosa* and *Tetraclita japonica* (Cirripedia: Balanomorpha), in Hong Kong. *Marine Biology* 146: 149-160.
- Clare, A. S. 1987. Endocronology of cirripedes. pp. 249 – 266 in Southward, A. J., ed. *Crustacean Issues 5: Barnacle Biology*. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Couto, A.B.2004. *Estudo da Variabilidade Superficial em Montes Submarinos Sedlo e Seine (Nordeste Atlântico) Utilizando Imagens de Satélite NOAA (SST) e SeaStar (OC)*. Relatório Final de Licenciatura em Biologia ramo: Marinha, na Universidade dos Açores. Departamento de Oceanografia e Pescas, Horta.
- Crisp, D. J., 1986. A comparison betewen the reproduction of high and low-latitude barnacles, including *Balanus balanoides* and *Tetraclita* (Tesseropora) *pacifica*. In: Thompson, M. (ED) *Biology of Benthic Marine Organisms in the Indian Ocean*. A. A. Balkema, Rotterdam. 69-84 pp.
- Cronin, M., A. Myers and O’Riordan, R. 2000. The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhappe neritoides* on the West and South coast of Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 100(2): 2470-2478. Williams, J. R. & R. C. Babcock, 2004. Comparison of multiple techniques to evaluate reproductive variability in a marine bivalve: application to the scallop *Pecten novaezelandiae*. *Marine and Freshwater Research* 55(5) 457–468.
- Cúrdia, J., Rodrigues, A., A. Martins and Costa, M. 2005. The reproductive cycle of *Patella candei gomesii* Druet, 1858 (Mollusca: Patellogastropoda), an Azorean endemic subspecies. *Invertebrate Reproduction and Development* 48(1-3): 137-145.
- Dando, P. R. 1987. Biochemical genetics of barnacles and their taxonomy. pp. 73 – 88 In Southward, A. J., ed. *Crustacean Issues 5: Barnacle Biology*. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Dhandapani K. & S. Fernando 1994. *Fecundity of some sessile barnacles with emphasis on fugitive forms from Port Novo, south India*. 133-140 pp. In M.F. Thompson, R. Nagabhushanam, R. Sarojini and M.Fingerman (eds) *Recent Developments in Biofouling Control*. Pxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi.
- Drouët, H. 1858. Mollusques marines des les Açores. *Mémoires de la Société Linéenne de Maine et Loire*. 4 : 1-53.(Não consultado)

- Dumont, L. F. & F. D'Incao, 2004. Stages of gonadal development in females of "Barba-ruça" shrimp (*Artemesia longinaris* – Decapoda, Penaeidae). *Iheringia Séria Zoologia*. 24(4): 389-393.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Favaro, L. F., S. C. Lopes and Spach, H. L. 2003. Reprodução do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard)(Atheriniformes, Atherinidae), em uma planície de maré adjacente à gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 20 (3): 501-506.
- Furman, E. R. and A. B. Youle, 1990. Self-fertilization in *Balanus improvisus* Darwin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 144: 235-239.
- Ghiselin, M. T., 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *Quarterly Review of Biology* 44:189-208.
- Griffond, B., Z. Dadkhan-Teherain, Medina A. & M. Bride, 1991. Ultrastructure of *Helix aspersa* spermatogenesis: scanning and transmission electron microscopical contributions. *Journal of Molluscan Studies* 57: 277-287.
- Harris, V. A. 1990. *Sessile animals of the sea shore*. 1st ed. Chapman and Hall, London
- Hawkins, S., H. Corte-Real, Pannacciulli, F., Weber, L. and Bishop, J. 2000. Thoughts on the ecology and evolution of the intertidal biota of the Azores and other Atlantic islands. *Hydrobiologia* 440(1-3): 3-17.
- Høeg, J. T. 1995. Sex and single cirripede: A phylogenetic perspective. pp. 195 - 208 In Schram, F. R. & J. T. Høeg, (ed.) *Crustacean Issues 10: New frontiers in Barnacle evolution*. A. A. Balkema, Rotterdam
- Hummason, G.L. 1979. *Animal tissue techniques*. 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, C. A, USA. 661 pp.
- Instituto Hidrográfico (Ed) 1981. *Roteiro do Arquipélago dos Açores*.144pp.
- Klingenberg, C. & L. Monteiro. 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology* 54:678–688.
- Love, A. C. 2002. Darwin and Cirrepedia prior to 1846: Exploring the origins of the barnacle research. *Journal of the History of Biology* 35: 251-289
- Macedo, F. L., 2002. *Biótopos do intertidal rochoso da Ilha de São Miguel (Açores): Relatório de estágio para conclusão de licenciatura em Biologia – Ramo de Biologia Marinha*. Universidade dos Açores. Ponta Delgada. iv + 67 pp.
- Maddock D. M. & M. P. Burton., 1998. Gross and histological of ovarian development

- and related condition changes in American plaice. *Journal of Fish Biology* 53: 928-944.
- Morton, B., J. C. Britton and Marins, A. M. 1998. *Ecologia costeira dos Açores*. Sociedade Afonso Chaves – Associação de Estudos Açoreanos. Ponta Delgada, Portugal, 249 pp.
- Murphy, J. S., 2003. *An investigation of the reproductive ecology of an intertidal barnacle, Semibalanus balanoides at Avery Point*. An abstract of a thesis submitted in partial fulfilment of the Requirements for Degree of Master of Arts in Biology. Department of Biology, Central Connecticut State University, New Britain, Connecticut. ii+20 pp.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Newman, W. A. & A. Ross, 1976. Revision of the balanomorpha barnacles; including a catalog of species. *Memoirs of San Diego Society of Natural History* 9: 1-108
- Newman, W. A. & McConnaughey, R. R. 1987. A tropical Eastern Pacific barnacle, *Megabalanus coccopoma* (Darwin), in southern California, following El Niño 1982 -83. *Pacific Science* 41(1-4): 31-36.
- Newman, W. A., 1979. On the biogeography of balanomorph barnacles of southern ocean including new balanid taxa: a subfamily, two genera and three species. *International Symposium on Marine Biogeography and Evolution of Southern Hemisphere Proceedings* 137: 279-306.
- Nilsson-Cantell, C. A., 1978. Cirripedia Thoracica and Acrothoracica. Scadinavian University books, Oslo.
- Okano K., Shimizu K., Satuito C. and Fusetani N. 1996. Visualization of cement exocytosis in cypris cement gland of the barnacle *Megabalanus rosa*. *The Journal of Experimental Biology* 199: 2131-2137.
- Olivares, A., A. Bórquez, Tapia L., J. Valdês and S. Conteras 1991. Ciclo reproductivo anual de la "cabrilla común" *Paralabrax humeralis Valenciennes, 1828* (Pisces: Serranidae). *Estudios Oceanológicos* 10: 83-94
- OSPAR. 1998. OSPAR Guidelines for the Guidelines for the Management of Dredged Material – *Convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic* – Ministerial Meeting of the OSPAR commission. Portugal. Sintra. 22 -23 July 1998. 111 pp.
- Pena, A. & J. Cabral, 1997. *Roteiros da Natureza*. 1ª ed. 132pp. Temas e Debates.
- Pérez-Losada, M., Høeg, J.T. & Crandall, K.A. 2004. Unraveling the evolutionary radiation of the thoracican barnacles using molecular and morphological evidence: a comparison of several divergence time estimation approaches. *Syst. Biol.* 53: 244-264.

- Planque, B. & J. M. Fromentin, 1996. Calanus and environment in the Eastern North Atlantic. Spatial and temporal patterns of *C. finmarchicus* and *C. helgolandicus*. *Marine Ecology Progress Series* 134: 101-109
- Podolsky, R. D., 2001. Evolution of egg target size: an analysis of selection on correlated characters. *Evolution* 55(12): 2470-2478.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Regala, J., 1999. *Contribuição para o estudo da biologia da Craca dos Açores, Megabalanus azoricus*. Relatório de estágio para conclusão de licenciatura em Biologia – Ramo de Biologia Marinha. Universidade do Algarve. Faro.
- Rodrigues, A. 2000. *Biologia funcional do aparelho reprodutor de Oxychilus (Drouetia) atlanticus (Morelet & Drouet) (Pulmonata: Zonitidae)*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Biologia, especialidade de Anatomia e Taxonomia Zoológicas, apresentada à Universidade dos Açores. Ponta Delgada.
- Saether, B. E., 1997. Environmental stochasticity and population dynamics of large herbivores: a search for mechanisms. *Trends Ecologic Evolution*. 12: 143-149.
- Santos, R. S., S. Hawkins, Monteiro, L. R., M. Alves and Isidro, E. J. 1995. Marine research, resources and conservation in the Azores (case studies and reviews). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 5: 311-354.
- Sastry, A. N., 1983. Ecological aspects of reproduction. in Bliss, D. E. (Ed). *Biology of Crustacea vol. 8: environmental adaptations*. 179-270 pp. Academic Press Inc.
- Schmidt-Nielsen, K. 1984. *Scaling: why is animal size so important?* Cambridge University Press. New York. 241 pp.
- Southward, A. J. 1998. New observations on barnacles (Crustacea: Cirripedia) of the Azores region. *Arquipélago, Life and Earth Sciences*, 16: 11-27.
- Stubbings, H. G. 1975. *Balanus balanoides*. Liverpool University Press. Liverpool 185 pp.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Thiyagarajan V., T. Harder, Jian-Wen Qiu & Pei-Yuan Qian. 2003. Energy content at metamorphosis and growth rate of the early juvenile barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Biology* 143: 543–554.
- Thorpe, J. P., A. M. Solé-Cava & P. C. Watts 2000 Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hydrobiologia* 420(1): 165-184

- Walker, G., 1992. Cirrropedia. pp. 249-311 In Harrison, F. W. & A. G. Humes (Eds). *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 9 – Crustacea*. Wiley-Liss, New
- Weibel, E. R., 1979. *Stereological methods*, Academic Press Inc., London
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- WWF, 2004. Living Planet Report. Acedido em 20 de Abril de 2006 em http://www.panda.org/news_facts/publications/key_publications/living_planet_report/lpr04/index.cfm.
- Yan Y. 2003. Larval development of the barnacle *Chinochthamalus scutelliformis* (Cirrropedia: Chthamalidae) reared in the laboratory. *Journal of Crustacean Biology* 23(3): 513-521.
- Yan, Y., Chan, B.K.K. and Williams G.A. (2006). Reproductive development of the barnacle *Chthamalus malayensis* in Hong Kong: implications for the life history patterns of barnacles on seasonal, tropical shores. *Marine Biology* 148:875-887(SCI).
- Young, P. 1998. Cirrropedia (Crustacea) from the “ Campagne Biazores” in the Azores region, including a generic revision of Verrucidae. *Zoosystema* 20 (1). 31-92.