



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas



Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre

**Diapausa em *Daphnia* de ambientes aquáticos tropicais permanentes:  
fatores que influenciam a formação e eclosão de ovos de resistência**

Thécia Alfenas Silva Valente Paes

**Belo Horizonte - MG**

**2015**

**Thécia Alfenas Silva Valente Paes**

**Diapausa em *Daphnia* de ambientes aquáticos tropicais permanentes:  
fatores que influenciam a formação e eclosão de ovos de resistência**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos  
requisitos para a obtenção do grau de doutor em  
Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre

**Belo Horizonte- MG**

**2015**

Esta tese foi realizada no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) – Departamento de Biologia Geral – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

**ORIENTADOR:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paulina Maria Maia Barbosa

**CO-ORIENTADOR:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Arnola Cecília Rietzler

**APOIO FINANCEIRO E INSTITUCIONAL:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Programa Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD) / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Instituto Estadual de Florestas (IEF) / Parque Estadual do Rio Doce (PERD)

*Ao Davi,  
pela melhor companhia, compreensão e amor*

## **AGRADECIMENTOS**

Essa parte vai ser grande, mas se faz muito necessária, pois mais importante do que escrever resultados científicos são as relações estabelecidas com as pessoas e que nos permite crescimento. Fico imensamente feliz em ter um espaço reservado para isso.

Agradeço a Deus por me colocar cercada de pessoas de bom coração. Por me fortalecer com momentos de dificuldade, por me reerguer quando me faltava esperança, por me manter perseverante e otimista. Por toda inspiração para desenvolver esse trabalho.

À minha querida orientadora Paulina, pelos questionamentos norteadores, que auxiliaram no desenvolvimento do meu raciocínio em relação às perguntas que pretendíamos responder. Gostaria de agradecer pela compreensão, pois mesmo diante de tantas cobranças ela permitiu que eu desenvolvesse o meu trabalho no meu tempo e espaço, colaborando efetivamente com leituras minuciosas e enriquecedoras. Sob sua orientação eu tive autonomia para desenvolver o que eu quisesse, pude expressar meu lado criativo e me sentir satisfeita com minhas produções.

À minha co-orientadora Arnola, pelas leituras críticas e sugestões, e pelas palavras de otimismo diante das dificuldades.

À banca da qualificação, professores Francisco Barbosa, Marcos Callisto e José Fernandes Bezerra-Neto, pelas considerações que auxiliaram para a publicação do meu primeiro trabalho Qualis A. Ao meu tutor Jayme Santangelo pelas excelentes sugestões e pelo tempo dedicado. A Cláudia Bonecker pela participação na banca final.

Às pessoas que se dispuseram a estar comigo nos dias e noites de coleta. A Mirla e Raquel, pelos conselhos e amizade. A Paulinha e Liss pelo carinho. Cinthia e Janaína pela alegria. Ao Daniel pelo companheirismo. Ao Diego pelas parcerias. A Rosinha pela doçura. À Alessandra pela companhia e gargalhadas. Ao Marcelo e Graça pela boa vontade em ajudar. À Luciana, Ludimilla, Laura, Marcela, Maione, Lorena(s), Clau, e aos demais pela ótima convivência e risadas. Neste grupo, LIMNEA, a cooperação prevalece e eu me sinto muito feliz em fazer parte dessa Equipe.

A Izabela Dias, Lorena Brito e Grace Kelly pelo auxílio com os experimentos, pela confiança depositada e por me permitirem crescer profissionalmente ao poder auxiliá-las no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao PELD (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração) e LIMNEA, pelo apoio estrutural e financeiro. A CAPES pela bolsa de estudo. Ao programa

ECMVS pelo apoio para participação em congressos. A PROGRAD-UFMG pelo auxílio com a tradução.

Aos secretários Fred e Cris por nos atender com zelo, aos professores pela busca constante de melhoria do nosso curso. Gostaria de parabeniza-los pela iniciativa de produção de relatórios anuais. Eles foram de extrema importância para o desenvolvimento mais suave da escrita de minha tese.

A minha família, que sempre me apoiou e acreditou em mim em todos os momentos, por sempre aceitarem minhas decisões e partilhar comigo as alegrias e tristezas.

A todos os amigos que se fizeram presente, mesmo com a distância. Ao Jamis pelo companheirismo e palavras de incentivo. A sua família pelo auxílio com o Davi.

Ao Davi, minha melhor produção, por toda compreensão, palavras sábias de incentivo, pelas brincadeiras que renovavam a alma, por todo amor.

Essa vida de estudante  
Às vezes me deixou frustrada  
O que se faz, parece ser quase nada  
Ser ou não ser, eis a questão  
Ser, pois o que nos move é a paixão  
Às vezes estressa, às vezes cansa  
Mas na UFMG também conheci a dança  
Uma válvula de escape, porque também é preciso  
Para poder distribuir mais sorriso  
Para poder pensar além  
E partilhar coisas do bem  
E durante o Doc, além de produzir artigos,  
Também conquistei novos amigos  
Passei por muitos dilemas  
Mas também produzi muitos poemas  
Então, despeço-me com saudade  
De todas as pessoas queridas  
Que por aqui eu fiz amizade

## Sumário

APRESENTAÇÃO .....	9
INTRODUÇÃO .....	11
Caracterização da área de estudo - Lagoa Jacaré.....	13
Referências Bibliográficas.....	14
Capítulo 1- Techniques for the isolation of resting eggs within ephippium of <i>Daphnia</i>	17
Resumo .....	18
Abstract .....	18
Introduction .....	19
Materials and Methods .....	21
Results .....	23
Discussion.....	27
Acknowledgements .....	30
References .....	30
Capítulo 2- High temperatures and absence of light affect the hatching of resting eggs of <i>Daphnia</i> in the tropics .....	33
Resumo .....	34
Abstract .....	34
Introduction .....	36
Methodology.....	38
Results .....	39
Discussion.....	43
Conclusions .....	46
Ackowledgements.....	46
References .....	47
Capítulo 3- Efeitos de sinais de alarme e de predação na produção e eclosão de ovos de resistência de <i>Daphnia laevis</i> Birge, 1878 de uma lagoa tropical. ....	52
Resumo .....	52
Introdução.....	53
Material e Métodos .....	54
Resultados.....	57
Discussão.....	60
Referências Bibliográficas.....	63
Capítulo 4- Efeito inibitório de <i>Eucalyptus urograndis</i> na eclosão de ovos de resistência de <i>Daphnia ambigua</i> Scourfield, 1947 .....	66
Resumo .....	66
Introdução.....	66
Material e Métodos .....	68
Resultados.....	71

Discussão.....	73
Referências Bibliográficas.....	75
Conclusão geral e perspectivas futuras .....	78



## APRESENTAÇÃO

Essa tese teve como o primeiro objetivo principal avaliar o mecanismo de dormência desenvolvido por *Daphnia laevis* na lagoa Jacaré, Médio do Rio Doce, MG.

Como uma das linhas de pesquisas do LIMNEA consistia em estudar a diapausa em cladóceros e já eram conhecidas as inúmeras dificuldades em se obter taxas de eclosão significativa para efípios de *D. laevis* oriundos da lagoa Jacaré. Assim, se fazia necessário reduzir ao mínimo as chances de erro ao desenvolvermos os experimentos para se avaliar as taxas de eclosão. Percebemos que ao utilizarmos efípios para avaliação da taxa de eclosão, estávamos utilizando, muitas vezes, um material inviável, pois alguns efípios não contém ovos de resistência em seu interior. Surgiu assim, a necessidade de separar ovos de resistência dos efípios. Para tal, reavaliamos algumas técnicas de seleção de ovos de resistência viáveis e estabelecemos um protocolo simples, para este fim. Este trabalho então faz parte do primeiro capítulo da tese, um capítulo metodológico e de grande relevância para estudos que objetivam avaliar a taxa de eclosão de ovos de resistência contidos em efípios.

A partir daí tentamos isolar os possíveis fatores que poderiam atuar na formação e eclosão de efípios para a lagoa Jacaré, reunindo dados de trabalhos anteriores. Sabíamos que as densidades populacionais de *D. laevis* oscilavam na coluna d'água, de acordo com a temperatura. Então, seria a eclosão de efípios influenciada pela temperatura na lagoa Jacaré? Sabíamos que não. E mesmo ao selecionarmos somente os ovos de resistência potencialmente viáveis, nossas taxas de eclosão ainda não eram significativas para a lagoa Jacaré. E diante das dificuldades em se obter resultados positivos para a formação e eclosão de ovos de resistência dessa lagoa, inserimos outros ambientes tropicais para avaliarmos a influência de fatores que poderiam ser determinantes na eclosão dos efípios da região tropical. Desenvolvemos assim, o trabalho referente ao segundo capítulo. Neste, obtivemos a resposta da importância da temperatura e fotoperíodo adequados para a eclosão de ovos de resistência de ambientes aquáticos tropicais, mas ainda com insucesso para a lagoa Jacaré. Este capítulo já foi aceito para a publicação na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Então, desenvolvemos experimentos para avaliar a influência de sinais de alarme e cairomônio de vertebrado e invertebrado na formação e eclosão de ovos de resistência. Mais uma vez obtivemos resultados não satisfatórios para esses fatores em relação à

dipausa, mas observamos alterações em alguns parâmetros da história de vida desses organismos. Estes resultados estão apresentados no capítulo 3.

Por fim, pensamos que os ovos de resistência não eclodiriam devido ao efeito inibitório das folhas de eucalipto que se decompõem no sedimento. Avaliamos algumas concentrações e tempo de exposição dos ovos de resistência em água com folhas de *Eucalyptus urograndis* em decomposição. Experimentos iniciais não nos mostraram o efeito inibitório, mas um outlier nos fez pensar em novos tratamentos e assim verificamos que sob certas condições, as folhas de eucalipto em decomposição poderiam inibir a eclosão dos ovos de resistência. Estes resultados se encontram no capítulo 4. Percebemos que este pode ser um caminho a ser trilhado para a compreensão da ausência de eclosão dos ovos de resistência de *D.laevis* que ocorrem na Lagoa Jacaré.

Os experimentos desenvolvidos ao longo desse doutorado não trouxeram todas as respostas que gostaríamos, mas temos muitas respostas do que não testar. Eles abordaram inúmeros fatores que poderiam explicar o mecanismo de diapausa de *D. laevis* na lagoa Jacaré. No entanto, repensar em outras maneiras de avaliar, outras concentrações, outros tempos de avaliação e exposição aos fatores a serem testados, pode ser de grande valia para se tentar compreender o mistério dessa lagoa. Dizer que estou completamente feliz, não. Mas estou satisfeita, pois novos resultados foram obtidos e novas ideias estarão prontas a surgir a partir do que eu pude desenvolver. Isso é ciência, isso é pensar e fazer acontecer.

## INTRODUÇÃO

Estágios de dormência permitem aumentar o tempo de geração das populações que o produzem (Cáceres, 1998) servindo como um meio de evasão temporal às condições desfavoráveis (Santangelo, 2009). Eles têm o potencial de alterar o resultado das interações, visto que afetam diretamente a dinâmica da população que os produz e, conseqüentemente, a dinâmica dos organismos que interagem com essa população (Cáceres, 1998). Além disso, podem ser indícios de impactos antrópicos (Maia-Barbosa et al., 2003) e também de uma reestruturação que ocorreu na cadeia alimentar.

Em ecossistemas aquáticos, alguns organismos entram em estágio de dormência, dentre eles, a *Daphnia laevis*, um cladóceros pertencente a comunidade zooplanctônica. Eles desempenham um papel fundamental na transferência de energia através da cadeia alimentar, pois atingem a maturidade em período aproximado de um mês, produzindo neonatas quase diariamente, e são as presas mais visadas por vertebrados e invertebrados em ambientes aquáticos. A ausência desses filtradores pode interferir de forma negativa na qualidade da água devido ao aumento da densidade algal (Bernardi et al., 1987). Quando expostos às condições desfavoráveis, os indivíduos zooplanctônicos podem apresentar alterações no comportamento, na morfologia e até mesmo na história de vida visando, em última instância, a manutenção de seu genótipo e a persistência das populações (Santangelo, 2009).

Uma das alterações na história de vida é a formação de ovos de resistência, uma estratégia adaptativa a condições ambientais adversas, sendo considerado um mecanismo de dormência conhecido como diapausa (Ricci, 2001). Quando indivíduos de *Daphnia laevis* entram em estágio de dormência, seu modo de reprodução é alterado. Na maior parte do tempo, sob condições adequadas, prevalece a reprodução por partenogênese cíclica (reprodução assexuada), onde fêmeas partenogenéticas diplóides são capazes de produzir ovos diplóides sem a necessidade de fecundação. Para produzirem estágio dormente as fêmeas passam a produzir machos e ovos haplóides (reprodução sexuada). Os ovos haplóides ao serem fertilizados por machos originam ovos de resistência ou efípios (Nogrady et al., 1993; Santangelo, 2009).

Dentre as alterações ambientais já descritas como estimuladoras de produção desse tipo de ovo destacam-se: variações da temperatura da água e fotoperíodo (Hairston & Kearns, 1995), escassez de recurso alimentar (Gilbert, 1995), dessecação

(Crispim et al., 2003), presença de predadores (Slusarczyk 1995 & Hwan et al., 2009) e elevadas densidades populacionais (Zadereev & Lopatina, 2007).

Os ovos de resistência podem ser a resposta para a melhor compreensão da estrutura temporal e genética das populações zooplancônicas, sendo de grande importância para o estudo ecológico e evolutivo de comunidades e populações. Estágios de dormência preservam a biodiversidade e os bancos de ovos de resistência formados no sedimento conservam a variabilidade genética de espécies que viveram em épocas distintas. Eles representam um testemunho das alterações na estrutura e dinâmica da comunidade zooplancônica, assim como da evolução de populações locais (Crispim e Watanabe, 2000).

Brandão et al., (2012) ao avaliar a dinâmica populacional de *Daphnia laevis* na lagoa Jacaré (entorno do Parque Estadual do rio Doce, MG), durante sete anos de monitoramento, verificaram alterações ligadas aos períodos de seca e chuva. Nos períodos de seca, caracterizados pela desestratificação térmica e menores valores de temperatura, foram registrados aumento na densidade populacional de *Daphnia laevis*, enquanto que nos períodos de chuva, caracterizado pela estratificação térmica e elevados valores de temperatura, redução da densidade dessa população. A formação e eclosão de efípios foi apontada como um dos possíveis fatores explicadores da dinâmica populacional desta espécie no lago.

Em ambientes de regiões temperadas e árticas, a mudança extrema na temperatura é considerada um fator crucial para o início da diapausa (Hairston & Kearns 1995). No entanto, em ecossistemas tropicais, a mudança cíclica de temperatura, condiciona os eventos de estratificação e desestratificação, que promovem uma série de mudanças no ambiente, desde alterações nas características físicas e químicas até alterações biológicas (taxa reprodutiva, competição, predação). Assim, as variações da densidade populacional de *Daphnia laevis* na Lagoa Jacaré durante os períodos de temperaturas elevadas (período estratificado) e temperaturas reduzidas (desestratificado) podem ser apenas reflexos das alterações biológicas que ocorrem nesses períodos como, por exemplo, predação.

Os estímulos que podem induzir a formação e eclosão de efípios instigam muitos pesquisadores que têm trabalhado com a presença de sinais químicos provenientes de presas (sinais de alarme) (Slusarczyk, 1999; Zadereev & Lopatina 2007; Santangelo, 2009) e de predadores (caiomônios) (Pijanowska & Stolpe, 1996; Ning, et al., 2010) e

dentre os invertebrados predadores de zooplâncton, podemos citar as larvas de *Chaoborus* (Diptera). Elas têm sido consideradas como um importante componente na cadeia trófica planctônica. Para alguns lagos do Médio Rio Doce, uma proposta de cascata trófica invertida (Pinto-Coelho et al., 2008) foi descrita. Segundo essa proposta, o aumento da densidade de peixes (exóticos), ocasionou aumento na densidade de larvas de *Chaoborus* devido a redução da pressão de predação desses invertebrados por peixes forrageiros. Assim, as larvas de *Chaoborus* têm sido apontadas como o principal predador de topo da cadeia alimentar zooplanctônica de alguns lagos do Médio Rio Doce. A presença de larvas de *Chaoborus* na lagoa Jacaré foi confirmada por Fuhuhara et al. (1997) e Bezzerra-Neto (2007) que registraram densidades na ordem de 391 ind. m<sup>-3</sup> e 1040 ind. m<sup>-3</sup>, respectivamente.

Além dos efeitos da introdução de espécies exóticas de peixes, a lagoa Jacaré sofre influencia de plantações de eucalipto no entorno, que pode afetar as comunidades e populações devido aos efeitos dos metabólitos produzidos (Graça e Canhoto, 2006; Araújo et al., 2010).

Esse estudo trará informações a respeito dos fatores que podem influenciar a produção e eclosão de efípios nas populações de *Daphnia* em lagoas permanentes tropicais, tendo como objetivos:

- Desenvolver uma metodologia adequada para seleção de ovos de resistência a serem utilizados em estudos de eclosão.
- Estimar a taxa de eclosão de ovos de resistência de *Daphnia* em ambientes aquáticos tropicais, sob diferentes condições de temperatura e fotoperíodo.
- Avaliar o efeito de cairomônios de predadores vertebrados e invertebrados e sinais de alarme na formação e eclosão de efípios de *Daphnia laevis*.
- Investigar se a água contendo folhas de *Eucalyptus urograndis* em decomposição pode inibir a eclosão de efípios.

### **Caracterização da área de estudo - Lagoa Jacaré**

A Lagoa Jacaré (área: 103,09 ha, profundidade: 9,8 metros, coordenadas S 19°48'28.8", W 42°38'55.5") situa-se no trecho médio do rio Doce, próxima ao Parque estadual do Rio Doce (PERD), Minas Gerais, Brasil (figura 1). Essa lagoa apresenta alguns fatores de impacto como a monocultura de *Eucalyptus* sp., o clube de pesca, com

local para camping e despejo de esgotos domésticos, que podem comprometer a qualidade de suas águas (Brandão et al., 2012). Além disso, sua ictiofauna foi drasticamente alterada durante a década de 70, após a introdução de espécies exóticas de peixes para pesca esportiva. (tucunaré- *Cichla kelberi*, piranha- *Pygocentrus nattereri*, bagre africano – *Clarias gariepinus*, tamoatá - *Hoplosternum litoralle* e acará do Amazonas – *Astronotus ocellatus*) (Latini et al., 2004).

A região possui clima quente, com temperaturas médias anuais entre 20 a 22°C. A lagoa Jacaré é um lago monomítico quente, permanecendo termicamente estratificada entre os meses de setembro a abril (chuva), com um curto período de desestratificação entre maio e agosto (seca). As maiores temperaturas da água são observadas no período de estratificação (verão ou chuva), com valores oscilando entre 20,0 e 33,1°C (média: 27,5°C), e menores no período de desestratificação (inverno ou seca) variando entre 22,0 e 28,5 (média: 24,3°C). A concentração de oxigênio dissolvido varia entre 0,01 mg.L<sup>-1</sup> no hipolímnio e 8,5 mg.L<sup>-1</sup> no epilímnio (média: 3,9 mg.L<sup>-1</sup>) e os valores de pH entre 5,0 e 7,7 (média: 6,4), sendo os menores registrados nas maiores profundidades. (Brandão et al., 2012)

Densidades mais elevadas de *Daphnia laevis* (máximo 10.790 org.m<sup>-3</sup>) foram registradas no período de desestratificação da lagoa (época de seca) onde predominam temperaturas mais baixas. Os efípios tem sido registrados no sedimento com abundância média de 13 efípio.cm<sup>-3</sup> não sendo observadas diferenças significativas nas densidades entre os períodos de seca e chuva. Maiores taxas de produção (*in situ*) e eclosão (*in situ* e em laboratório) de efípios foram registradas no período de desestratificação térmica (seca) (Brandão et al., (2012).

### **Referências Bibliográficas**

Araujo, F. O. L., Duarte, L.P., Silva, G.D.F. Carazza, F., Filho, S. A. V. & A. C. Rietzler, 2010. Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de *Eucalyptus urograndis* (mirtaceae). *Quimica Nova*,. 33: 1510–1513.

Bezzerra-Neto, J. N. (2007) Migração vertical diária e cascata trófica em corpos aquáticos tropicais: influência da larva do díptero *Chaoborus*. Trabalho de Tese. Universidade Federal de Minas Gerais.

Cáceres CE. (1998) Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology* 79: 1699.

- Crispim, M.C., Paz, R. J. & Watanabe, T. (2003) Comparison of different *Moina minuta* populations dynamics eclosed from resting eggs in a semi-arid region in Brazil. *Brasilian Journal of Ecology* 2: 33-38.
- De Bernardi, R., G. Giussani & M. Manca.(1987). Cladocera: predators and prey. *Hydrobiologia*, 145: 225-243.
- Graça, M A.S. e C. Canhoto, 2006. Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica*, 25: 1-10
- Fukuhara, H., Torres, G.E. & Monteiro, S.M.C. (1997) Standing crop of zoobenthos in Lakes Dom Helvécio and Jacaré. In: Tundisi, J.G. & Saijo, Y. (eds.), *Limnological studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil*. Brazilian Academy of Sciences. University of São Paulo. School of Engineering at São Carlos. Center for Water Resources and Applied Ecology, p. 335-344.
- Gilbert, J. J. & Schreiber, D. K. (1998) Asexual diapauses induced by food limitation in the rotifer *Synchaeta pectinata*. *Ecology* 79: 1371-1381.
- La, G. H., Jeong, H. G., Kim, M. C., Joo, G. J., Chang, K. H., & Kim, H.-W. (2009). Response of diapausing eggs hatching to changes in temperature and the presence of fish kairomones. *Hydrobiologia*, 635(1), 399–402. doi:10.1007/s10750-009-9913-7
- Latini, A. O., D.P. Lima-Junior, H.C. Giacomini, R.O. Latini, D.C. Resende, H.M.V. Espírito-Santo, D.F. Barros, T.L. Pereira (2004) Alien fishes in lakes of the Doce river basin (Brazil): range, new occurrences and conservation of native communities. *Lundiana* 5 (2):135-142.
- Maia-Barbosa, P.M., Eskinazi-Sant'Anna, E. M., Valadares, C.F. & Pessoa, G.C.D. (2003) The resting eggs of zooplankton from a tropical, eutrophic reservoir (Pampulha Reservoir, south-east Brazil). *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 8: 269–275.
- Ning, N.S.P.N., Nielsen, D.L., Hillman. T.J. & Suter, P.J. (2010) The influence of planktivorous fish on zooplankton resting-stage communities in riverine slackwater regions. *Journal of Plankton Research* 32(4): 411-421.
- Nogrady T., Wallace R.L. & Snell T.W. (1993) *Rotifera*. SPB Academic Publishing, The Hage.
- Pijanowska, J. & Stolpe, G. (1996) Summer diapauses in *Daphnia* as a reaction to presence of fish. *Journal of Plankton Research* 18(8):1407-1412.
- Pinto-Coelho R. M., Bezerra-Neto, J.F., Miranda, F., Mota, T.G., Resck, R., Santos, Maia-Barbosa, P. M., Mello, N.A.S.T., Marques, M. M., Campos M.O. & Barbosa, F. A. R. (2008) The inverted trophic cascade in tropical plankton communities: Impacts of exotics fish in Middle Rio Doce lake district, Minas Gerais, Brazil. *Brasilian Journal of Biology* 64 (4): 1025-1037.

Ricci C. (2001) Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia*, 446, 1-11

Santangelo JM. 2009. Produção, Ecloração e Implicações Ecológicas e Evolutivas dos Estágios Dormentes do Zooplâncton. *LIMNOtemas* 7: 1–36.

Ślusarczyk, M. (1999). Predator-induced diapause in *Daphnia magna* may require two chemical cues. *Oecologia* 119(2), 159–165. doi:10.1007/s004420050772

Zadereev, E., & Lopatina, T. (2006). The induction of diapause in *Moina* by species-specific chemical cues. *Aquatic Ecology* 41(2), 255–261. doi:10.1007/s10452-006-9062-2



**Capítulo 1- Techniques for the isolation of resting eggs within ephippium of *Daphnia***

Thécia Alfenas Silva Valente Paes; Arnola Cecília Rietzler; Paulina Maria Maia-Barbosa\*

Laboratory of Zooplankton Ecology, Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, P.O. Box 486, ZIP Code 30161-970, Belo Horizonte, MG, Brazil

Keywords: *Daphnia laevis*, diapause, ephippium decapsulation, epphipia viability

Running title: Sodium hypochlorite for selecting viable resting eggs

Articles

\*Corresponding author: Paulina Maria Maia Barbosa, [maia@icb.ufmg](mailto:maia@icb.ufmg) - fone: (31) 3409-2578

## **Resumo**

Cladóceros são capazes de produzir ovos de resistência envoltos por uma cápsula protetora, o efípio, de viabilidade variável. Para avaliar com precisão as taxas de eclosão, é essencial saber o número de ovos presentes no interior do efípio. Este estudo teve como objetivo avaliar o número de ovos por efípio de *Daphnia* sp de dois lagos tropicais e a eficiência de alguns métodos para desencapsulamento dos ovos de resistência. Foram utilizadas duas concentrações diferentes de hipoclorito de sódio, além de ovos obtidos por meio de isolamento manual por agulhas e efípios intactos. O número de ovos por efípio diferiu significativamente entre os lagos. A exposição a hipoclorito de sódio a uma concentração de 2%, durante 20 minutos foi o método mais eficiente para o isolamento e a avaliação visual dos ovos de resistência, pois não afeta a sobrevivência das neonatas. Embora não tenha sido verificada nenhuma diferença de eclosão, os resultados obtidos a partir da imersão em solução de hipoclorito ( $47,2 \pm 7,34\%$ ) e isolado manualmente ( $53,7 \pm 13,24\%$ ), a imersão em solução de hipoclorito é mais rápido e não necessita de destreza manual. A taxa de eclosão de ovos não isolados de efípios foi subestimada ( $11,1 \pm 5,0\%$ ), o que ilustra a importância do uso de tal metodologia.

Palavras chave: *Daphnia laevis*, desencapsulamento de efípios, diapausa, viabilidade de efípios

## **Abstract**

Cladocerans are able to produce resting eggs within a protective resistant capsule the ephippium. To accurately evaluate hatching rates it is essential know the number of eggs present inside the ephippia. This study aimed to evaluate the number of eggs per

ephippium of *Daphnia* sp from two tropical lakes and the efficiency of some methods for decapsulating resting eggs. Two different concentrations of sodium hypochlorite were used together with eggs obtained through manual isolation by needles and intact ephippia. The number of eggs per ephippium differed significantly among the lakes. The exposure to sodium hypochlorite at a concentration of 2% for 20 minutes was the most efficient method for the isolation and visual evaluation of the resting eggs because it did not affect the neonata survival. Although there were no difference between the results obtained from immersion in hypochlorite ( $47.2 \pm 7.34\%$ ) and manually isolated ( $53.7 \pm 13.24\%$ ), immersion in hypochlorite is faster and does not require manual ability. Hatching rate experiments with resting eggs not isolated from ephippia were underestimated ( $11.1 \pm 5.0\%$ ), illustrating the importance of the use of such methodology.

Keywords: *Daphnia laevis*, diapause, ephippium decapsulation, ephippia viability

## **Introduction**

Most organisms live in changeable environments. To withstand these conditions, which can sometimes be lethal, some organisms have developed dormancy as a life-history strategy. Many zooplankton species, including cladocerans, use a variation of this strategy (Cáceres and Tessier 2003). Diapause in cladocerans occurs through the production of resting eggs, which are deposited in the sediment and represents a as a temporary refuge or a reserve against adverse conditions, allowing the populations to reestablished after favorable conditions return.

For cladocerans, the production of dormant stages requires a change in the mode of reproduction. Most of the time, cladocerans reproduce by parthenogenesis, with cyclic production of diploid eggs. To form the dormant stage, the females stop

producing diploid eggs and start to produce haploid eggs and males. The fertilized eggs originate the resistant form, while the unfertilized eggs degenerate and are reabsorbed by the mother (Zaffagnini 1987). In *Daphnia*, the resting egg is enclosed by a chitinous shell called an ephippium, that is formed from the dorsal shell of the mother and improves the resistance of diapausing eggs to adverse conditions (Ślusarczyk and Pietrzak 2008). Chitin content of resting eggs varies from 17% to 25%, as a consequence their durability is so high (Kaya et al 2013; Kaya et al 2014a). Sometimes they are produced huge amount (tons) in the lakes (Kaya et al 2014b).

For these organisms, usually ephippial membranes contain two eggs, but this number may be variable and it is difficult to determine visually (Zaffagnini 1987). Ephippia are pigmented with melanin, and the degree of pigmentation ranges from transparent to opaque. The variation in pigmentation exists within and across populations and species, occurring more often in lakes with the highest ephippial production (Gerrish and Cáceres, 2003).

Therefore, studies with resting eggs must consider the use of methods to checking the number of eggs before hatching tests. Some investigators use a pair of needles to open each ephippium individually in order to select viable eggs (Davison 1969, Cáceres 1998, Cáceres and Tessier 2003, Angeler 2005) or sort the eggs under an inverted microscope without opening the ephippium (Perez-Martinez et al. 2012). These two techniques are effective, but rather slow, and the use of needles requires great skill.

A simpler method has been described by Pancella and Stross (1963) and Haghparast et al. (2012), who exposed the eggs to sodium hypochlorite at a concentration of 1% for 5 minutes prior to using them in an experiment. La et al. (2009) also report the use of sodium hypochlorite, at a concentration of 4% for 20 minutes for the desencapsulation of ephippia. However, we could not find any information on

hatching rates of resting eggs exposed to different concentrations and exposure time hypochlorite.

Because the methods are variable and in the case of hypochlorite also the concentrations and exposure time it is important to compare the hatching rates obtained in each. Exposure to sodium hypochlorite decapsulates the eggs contained within the ephippium and enables the investigator to select potentially viable eggs and allow to discard seemingly whole but empty (no eggs) ephippia. Moreover, the isolation of resting eggs may help in a higher production of organisms, e.g. used in lab tests or in aquaculture.

This study aimed to evaluate the status of ephippia of *Daphnia* sp. from two tropical lakes and the efficiency of some methods for decapsulating resting eggs. The hypothesis leading this work are: a) there will be a difference in the status of ephippia in aquatic environments and b) treatment of decapsulation of ephippia using the technique of immersion in sodium hypochlorite will be effective for the selection of viable resting eggs.

## **Materials and Methods**

The ephippia used in the experiments were collected from the sediment of Pampulha Reservoir (S 19° 55' 09", W 43° 56' 47") and Jacaré Lake (S 19° 48' 28.8 ", N 42° 38' 55.5"), located in Minas Gerais, Brazil.

Sediment samples were collected with a core sampler and kept in dark bottles at 4 °C until the separation of ephippia used in the experiments. For this, the sediment samples were mixed with sucrose solution (1:1) (Onbé 1978) and the ephippia were pipetted from the supernatant.

#### Number of resting eggs within ephippia

To assess the natural variation among lakes with respect to ephippium status (% of ephippia with 0, 1, or 2 eggs), five ephippia were placed in each well of 12-well culture plates, and the ephippia were immersed in 4% sodium hypochlorite to assess their clarity stated and determine the number of eggs present in each ephippium. The ephippia were observed until they became transparent and the number of eggs within each ephippium was noted. For each lake, four plates (replicates) with 60 ephippia each were set up, totaling 240 ephippia.

#### Decapsulation test with hypochlorite

To assess the effect of time of exposition and hypochlorite solution concentration in decapsulating resting eggs from ephippia and to compare the hatching success of eggs decapsulated, four treatments were used: sodium hypochlorite concentrations of 2 or 4% with exposure times of 10 or 20 min. The 2 and 4% concentrations were chosen because they represent the concentrations of commercial bleach and active chlorine, respectively. For this experiment, only ephippia of Pampulha lake were used, because Jacare's ephippia has low hatching rate in laboratory (maximum 8%) (Brandão et al., 2014).

The ephippia were placed in a bottle with the bottom covered with a plankton net mesh (50- $\mu$ m mesh) and kept in the hypochlorite concentration and time used for each treatment. After the treatment, resting eggs were washed with a squirt bottle containing 500 mL of filtered (50- $\mu$ m mesh) lake water. Eggs that appeared viable were transferred to 12 culture plates. Wells contained 5 mL of filtered lake water and each received five resting eggs. Each treatment was carried out in triplicate (3 plates/treatment x 12 wells/plate x 5 resting eggs/well) for a total of 180 embryos per

treatment. Plates were kept in an incubator with a photoperiod of 12 h and temperature of 24°C, similar to conditions in the lakes. Hatching was assessed daily for 20 days.

#### Hatching success compared among sets

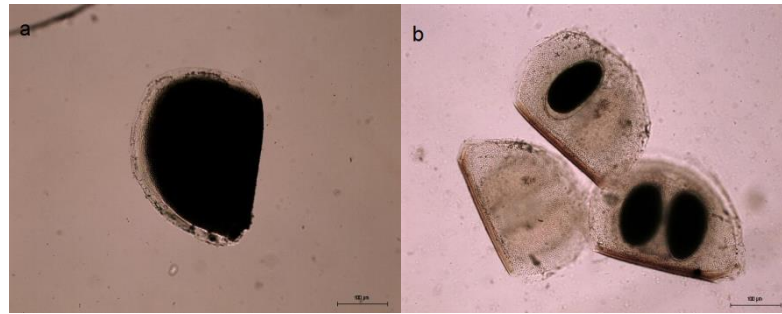
To determine whether the sodium hypochlorite method works as well (or better) than other methods used for hatching resting eggs. The following treatments were tested: a) resting eggs obtained from 2%/20 min sodium hypochlorite treatment b) resting eggs obtained by manually decapsulating ephippia using dissection needles and c) intact ephippia (assumed to contain two resting eggs each). The eggs were placed in culture dishes, two per cell (a total of 24 eggs) and inspected daily for 30 days.

#### Statistical methods

To evaluate differences between treatments in the hatching rate of resting eggs from Pampulha Lake, the proportion of hatched eggs was arcsine square-root-transformed and evaluated by one-way ANOVA. The viability of ephippia from the different lakes, the influence of exposure to hypochlorite on hatching rate and the hatching time of resting eggs from Pampulha Lake subjected to the sodium-hypochlorite treatments were evaluated by Kruskal-Wallis test. For statistical analysis and preparation of figures, the STATISTICA 8.0 software was used.

## **Results**

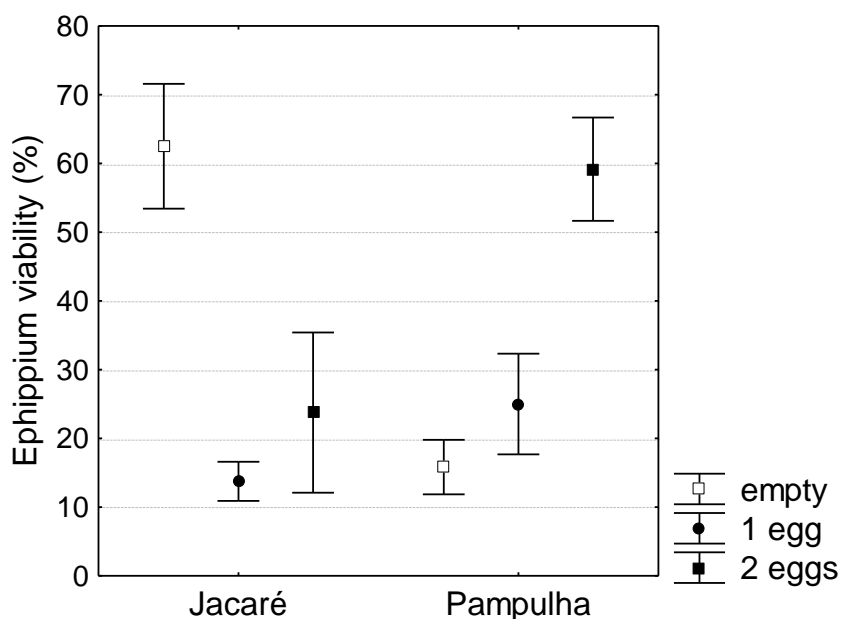
The ephippia of *D. laevis*, when exposed to sodium hypochlorite became transparent, allowing observation of the number of eggs per ephippium (Figure 1). The exception was the 2% sodium-hypochlorite treatment for 10 minutes, where some ephippia still had a dark color.



**Fig. 1.** *Daphnia laevis* ephippia from sediment of Pampulha Lake (a) before (dark) and (b) after (transparent) immersion in 4% sodium hypochlorite.

Differences in the number of empty ephippia among the lakes were statistically significant (KW-W (1,8)=5,33,  $p < 0.03$ ). In Jacaré Lake, 63% of the ephippia were found to be empty, 14% contained one egg and 23% contained two eggs. In Pampulha Lake, the number of empty ephippia was considerably lower (16%), while 25% contained 1 egg and 59% contained 2 eggs (Figure 2).



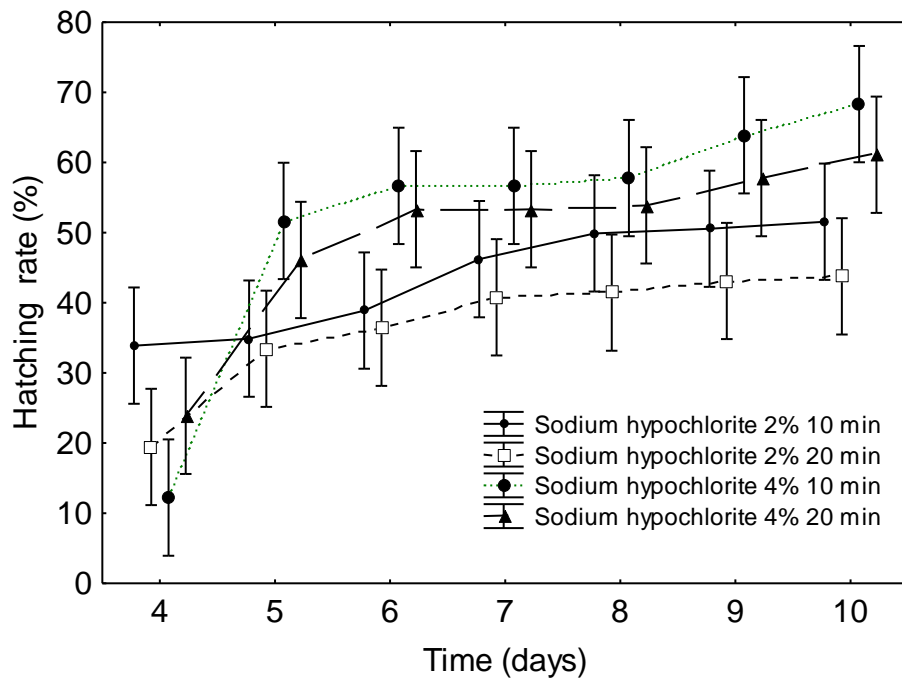


**Fig. 2.** Percentage of ephippium content potentially viable resting eggs inside *Daphnia laevis* ephippia collected in Jacaré and Pampulha lakes, Minas Gerais, Brazil (n = 240 ephippia/lake). Vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

While ephippia from the two lakes differed in the proportion of empty ephippia, no significant difference was observed in the hatching of resting eggs (Pampulha lake-isolated from ephippia) between the sodium-hypochlorite immersion treatments ( $F(3,80)=0.08$ ,  $p = 0.97$ ) after 20 days. For the 2% sodium hypochlorite treatment, the hatching percentages were  $64 \pm 4.36\%$  at 10 minutes and  $60 \pm 8.32\%$  at 20 minutes. For the 4% sodium hypochlorite treatment, the hatching percentages were  $69 \pm 7.02\%$  at 10 minutes and  $62 \pm 10.26\%$  at 20 minutes.

Mean hatch rates higher than 20% were obtained between fourth and fifth days falling on others days (KW-H (6,84)=40,65,  $p < 0.01$ ) (Figure 3). Only one resting egg hatched after the tenth day, in the 2% sodium hypochlorite - 20 minutes treatment. Although no significant difference was found in hatching rates among the treatments,

exposure to 4% sodium hypochlorite negatively affected the survival of the neonate *D. laevis*, which were found dead or swimming weakly.

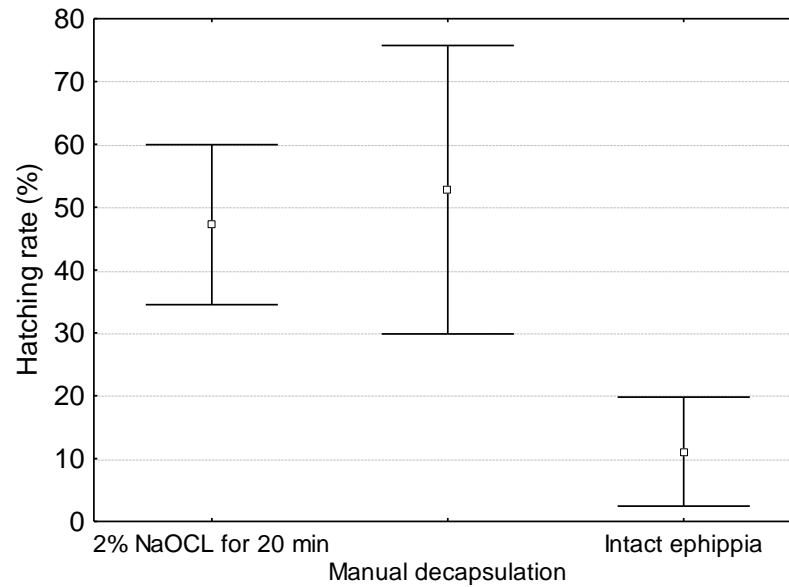


**Fig. 3.** Percentage hatching of *Daphnia laevis* ephippia from sediment in Pampulha Lake under different conditions of exposure to sodium hypochlorite solution over time (n = 180 eggs/treatment). Vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

Since the 4% sodium hypochlorite treatment negatively affected the health of the hatchlings, the treatment with 2% sodium hypochlorite for 20 minutes was chosen for the experiment that compared the hatching success of resting eggs from this treatment against those that were manually decapsulated and resting eggs in intact ephippia.

No significant differences were observed in the hatching rate of resting eggs exposed to hypochlorite and resting eggs manually decapsulated (KW-H (1;42)= 0,07, p >0.5). However, hatching rates of intact ephippia were much lower than those of treatment with decapsulated eggs. The hatching rates of resting eggs with treatment isolates of ephippia were  $47.2 \pm 7.34\%$  and  $53.7 \pm 13.24\%$ , for resting eggs isolated by

immersion in hypochlorite and manually isolated, while the hatching rate of ephippia was  $11.1 \pm 5.0\%$  (Figure 4).



**Fig. 4.** Percentage of hatching rate not isolated from ephippia and isolated from ephippia for exposure to 2% sodium hypochlorite for 20 minutes. Vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

### Discussion

The resting egg status of ephippia used in resurrection ecology experiments is seldom determined before hatching experiments are initiated. However, it is essential to select healthy ephippia, since the percentage of eggs within ephippium may vary according to the environment, sampling location, sample period and depth of sediment (Cáceres 1998, Pérez-Martínez et al. 2012). The ephippium, one of the barriers that protect the resistant eggs, may also mask their viability, as the resting eggs can not be seen through the ephippium (Davison 1969) because the pigmentation with melanin (Gerrish and Cáceres, 2003).

This study found a significant difference in the proportion of empty ephippia from the two lakes, ranging from 13% to 63% empty ephippia, confirming the

hypothesis. The production of ephippial eggs per ephippium increases with greater food availability (Conde-Porcuna et al., 2014). Moreover, the hatching rate was underestimated when we used ephippia without assessing the presence of resting eggs inside them. These results reinforce the importance of prior assessment of the viability of ephippia that will be used in experiments that aim at understanding the factors stimulating hatching.

Methods for preliminary assessment of the status of resting eggs vary greatly but all agree on the importance of using only healthy eggs in hatching tests, no matter what method is used for separating the eggs of the ephippia. Although the manual separation technique requires skill with the use of needles, it has been used in some studies (Cáceres, 1998, Cáceres and Tessier, 2003, Angeler 2005, Cáceres and Tessier, 2003, Cáceres, 1998). Davidson (1969), using needles to separate the eggs from the ephippium, showed that only decapsulated ephippia developed (75%), and the non-decapsulated eggs were observed for many days and never hatched. In the study of Pancella and Stross (1963), the time for hatching of ephippium not treated with hypochlorite was much longer (44 days) than ephippium immersed in hypochlorite for five minutes (three days). Our results showed that resting eggs within ephippia immersed in hypochlorite hatching between 4 and 17 days, and intact ephippia between 7 and 20 days.

Thus, decapsulation of the eggs can accelerate the evaluation of factors (temperature, light, predation, etc.) related to the hatching of resting eggs. On the other hand, some studies have shown that the use of hypochlorite can increase the transparency of ephippia and the effects of light on eggs hatching. So, this technique should be used with caution and respecting the objectives of the study. Pancella and Stross (1963) using ephippia immersed in a 1% sodium-hypochlorite solution for five

minutes showed that this did not stimulate the hatching, only facilitate the input of light in the ephippia.

Experiments using ephippia without prior evaluation are still widely used (Santangelo et al. 2010, Haghparast and Shabani 2012) but our study showed the importance of this procedure when you want to evaluate the maximum hatching rate of resting eggs or generate new individuals quickly. Moreover, the present study reinforces the importance of separating the eggs from the ephippia, not only to improve the contact of the stimulating factor with the egg, but also to only select eggs that are potentially viable. The lower hatching rates could have occurred because some of the ephippia had fewer than 2 eggs or because eggs within the ephippium aren't as sensitive to hatching cues.

Haghparast and Shabani (2012) found differences in the hatching rates of ephippia from *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*, treated with hypochlorite. *D. magna* ephippia immersed in 1% sodium hypochlorite had a higher hatching rate than *D. pulex* ephippia. However, the authors stated that because they did not separate the eggs contained within the ephippia, this may have adversely affected the results for hatching rates. Paes (no prelo) found that immersion in 2% sodium hypochlorite for 20 minutes did not affect the hatchability of resting eggs of *Daphnia ambigua* and didn't cause health problems with hatchings as they grow and mature.

Sodium hypochlorite efficiently decapsulates ephippia, allowing the researcher to select viable resting eggs and the eggs to hatch more rapidly, thus optimizing studies of this nature. In this study, the best treatment was 2% sodium hypochlorite for 20 minutes, which did not adversely affect neonate survival, and also allowed viewing of the eggs in all ephippia. High concentrations of hypochlorite may be useful only to

evaluate the viability of ephippia, and should not be used to hatch cladocerans for other purposes because high concentrations can affect their survival.

### **Acknowledgements**

We are grateful to CAPES for a PhD scholarship to the first author. We would to thank PROGRAD-UFMG for their financial support for translation; the personnel from Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology (LIMNEA), UFMG, IEF and to the Brazilian Long-Term Ecological Research Project (LTER/UFMG) for financial and logistical support.

### **References**

ANGELER DG. 2005. No diapause prolongation response of *Daphnia* in the presence of planktivorous mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecol Res* 20: 619–622.

BRANDÃO LPM., PUJONI DGF AND MAIA-BARBOSA PM. (2014) Seasonal dynamics of *Daphnia laevis* Birge, 1878 ephippia in a tropical lake with a description of a new methodology for *in situ* evaluation. *Braz.J.Biol* 74:642-648

CÁCERES CE. 1998. Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology* 79: 1699.

CÁCERES CE AND TESSIER AJ. 2003. How long to rest: the ecology of optimal dormancy and environmental constraint. *Ecology* 84: 1189–1198.

DAVISON J. 1969. Activation of the ephippial egg of *Daphnia pulex*. *J. Gen. Physiol.* 53: 562–575.

HAGHPARAST S AND SHABANI A. 2012. Hatching Requirements of *Daphnia magna* Straus, 1820, and *Daphnia pulex* Linnaeus, 1758, diapausing eggs from Iranian populations in vitro. *J. Agr. Sci. Tech.* 14: 811–820.

KAYA M, SARGIN I, TOZAK KÖ, BARAN T, ERDOGAN S. 2013. Chitin extraction and characterization from *Daphnia magna* resting eggs. Int. J. Biol. Macromol. 61: 459–464.

KAYA M, CAKMAK YS, BARAN T, ASAN-OZUSAGLAM M, MENTES A, AND TOZAK KO. 2014a. New chitin, chitosan and o-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea) with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities. Biotechnol. Bioproc. 19(1): 58-69.

KAYA M, BARAN T, SAMAN I, ASAN OZUSAGLAM M, CAKMAK YS, AND MENTES A, 2014b. Physicochemical Characterization of Chitin and Chitosan Obtained from Resting Eggs of *Ceriodaphnia quadrangula* (Branchiopoda: Cladocera: Daphniidae) J. of Crustac. Biol. 34(2): 283-288.

LA GH, JEONG HG, KIM MC, JOO GJ, CHANG KH AND KIM HW. 2009. Response of diapausing eggs hatching to changes in temperature and the presence of fish kairomones. Hydrobiologia 635: 399–402.

PANCELLA JR AND STROSS RG. 1963. Light induced hatching of *Daphnia* resting eggs. Chesap. Sci. 4: 135–140.

PÉREZ-MARTÍNEZ C, JIMÉNEZ L, MORENO E AND CONDE-PORCUNA JM. 2012. Emergence pattern and hatching cues of *Daphnia pulicaria* (Crustacea, Cladocera) in an alpine lake. Hydrobiologia 707: 47–57.

SANTANGELO JM. 2009. Produção, eclosão e implicações ecológicas e evolutivas dos estágios dormentes do zooplâncton. LIMNOtemas 7: 1–36.

SANTANGELO J M, BOZELLI RL, ESTEVES FDA AND TOLLRIAN R. 2010. Predation cues do not affect the induction and termination of diapause in small-bodied cladocerans. Freshw. Biol. 55: 1577–1586.

ŚLUSARCZYK M AND PIETRZAK B. 2008. To sink or float: the fate of dormant offspring is determined by maternal behaviour in *Daphnia*. *Freshw. Biol.* 53: 569–576.

ZAFFAGNINI F. 1987. Reproduction in *Daphnia*. In: *Daphnia* (eds. Peters RH & De Bernardi R), pp. 245-284. Memorie dell'istituto Italiano di Idrobiologia, Pallanza



**Capítulo 2- High temperatures and absence of light affect the hatching of resting eggs of *Daphnia* in the tropics**

Thécia Alfenas Silva Valente Paes; Arnola Cecília Rietzler; Diego Guimarães Florencio Pujoni; Paulina Maria Maia-Barbosa\*

Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology - LIMNEA- Federal University of Minas Gerais- UFMG, P.O. Box 486, ZIP Code 30161-970, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Keywords: Cladocera, diapause, light, temperature, ephippium, tropical aquatic ecosystems.

Running title: Temperature and light on hatching of resting eggs

Academy Section: Articles

\*Corresponding author: Paulina Maria Maia Barbosa, [maia@icb.ufmg](mailto:maia@icb.ufmg) - fone: (31) 3409-2578

## **Resumo**

Temperatura e luz são reconhecidos como fatores importantes para eclosão de ovos de resistência. O conhecimento de como eles afetam suas taxas de eclosão é importante para a compreensão das conseqüências do aquecimento das águas para a recolonização dos ecossistemas aquáticos dependentes das populações dormentes. Este estudo teve como objetivo comparar a influência de diferentes condições de temperatura e luz sobre as taxas de eclosão de ovos de resistência de *Daphnia ambigua* and *Daphnia laevis* de ambientes tropicais. Os efípios foram coletados no sedimento de três ecossistemas aquáticos, no sudeste do Brasil. Para cada lago, os ovos de resistência foram expostos a temperaturas de 20, 24, 28 e 32 ° C, à luz (12 h de fotoperíodo) e total ausência de luz. Os resultados mostraram que a ausência de luz e altas temperaturas influenciaram negativamente nas taxas de eclosão. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para eclosão dos ovos de resistência entre os ecossistemas estudados (média de 0,6 a 31%), indicando a importância de fatores ambientais locais na diapausa e manutenção de populações ativas.

Palavras-chave: Cladocera, diapausa, efípio, luz, temperatura, ecossistemas aquáticos tropicais.

## **Abstract**

Temperature and light are recognized as important factors for hatching of resting eggs. The knowledge of how they affect hatching rates of this type of egg is important for the comprehension of the consequences of warming waters in recolonization of aquatic ecosystems dependent on dormant populations. This study aimed at comparing the influence of different temperature and light conditions on hatching rates of *Daphnia*

*ambigua* and *Daphnia laevis* resting eggs from tropical environments. The ephippia were collected in the sediment of three aquatic ecosystems, in southeastern Brazil. For each lake, the resting eggs were exposed to temperatures of 20, 24, 28 and 32°C, under light (12h photoperiod) and dark conditions. The results showed that the absence of light and high temperatures have a negative influence on the hatching rates. Statistical differences for hatching rates were also found when comparing the studied ecosystems (ranging from 0.6 to 31%), indicating the importance of local environmental factors for diapause and maintenance of active populations.

Keywords: Cladocera, diapause, ephippium, light, temperature, tropical aquatic ecosystems.

## **Introduction**

Throughout evolution, the aquatic organisms developed mechanisms by which they can survive the challenges imposed by the environment. For the zooplanktonic organisms, the diapause with production of resting eggs is a strategy that allows the recovery of populations and endurance of the species after periods of unfavorable conditions. Although this strategy is common in tropical and temperate environments, the knowledge of what factors induce the production and hatching of resting eggs in different Cladocera species is still not clear (Sarma et al. 2005).

In temperate regions, light and temperature have been considered the two most important stimuli for the hatching of zooplanktonic resting eggs (Stross 1966, Vandekerkhove et al. 2005) and more recently the presence of predators (Angeler 2005, Lass et al. 2005, La et al. 2009). However, in tropical regions, the importance of these factors for the termination of diapause in lakes has not been fully assessed yet. It is already known that rewetting of temporary ponds is an important stimulus for hatching in the tropics (Crispim 2003), although predators do not interfere with hatching of *Moina* resting eggs and salinity affects it negatively (Santangelo et al. 2010, Santangelo et al. 2013).

In tropical regions, the production of dormant stages has been studied mainly in temporary aquatic environments, in which the seasonal differences between the dry and wet periods strongly induce the beginning of the diapause process (Crispim and Watanabe 2001, Crispim et al. 2003, Palazzo et al. 2008, Paranelli et al. 2008, Araujo et al. 2013). For permanent lakes, the production and hatching of resting eggs due to anthropic action (Maia-Barbosa et al. 2003), seasonal effects (Brandao et al. 2012) and salinity (Santangelo et al. 2014) was reported. Most of these studies were conducted in order to understand population dynamics and to assess the difference between the active

community in the water column and the egg bank in the sediments. Few studies experimentally investigated the factors that stimulate the induction and termination of diapause (Santangelo et al. 2010 and 2011), which may be relevant to the understanding of such effects.

Several adverse environmental alterations lead to the production of resting eggs and different factors may be involved in their hatching, which makes it more difficult to evaluate and establish a pattern for this survival mechanism. Among the factors that control diapause in Cladocera are photoperiod, temperature, population density, desiccation and predation signs (Stross 1966, Crispim et al. 2003; Zadereev 2003, La et al. 2009)

Cladocera are relevant because they play an important role on energy transference through the food chain (Sarma et al. 2005). The use of *Daphnia* organisms is appropriate for biological and evolutionary studies, since the species reflect adaptations to different habitats, but their physiological properties and ecological function are very similar (Lampert 2006).

The different daphniid responses (metabolism, growth, reproduction, trophic interactions) to environmental changes depend on biotic (predator abundance and phytoplankton) and abiotic factors (hydrodynamics, thermal stratification intensity and duration, trophic state or geomorphology) of lakes, which are directly influenced by climate changes (Wojtal-Frankiewicz 2011). According to the IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), there is a trend to an increase on average temperature at the end of the 21<sup>st</sup> century (IPCC 2007). Thus, the effects of an increase in water temperature can directly influence the hatching of *Daphnia* ephippia and also be relevant for the understanding of the consequences of water warming for recolonization of the aquatic ecosystems dependent on dormant populations.

This study aimed at comparing, in laboratory, the influence of different light and temperature conditions on the hatching of *Daphnia ambigua* and *Daphnia laevis* ephippia collected in permanent tropical aquatic ecosystems. The following hypothesis were formulated: a) higher temperatures and the presence of a photoperiod will induce higher hatching rates, b) resting eggs will hatch in a shorter period of time under higher temperature conditions and c) different environments differ on the hatching rate resting eggs.

## Methodology

The resting eggs were collected from the sediments of three water bodies of southeastern Brazil. The characteristics of these environments are shown in Table 1.

**Table 1.** Characteristics of Pampulha, Nado and Jacaré lakes.

Aquatic ecosystems	Coordinates	Area (ha)	Maximum depth (m)	Circulation pattern	Water temperature (°C):	DO (mg.L <sup>-1</sup> ):	Secchi (m):	Trophic state	References
Pampulha	S 19°55'09" W 43°56'47"	196,8	15,1	-	Epi: 19,6 a 27,4 Hipo: 18,7 a 24,1	Epi: > 8,0 Hipo: 0,0	0,8	eutrophic	Pinto-Coelho et al., 2003
Nado	S 19° 49'56" W 43° 57'34"	1,5	7,6	monomitic	Epi: 22,8 a 27,0 Hipo: 18,9 a 22,3	Epi: 8,0 Hipo: 0,0	0,3 a 1,4	mesotrophic	Bezerra-Neto et al., 2007 Bezerra-Neto et al., 2009
Jacaré	S 19°48'28.8" W 42°38'55.5"	109,0	9,8	monomitic	Epi: 28,5 a 33,1 Hipo: 20,0 a 22,0	Epi: 8,5 Hipo: 0,0	1,0 a 4,5	oligo-mesotrophic	Brandão et al., 2012

Epi= Epilimnio and Hipo= Hipolimnio

Sediment samples were collected at the limnetic region, with a corer-type sampler and the first 10 centimeters were used. The samples were placed in dark flasks and refrigerated at 4°C, for two to ten days. Resting eggs were isolated from these sediments by means of the sugar flotation method (Onbé 1978). The ephippia were collected from the supernatant and placed in a recipient with a 50 µm net, where they were maintained in a 2% hypochlorite solution for 20 minutes, allowing ephippium transparency, decapsulation and selection of the healthy-looking resting eggs. Afterwards, they were washed with 500mL of distilled water.

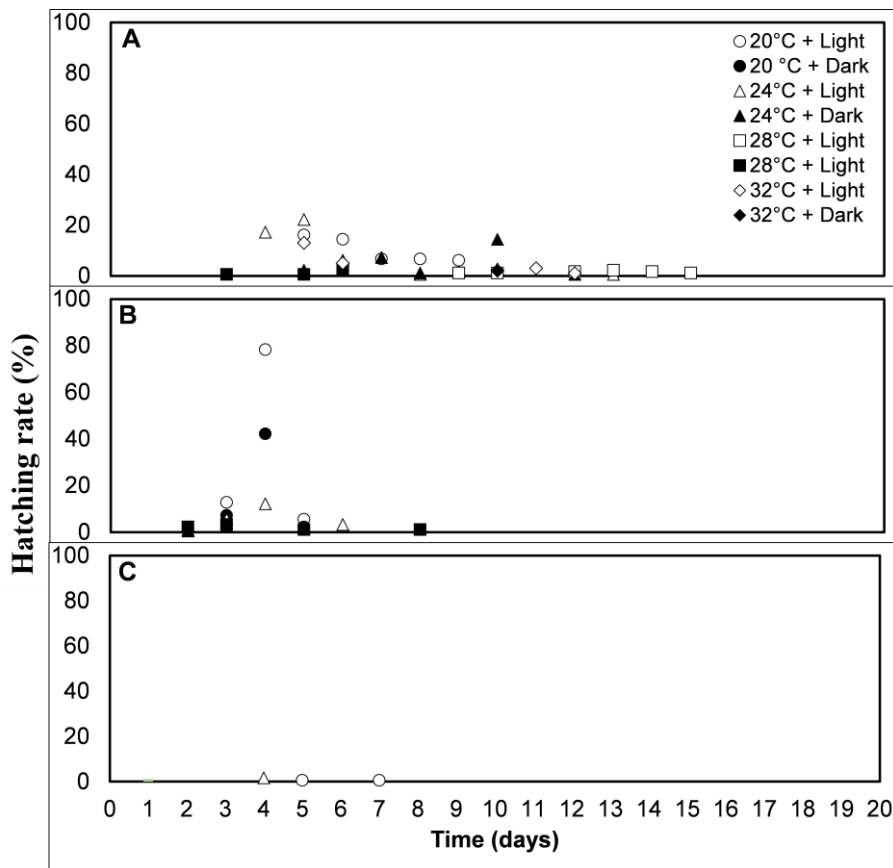
For the tests, resting eggs of *Daphnia laevis* found at Pampulha and Jacaré lakes and *Daphnia ambigua* from Nado lake were used. An experimental design was performed manipulating light (absence x presence) and temperature (20, 24, 28 and 32°C), providing a total of 8 treatments (2 light conditions x 4 temperature conditions) for each lake system. For each environment, healthy resting eggs were selected and transferred to a culture plate, with 12 wells containing five eggs each and 5mL of water from the respective environment filtered with a 50 µm net. Each treatment was performed in triplicate, providing a total of 180 resting eggs. Hatching was monitored daily for 20 days. The temperatures used in the experiments were selected from values obtained in field.

The significance of the predictors (i.e. temperature, light and environment) in relation to the response variable (hatching rate) was tested using general linear models which can adequately handle non-normal and heteroscedastic data. Due to the presence of overdispersion (i.e. residual deviation larger than the residual degrees of freedom), the regression models were fit by quasi-likelihood estimation for the binomial family (quasibinomial) (Venables and Ripley 2002). Overdispersion may be caused by lack of independence among samples, or parameter heterogeneity, and it can be modeled by the use of quasi-likelihood estimation (Anderson 2008). This approach inflates the estimated covariance matrix of the predictors, thus reducing the probability of selecting spurious relations (type-1 error) due to violations of the two assumptions previously described (i.e. independence of samples and parameter homogeneity).

## **Results**

For the samples of Jacaré lake, hatching occurred from the fourth to the seventh day; for Pampulha lake, the higher hatching rates occurred on the fifth day, for the treatment at 24°C with photoperiod (22%) and also on the fifth day for the treatment at

20°C with photoperiod (16%). For this environment, the hatchings were not synchronized; they were detected throughout the whole assessment period. Resting eggs collected at Nado lake hatched faster than in the other environments (third and fourth days) and were more synchronized. The higher hatching rates were observed at 20°C and with high photoperiod, on the fourth day (78.3%), followed by the treatment at this same temperature, in the dark condition (42%) (**Figure 1**).



**Fig. 1.** Daily percentage of hatching of resting eggs at temperatures of 20°C, 24°C, 28°C and 32°C in the light (12h photoperiod) and dark conditions. Pampulha lake (A), Nado lake (B) and Jacaré lake(C).

Among the analyzed factors, temperature was the most important for the hatching of *Daphnia* resting eggs (31%). However, its importance varied in relation to the environment, as indicated by the significant interaction between temperature and



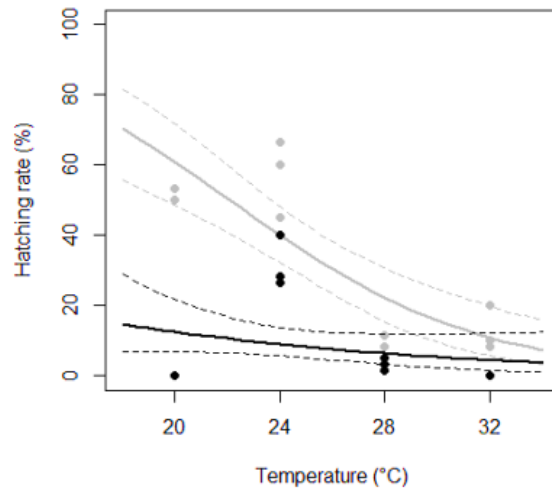
aquatic ecosystem (11%) (**Table 2**). The environmental characteristics (aquatic ecosystem) also influenced the hatching, indicating that there was a significant difference on the mean hatching rates of the resting eggs between Pampulha lake ( $26 \pm 5.6\%$ ) and Nado lake ( $31 \pm 8.2\%$ ), which presented higher hatching rates than Jacaré lake ( $0.6 \pm 0.2\%$ ). Photoperiod was the third most important factor (25%) and the hatching rates were always lower in the dark condition.

**Table 2.** Analysis of the residual deviation for each of the assessed predictors

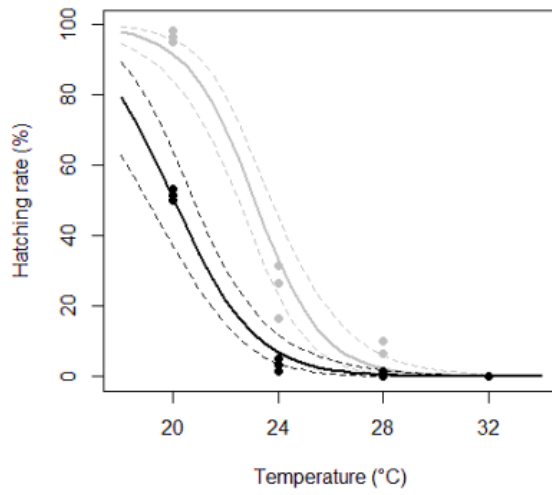
Predictors	Degrees of freedom	Deviation	Residual degree of freedom	Residual deviance	Residual deviance (%)	Drop in residual deviance (%)	P value for inclusion of a new predictor
Null model			71	1889.46	100		
Temperature	1	581.87	70	1307.59	69	30.8	<0.001
Aquatic ecosystem	2	572.46	68	735.13	39	30.3	<0.001
Photoperiod	1	259.03	67	476.1	25	13.7	<0.001
Aquatic ecosystem:Temperature	2	207.6	65	268.5	14	11.0	<0.001
Temperature: Photoperiod	1	11.91	64	256.59	14	0.6	0.09431
Aquatic ecosystem: Photoperiod	2	2.88	62	253.72	13	0.2	0.7132

Thus, the temperature effect was high for Nado lake, on average for Pampulha lake and none for Jacaré lake. The temperature effect was significant for all treatments at Nado lake, but more important for the light condition. It was significant only for the light treatment at Pampulha and it was not significant for both treatments as Jacaré. The temperature effect was less pronounced for the dark treatment (**Figure 2**).

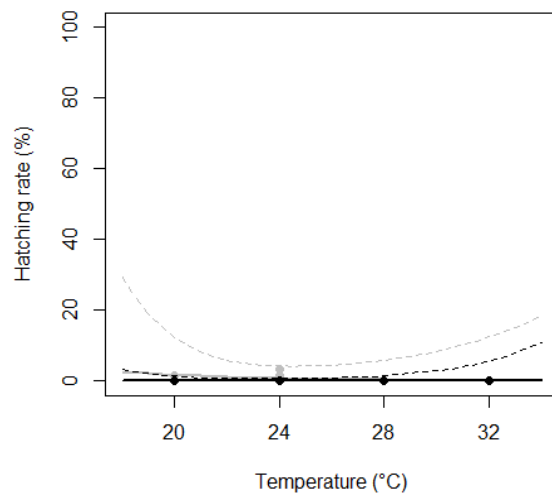
**A**



**B**



**C**



**Fig. 2:** Adjusted models for the hatching rate of resting eggs of *Daphnia ambigua* (B) and *Daphnia laevis* (A and C) in each environment, according to the treatments (grey line: light and black line: dark). The dotted lines represent the reliability intervals. Pampulha lake (A), Nado lake (B) and Jacaré lake (C).

## Discussion

Our results indicate differences between the *Daphnia* spp. hatching rates comparing the assessed aquatic ecosystems. Temperature and light were important factors for the hatching of the resting eggs. Furthermore, the dynamics of the hatching of the resting eggs were also different between the environments.

The first hypothesis of this study was corroborated. The hatchings were significantly different when comparing the water bodies, demonstrating the importance of the environment's peculiar characteristics for the diapause mechanism. Similar results were obtained by (Cáceres and Tessier 2003) in temperate lakes. These authors observed that the differences between the hatching rates can be more strongly related to specific characteristics of the aquatic environment, especially to the seasonal risks to which the ephippia are submitted. The environments considered in the present study show different trophic conditions, thermal and chemical stratification, which may influence the hatching of resting eggs, in different ways. As environmental characteristics during the production of ephippia, the life history of the mother and risks experienced in the water column may influence the ephippia dormancy (Cáceres and Tessier, 2003).

Biological interactions, such as the presence (kairomones) of vertebrate and invertebrate predators, could also influence the dynamics of the dormant stages. Bozelli

et al. (2008) showed hatching delays related to fish predation signals in aquatic ecosystems. Their findings could explain the production and low hatching of resting eggs of *D. laevis* in Jacaré lake. However, experiments being conducted in our laboratory did not confirm this hypothesis yet. Similar information was found by Santangelo et al. (2010), showing that effects of vertebrate kairomones may not always influence the hatching rate and time to hatching of ephippia in tropical aquatic ecosystems. Thus, the factors that induce the beginning and termination of the diapause can be more intimately related to the local environmental characteristics to which the organism is subjected, such as seasonality (Brandão et al. 2014, Cáceres and Tessier 2003), endogenous aspects of the eggs, such as egg age or maternal effects (Zadereev 2003) and calcium availability (Dumont et al. 1992). Moreover, the eggs belonged to two different species, which could also influence the outbreak.

Several experiments have shown the importance of temperature, photoperiod and luminosity for the termination of diapause in temperate lakes (Dupuis and Hann 2009, Pancella and Stross 1963, Vandekerkhove et al. 2005), since, in these regions, the most evident alterations of temperature and photoperiod can be especially critical for the zooplankton that depend on these signals to exit dormancy (Dupuis and Hann, 2009). In tropical regions, other factors, could work as stimuli for this process, however, for some tropical aquatic environments, temperature and photoperiod strongly influence hatching rates, as observed in the present study for *D. laevis* and *D. ambigua*, at Pampulha lake and Nado lake, respectively. Thus, such studies should be expanded to other locations in the tropical region in order to verify the possible regional responses.

The hypothesis that higher temperatures would induce a faster hatching of the eggs was not corroborated. The results obtained suggest that higher temperatures have a negative effect on the hatching of *D. laevis* (Pampulha lake) and *D. ambigua* (Nado

lake) resting eggs. Similar results were obtained in the tropical region for *Moina micrura* ephippia originated from fish culture tanks (Rojas et al. 2001).

Dupuis and Hann (2009) demonstrated, by modeling, that climate changes can have negative consequences for the zooplanktonic populations of a temperate region, since it can affect important environmental stimuli which would stimulate the hatching of resting eggs, leading to dormancy rescission. The consequent temperature increase could also inhibit the hatching of resting eggs in some tropical environments. Thus, the recolonization of aquatic environments dependent on dormant populations would be affected by the low hatching rate of resting eggs. The absence of active species in the water column would affect the trophic interactions and the functional processes exercised by them.

The results obtained in this study evidenced the importance of the association of appropriate light and temperature conditions (photoperiod) for the hatching of *D. laevis* and *D.ambigua* ephippia collected at Pampulha and Nado lakes. Photoperiod was even more relevant at Pampulha lake. Thus, low light incidence in eutrophic environments such as Pampulha lake, where the photic zone is established at less than one meter, could negatively affect the emergency of the zooplankton, although the absence of light could be supplied by the floating ability of the ephippia (Ślusarczyk and Pietrzak 2008, Cáceres et al. 2007). On the other hand, while floating on superficial waters, the effect of water warming can negatively affect the hatching, even in the presence of light, as observed for Nado and Pampulha lakes.

The difference between the hatching rates and dynamics of the resting eggs between the environments, together with the observed high residual deviation evidences the importance of other environmental factors that were not measured, which could be related to the low hatching rate at Jacaré lake. Previous studies (Brandão et al. 2012)

have shown that, for this environment, temperature was an important factor, responsible for the density fluctuations of *D. laevis* on the water column. However, under laboratory conditions, this factor, associated with the photoperiod, was not sufficient to induce the hatching of these species' resting eggs, suggesting the influence of other environmental variables. In tropical ecosystems, the stratification and destratification events, which are related to temperature variation, promote several alterations on the physical, chemical and biological characteristics (refuge, reproductive rate, competition, predation, nutrient availability, levels of oxygen and food resources) of the environment. Due to the difficulties to obtain significant hatching rates at Jacaré lake, studies related to the interactions between abiotic and biotic factors, alert signs and kairomone and *in situ* experiments are being conducted in order to better understand the causing factors of the beginning and termination of diapause for this *Daphnia laevis* population.

## **Conclusions**

Temperature and photoperiod were important factors for the hatching of resting eggs on the permanent tropical aquatic environments studied. However, the difference between hatching rates and dynamics of these water bodies evidenced the importance of local factors for the diapause process. Temperature increase and absence of light negatively affected the hatching of *Daphnia* resting eggs. However, the reestablishment of populations are not exclusively depend on hatching rates, since daphnids are organisms with a large ability to adapt to environmental changes. Although temperature and photoperiod are relevant to hatching, other factors are determinant for maintenance of active populations.

## **Acknowledgements**

To the LIMNEA group (Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology), to UFMG, IEF and PELD (Long Term Ecology Research) for financial and

structural support. To Izabela Dias and Lorena Brito for helping with the maintenance of organisms and development of the experiments. To Daniel Maroneze, Luciana Brandão and Raquel Cordeiro for critical reading of the first draft. To professors Francisco Barbosa, Marcos Callisto and José Fernandes and anonymous reviewers for comments on the manuscript. To Capes for the PhD scholarship.

## References

- ANDERSON DR. 2008. Model based inference in the life sciences: a primer on evidence, New York: Springer, 184p.
- ANGELER DG. 2005. No diapause prolongation response of *Daphnia* in the presence of planktivorous mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecol Res* 20: 619–622.
- BEZZERRA-NETO JN. 2007. Migração vertical diária e cascata trófica em corpos aquáticos tropicais: influência da larva do díptero *Chaoborus*. Trabalho de Tese. Universidade Federal de Minas Gerais. 156p.
- BEZERRA-NETO JN, MELLO N, MAIA BARBOSA PM AND PINTO-COELHO RM. 2009. The role of predation in the diel vertical migration of zooplankton in two tropical freshwaters ecosystems. *Acta Limnol. Bras.* 21(1): 45–56.
- BOZELLI RL, TONSI M, SANDRINI, F AND MANCA M. 2008. A Big Bang or small bangs ? Effects of biotic environment on hatching. *J. Limnol.* 67(2): 100–106.
- BRANDÃO LPM, FAJARDO T, ESKINAZI-SANT’ANNA E, BRITO S AND MAIA-BARBOSA PM. 2012. Fluctuations of the population of *Daphnia laevis* Birge 1878: a six-year study in a tropical lake. *Braz. J. Biol.* 72(3): 479–87.
- BRANDÃO LPM, PUJONI DGF, MAIA-BARBOSA PM . 2014. Seasonal dynamics of *Daphnia laevis* Birge, 1878 ephippia in a tropical lake with a description of a new methodology for in situ evaluation. *Braz. J. Biol.* 74: 642-648.
- CÁCERES CE AND TESSIER AJ. 2003. How long to rest : the ecology of optimal dormancy. *Ecology* 84: 1189–1198.

- CÁCERES CE, CHRISTOFF AN AND BOEING WJ. 2007. Variation in ephippial buoyancy in *Daphnia pulicaria*. *Freshw. Biol.* 52(2): 313–318. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01695.x
- CRISPIM MC AND WATANABE T. 2001. What can dry reservoir sediments in a semi-arid region in Brazil tell us about cladocera ? *Hydrobiologia* 442:101–105.
- CRISPIM, MC, PAZ RJ AND WATANABE T. 2003. Comparision of diferent *Moina minuta* populations dynamics ecloded from resting eggs in a semi-arid region in Brazil. *Braz. J. Ecol.* 2: 33-38.
- DUPUIS AP AND HANN BJ. 2009. Climate change, diapause termination and zooplankton population dynamics: an experimental and modelling approach. *Freshw. Biol.* 54(2): 221–235. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02103.x
- IPCC. 2007. Climate change 2007: impacts, adapation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the in- tergovernmental panel on climate change. M. L. Parry, O. F. Canziani, J. P. Palutikof, P. J. van der Linden, and C. E. Hanson, eds. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- LA GH, JEONG HG, KIM MC, JOO GJ, CHANG KH AND KIM HW. 2009. Response of diapausing eggs hatching to changes in temperature and the presence of fish kairomones. *Hydrobiologia* 635: 399–402.
- LAMPERT W. 2006. *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology* 54:607–620
- LASS S, VOS M, WOLINSKA J & SPAAK P. 2005 Hatching with the enemy: *Daphnia* diapausing eggs hatch in the presence of fish kairomones. *Chemoecol* 15(1):7-12.
- MAIA-BARBOSA PM, ESKINAZI-SANT'ANNA EM, VALADARES, CF AND PESSOA GCD. 2003. The resting eggs of zooplankton from a tropical, eutrophic reservoir (Pampulha Reservoir, south-east Brazil). *Lakes Reserv. Manage.* 8: 269–275.



ONBÉ T. 1978. Sugar flotation method for sorting the dormant eggs of marine cladocerans and copepods from sea bottom sediment. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44: 1141.

PANARELLI EA, CASANOVA SMC AND HENRY R. 2008. The role of dormant eggs in the recovery of zooplankton community in a marginal lake of the Paranapanema River (São Paulo, Brazil), after a long drought period. Acta Limnol. Bras. 20:73-88.

PALAZZO F, BONECKER CC AND FERNANDES APC. 2008. Resting cladoceran eggs and their contribution to zooplankton diversity in a lagoon of the Upper Paraná River floodplain. Lakes Reserv. Manage. 13: 207–214

PANCELLA JR AND STROSS RG. 1963. Light induced hatching of *Daphnia* resting eggs. Chesap. Sci. 4(3):135. doi:10.2307/1350746

PIJANOWSKA J AND STOLPE G. 1996. Summer diapauses in *Daphnia* as a reaction to presence of fish. J. Plankton Res. 18(8):1407-1412.

PINTO-COELHO RM, BEZERRA-NETO J F, GIANI A, MACEDO C F, FIGUEIREDO CC AND CARVALHO EA. 2003. The collapse of a *Daphnia laevis* (Birge, 1878) population in Pampulha reservoir, Brazil. Acta Limnol. Bras. 15: 53–70.

ROJAS NE, MARINS MA AND ROCHA O. 2001. The effect of abiotic factors on the hatching of *Moina micrura* Kurz, 1874 (Crustacea: Cladocera) ephippial eggs. Braz. J. Biol. 61(3):371–6.

SANTANGELO JM. 2009. Produção, eclosão e implicações ecológicas e evolutivas dos estágios dormentes do zooplâncton. LIMNOtemas. 7: 3-26.

SANTANGELO J M, BOZELLI RL, ESTEVES FA AND TOLLRIAN, R. 2010. Predation cues do not affect the induction and termination of diapause in small-bodied cladocerans. Freshw. Biol. 55(7): 1577–1586. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02389.

SANTANGELO JM, ESTEVES FA, TOLLRIAN R AND BOZELLI RL. 2011. A small-bodied cladoceran (*Moina micrura*) reacts more strongly to vertebrate than

invertebrate predators: a transgenerational life-table approach. *J. Plankton Res.* 33(11):1767–1772. doi:10.1093/plankt/fbr063

SANTANGELO JM, ESTEVES FA, MANCA M, AND BOZELLI RL, 2014. Disturbances due to increased salinity and the resilience of zooplankton communities: the potential role of the resting egg bank. *Hydrobiologia* 722: 103–113.

SARMA SSS, NANDINI S AND GULATI RD. 2005. Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia* 542(1): 315–333. doi:10.1007/s10750-004-3247-2

ŚLUSARCZYK M AND PIETRZAK B. 2008. To sink or float: the fate of dormant offspring is determined by maternal behaviour in *Daphnia*. *Freshw. Biol.* 53(3): 569–576. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01937.x

STROSS .1966. Light and temperature requirements for diapause development and release in *Daphnia*. *Ecology* 47(3):368-374.

VANDEKERKHOVE J, DECLERCK S, BRENDONCK L, CONDE-PORCUNA, J. M, JEPPESEN, E AND DEMEESTER, L. 2005. Hatching of cladoceran resting eggs: temperature and photoperiod. *Freshw. Biol.* 50(1): 96–104. doi:10.1111/j.1365-2427.2004.01312.x

VENABLES WN AND RIPLEY BD. 2002. *Modern applied statistics with S -PLUS*, New York: Springer, 495p

WOJTAL-FRANKIEWICZ A. 2011. The effects of global warming on *Daphnia* spp. population dynamics: a review. *Aquat. Ecol.* 46(1): 37–53. doi:10.1007/s10452-011-9380-x

ZADEREEV E. AND LOPATINA T. 2007. The induction of diapause in *Moina* by species-specific chemical cues. *Aquat. Ecol.* 41: 255-261

ZADEREEV E. 2003. Maternal effects, conspecific chemical cues, and switching from parthenogenesis to gametogenesis in the cladoceran *Moina macrocopa*. *Aquat. Ecol.* 37: 251–255.



### **Capítulo 3- Efeitos de sinais de alarme e de predação na produção e eclosão de ovos de resistência de *Daphnia laevis* Birge, 1878 de uma lagoa tropical.**

Thécia Alfenas Silva Valente Paes; Arnola Cecília Rietzler; Lorena Fortes Brito; Paulina Maria Maia-Barbosa\*

#### **Resumo**

O reconhecimento de potenciais predadores pelas presas antes do ataque do predador, fornece tempo para a indução de mecanismos de defesa, podendo atuar como sinal para diapausa. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de sinais de alarme e de cairomônio de vertebrado e invertebrado, na história de vida e na eclosão e produção de efípios de *Daphnia laevis* de uma lagoa tropical permanente. Indivíduos ativos de *D. laevis* e ovos de resistência foram expostos a sinais de predadores vertebrados (*Poecilia vivipara*) e invertebrados (*Chaoborus* sp.) e a sinais de alarme (*D. laevis*). Nenhum dos sinais avaliados neste trabalho induziu a produção e formação de efípios. Sinais de invertebrados e vertebrados não promoveram alterações morfológicas no clone de *D. laevis* avaliado. Para os tratamentos controle e cairomônio de *Chaoborus*, o número de neonatas produzidas na primeira reprodução foi inferior aos produzidos na segunda e terceira reprodução. Indivíduos expostos aos sinais de alarme apresentaram menor tamanho corporal na primípara e menor produção de neonatas. Sinais de alarme atuam de maneira mais efetiva na alteração dos aspectos relacionados à história de vida de *D. laevis* do que os sinais de predação e podem ser mais relevantes para este clone, que co-ocorre com multipredadores no habitat em que vive.

Palavra-chave: cairomônio de vertebrado, cairomônio de invertebrado, efípio, diapausa

## Introdução

O perigo exercido por predadores pode ser detectado pelas presas por meio de dois tipos de sinais químicos: cairomônio e sinais de alarme (Larsson and Dodson, 1993). O cairomônio é uma substância química liberada por uma espécie (predador), recebido por uma segunda espécie (presa), e é uma adaptação favorável para a segunda espécie, mas não para a primeira. Cairomônios permitem a presa detectar e fugir de predadores (Ferrari, Wisenden & Chivers, 2010). Os sinais de alarme são liberados por indivíduos da mesma espécie, quando sujeitos a predação, seja esta letal ou não letal. Alguns predadores não ingerem a presa, mas a agridem, fazendo com que algum sinal seja liberado na água. Tal sinal informa a outras presas o risco de predação antes do ataque (Pijanowska, 1997).

O reconhecimento de potenciais predadores pelas presas antes do ataque dá tempo para a indução de mecanismos de defesa, com o objetivo de aumentar a performance dos indivíduos e a persistência das populações a longo prazo (Santangelo, 2009). Dentre estes mecanismos estão as alterações morfológicas, comportamentais e diapausa. Para a região temperada, alguns trabalhos relataram os efeitos desses metabólitos na produção e eclosão de ovos de resistência (Burns, 1995; Ślusarczyk, 1999; Zadereev & Lopatina, 2006; Ślusarczyk & Rybicka, 2011). Na região tropical, são poucos os estudos que visam avaliar os efeitos de sinais químicos, ainda não sendo verificado o efeito de sinais de predação na diapausa de cladóceros (Santangelo et al., 2010).

A diapausa em cladóceros ocorre a partir da alteração do modo reprodutivo, da partenogênese para gametogênese, onde as mães passam a produzir ovos de resistência, que em algumas espécies é protegido por uma capsula denominada efípio. A estratégia de produzir ovos de resistência sob efeito de sinais químicos, fornece vantagens competitivas aos indivíduos, por garantir a sobrevivência da prole por meio da formação de estágio de dormência (Zadereev, 2007), evitando assim a predação. Para *Daphnia* resultados controversos têm sido encontrados quando organismos ativos ou ovos de resistência são expostos aos sinais químicos (Burns, 1995; Pijanowska & Stolpe, 1996; Ślusarczyk, 1999; Burns, 2000; Lurling et al., 2001; Ślusarczyk & Rygielska, 2004). Ślusarczyk (1999) observou que a exposição de *Daphnia magna* somente a um macerado de *Daphnia* e à água de cultivo de peixe não induziu a produção de efípios. Para tal, foi necessário não apenas o sinal químico do predador, mas também da presa.

A presença de sinais químicos de predadores exerce também influência no processo de eclosão de estágios dormentes, podendo afetar a taxa de eclosão dos ovos de resistência e também a sincronia, conforme relatado por Bozelli et al. (2008) para *D. obtusa*. No entanto, ao contrário do esperado, sinais de predadores vertebrados tem induzido a eclosão (Angeler, 2005; Lass et al., 2005; Hwan La, et al., 2009). Nesses trabalhos, a presença do potencial ameaçador, o predador vertebrado (peixe), não inibiu e sim estimulou. Os ovos de resistência eclodiram, mesmo na presença do suposto inimigo. Hwan La et al. (2009), argumentaram que a presença de peixes poderia ser um sinal da ausência de predação por invertebrados e funcionar então como um estímulo para eclosão.

Na lagoa Jacaré, efípios de *Daphnia laevis* são encontrados em grandes densidades, mas os fatores que estimulam a formação e eclosão dos mesmos ainda não foram compreendidos (Brandão et al. 2012; 2014; Paes et al., no prelo). A partir da avaliação da dinâmica populacional dessa espécie, foi possível verificar uma diferença na distribuição vertical, estratégia desenvolvida como forma de escape a predadores. Além disso, as interações tróficas nesse ecossistema podem estar sendo alteradas, devido à introdução de espécies exóticas de peixes. Segundo a hipótese da cascata trófica invertida (Pinto-Coelho et al., 1998), a presença de espécies de peixes não nativas foi responsável pelo incremento numérico das larvas de *Chaoborus* que passaram a exercer forte pressão de predação sobre organismos planctônicos. Assim, a avaliação dos efeitos de sinais de alarme, cairomônios de vertebrados e invertebrados na formação e eclosão de efípios, pode ser um caminho para se conhecer sobre os processos desencadeadores da dormência nas populações de *Daphnia laevis* neste ambiente.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de sinais de alarme, cairomônio de vertebrado e invertebrado, na eclosão e produção de efípios e na história de vida de *Daphnia laevis* de uma lagoa tropical permanente.

## **Material e Métodos**

Foram desenvolvidos dois experimentos para avaliar os efeitos do sinal de alarme, sinais de predadores (cairomônio) na eclosão de ovos de resistência e na história de vida de *D. laevis*. oriunda de efípio e cultivada por partenogênese em laboratório.

Foram montados dois ensaios experimentais: o primeiro formado pelo tratamento controle e sinal de alarme e o segundo pelo controle e pelos tratamentos com cairômonio de predador vertebrado e invertebrado. Para ambos os ensaios foi adicionada alta concentração de alimento ( $1,0 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup> de *Kirchineriela obesa*). O meio de cultivo base utilizado nos experimentos foi água da lagoa Jacaré filtrada em rede de 68µm e aerada por 24 horas. Cada tratamento teve três repetições (béqueres de 500mL) que foram mantidas em incubadora a 24°C e fotoperíodo 12/12h.

Os efípios utilizados nos experimentos foram coletados do sedimento da lagoa Jacaré (S 19° 48' 28.8", N 42° 38' 55.5") com coletor tipo corer e armazenados em frascos escuros. No laboratório os efípios foram separados do sedimento através de homogeneização em solução de açúcar e água destilada (1:1) (Onbé, 1978) sendo pipetados aqueles que estavam em suspensão. Estes efípios foram colocados em frasco com fundo de rede de plâncton e mantidos em solução de hipoclorito a 2% por 20 minutos sendo então lavados com auxílio de uma pipeta, com 500mL de água destilada e os viáveis utilizados no experimento.

- **Ensaio experimental 1- Sinal de Alarme**

O sinal de alarme foi obtido a partir da maceração de 50 neonatas de *D. laevis*, adicionado diariamente em cada béquer.

Tratamento 1- controle

Foram utilizadas 15 neonatas de *D. laevis* mantidas em béquer com 500 mL de meio de cultivo base. Neste mesmo recipiente foi colocado um frasco com fundo de rede de 68µm contendo 100 ovos de resistência oriundos dos efípios e mantidos em contato com a água.

Tratamento 2- sinais de alarme

Foram utilizadas 15 neonatas de *D. laevis* mantidas em béquer com 500 mL de meio de cultivo base. Neste mesmo recipiente foi colocado um frasco com fundo de rede de 68µm, contendo 100 ovos de resistência oriundos dos efípios e mantidos em contato com a água. Diariamente foi adicionado o sinal de alarme (50 neonatas/500mL). Esta montagem permite o contato indireto das neonatas de *D.laevis* e ovos de resistência com o macerado de *D.laevis* (sinal de alarme)

Os experimentos foram acompanhados até a terceira reprodução. Foram registrados a idade (dias) da mãe no momento da liberação das neonatas, o tamanho

corporal de 3 indivíduos (mãe), o número de indivíduos nascidos em cada reprodução, a razão sexual dos mesmos e o tamanho do espinho da mãe e das neonatas.

- **Ensaio experimental 2- Sinais de Predação (Cairomônio)**

Para esse experimento foram utilizados cairomônio de *Chaoborus brasiliensis*, predador invertebrado e cairomônio de *Poecilia vivipara* (2 a 4 cm), predador vertebrado, coletados na lagoa do Nado e Jacaré, respectivamente. Larvas de *Chaoborus* foram coletadas por arrastos verticais com rede de plâncton de 60 µm e peixes por arrastos com rede de malha de 1mm na região litorânea.

Soluções contendo cairomônio em elevada concentração foram preparadas e congeladas a -20°C (Slusarczyk & Rybicka, 2011). Para o preparo de cairomônio de *Poecilia vivipara*, os indivíduos foram mantidos em água da lagoa Jacaré (aerada por 24h), na proporção de 1 peixe/100mL e alimentados com 50 neonatas de *D. laevis*, por 24h. Posteriormente a água foi filtrada em filtro de fibra de vidro de 0,45µm e separadas alíquotas de 50 mL.

Para o preparo de cairomônio de *C. brasiliensis*, larvas foram mantidas em água da lagoa Jacaré (aerada por 24h), na proporção de 20larvas/100mL e alimentadas com 40 neonatas de *D. laevis*, por 24h. Posteriormente a água foi filtrada em filtro de fibra de vidro de 0,45µm, e separadas alíquotas de 50 mL.

#### Tratamento 1- controle.

Foram utilizadas oito neonatas de *D. laevis* mantidas em béquer com 500L de meio de cultivo base. Neste mesmo recipiente foi colocado um frasco com fundo de rede de 68µm, contendo 100 ovos de resistência oriundos dos efípios e mantidos em contato com a água.

#### Tratamento 2- com predador invertebrado.

Foram utilizadas oito neonatas de *D. laevis* mantidas em béquer com 500L de meio de cultivo base. Neste mesmo recipiente foi colocado um frasco com fundo de rede de 68µm, contendo 100 ovos de resistência oriundos dos efípios e mantidos em contato com a água. Diariamente foi adicionada uma alíquota de 50mL de cairomônio de larvas de *C. brasiliensis*. Desse modo, a concentração final foi de 20 larvas/litro, alimentadas com 40 neonatas de *D. laevis*.



### Tratamento 3- com predador vertebrado

A mesma montagem do tratamento 2, no entanto, diariamente foram adicionadas uma alíquota de 50mL de cairomônio de *Poecilia vivipara*. Desse modo, a concentração final foi de 1peixe/litro, alimentado com 50 neonatas.

A cada dois dias o meio foi parcialmente trocado em todos os béqueres (100 mL de água da lagoa aerada por 24h).

Os experimentos foram acompanhados até a terceira reprodução. Foi registrada a idade (dias) da mãe no momento da liberação das neonatas, o tamanho corporal das mães, o número de indivíduos nascidos em cada reprodução, a razão sexual dos mesmos e o tamanho do espinho da mãe e das neonatas.

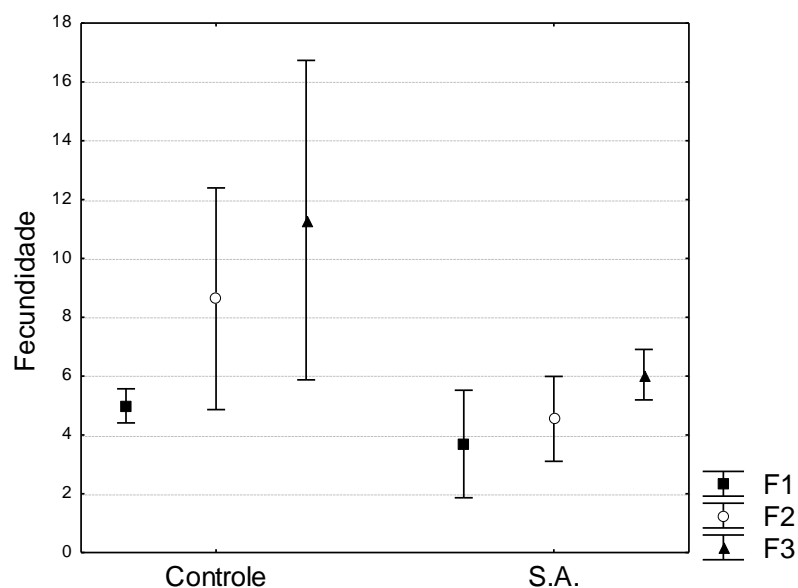
Para avaliação estatística foi utilizado o teste-t quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade das variâncias e Kruskal-Wallis para análise não paramétrica.

## Resultados

- **Ensaio experimental 1- Sinal de Alarme**

Os indivíduos de *D. laevis* iniciaram a reprodução após 6 dias do início dos experimentos em ambos os tratamentos (controle e sinais de alarme). O tamanho corporal da primípara exposta ao Sinal de Alarme (S.A.) foi menor (1412  $\mu\text{m}$ ) do que o tamanho das primíparas do controle (1595  $\mu\text{m}$ ) ( $t= 2,73$ ;  $df= 10$ ;  $p= 0,02$ ).

Foi verificado aumento da produção de neonatas nas sucessivas gerações para ambos os tratamentos. No entanto, a fecundidade média dos indivíduos foi inferior para o tratamento com S.A. (KW-H-1;6= 3,85;  $p= 0.049$ ). Diferenças morfológicas, como alteração no tamanho do espinho, não foram observadas para a “mãe” e neonatas (Figura 1).

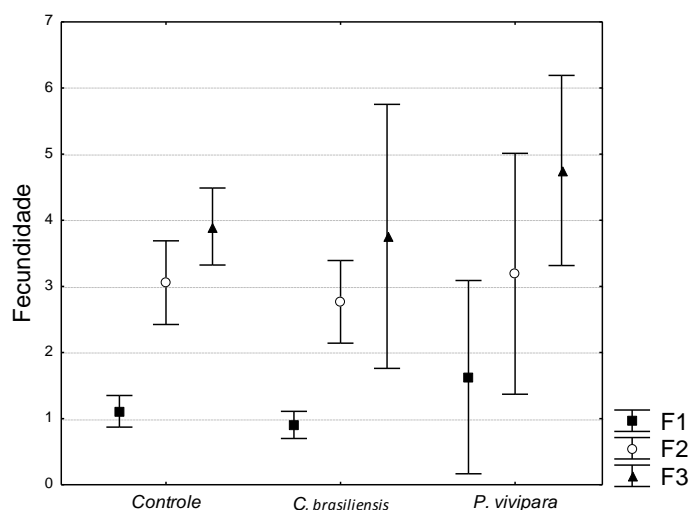


**Figura 1.** Fecundidade média de *Daphnia laevis*, nas três primeiras reproduções, na ausência (controle) e na presença de sinais de alarme (S.A.) da mesma espécie. Barras verticais representam intervalo de confiança.

- **Ensaio experimental 2- Sinal de Predação (Cairomônio)**

Os indivíduos de *D. laevis* iniciaram a reprodução após seis dias do início dos experimentos para o tratamento com cairomônio de *Poecilia vivipara*, e em sete dias para o tratamento Controle e com cairomônio de *Chaoborus brasiliensis*. Não foi observada diferença significativa no tamanho corporal da primípara (KW-H(2;27) = 2,7046; p = 0,2586). Os valores médios do tamanho corporal registrados no Controle, tratamento com cairomônio de *C. brasiliensis* e *P. vivipara* foram 1460, 1485 e 1500µm respectivamente.

A fecundidade média dos indivíduos também não foi significativamente diferente entre os tratamentos. Foi observado aumento da produção de neonatas nas sucessivas gerações em todos os tratamentos, com diferença significativa entre o número de neonatas da primeira para as demais reproduções, no controle (KW-H(2;9) = 7,2605; p = 0,0265) e tratamento com cairomônio de *C. brasiliensis* (KW-H(2;9) = 6,9379; p = 0,0312). Para o tratamento com cairomônio de *P. vivipara* não foi observada diferença no número de neonatas entre as reproduções (Figura 2). Não foi observado o nascimento de organismos machos e nem diferenças morfológicas, como alteração no tamanho do espinho, para a mãe e neonatas..



**Figura 2.** Fecundidade de *Daphnia laevis*, nas três primeiras reproduções, na ausência (controle) e na presença de sinais de predação de *Chaoborus brasiliensis* e *Poecilia vivipara*. Barras verticais representam intervalo de confiança.

A eclosão dos ovos de resistência não foi estimulada pelos sinais de predação e sinal de alarme (Tabela 1). As taxas de eclosão variaram 0 a 5% entre as repetições. O nascimento de machos não foi registrado em nenhum tratamento.

**Tabela 1.** Eclosão de ovos de resistência (%) submetidos a sinal de alarme (S.A.), sinal de predação de *Chaoborus brasiliensis* e *Poecilia vivípara*.

Tratamento	Repetição	% de eclosão
Controle	1	2
Controle	2	1
Controle	3	3
S.A.	1	3
S.A.	2	0
S.A.	3	5
Controle	1	2
Controle	2	0
Controle	3	0
<i>C. brasiliensis</i>	1	0
<i>C. brasiliensis</i>	2	2
<i>C. brasiliensis</i>	3	0
<i>P. vivipara</i>	1	0
<i>P. vivipara</i>	2	1
<i>P. vivipara</i>	3	0

## Discussão

Durante qualquer evento de predação, cairomônios e sinais de alarme podem ser liberados, resultando em um conjunto complexo de sinais químicos a ser interpretado pela presa para avaliar corretamente o nível de ameaça e tomar decisões defensivas apropriadas (Ślusarczyk, 1999; Schoeppner and Relyea, 2005; Laforsch et al., 2006; Pestana et al., 2013).

No presente trabalho, sinais de alarme não influenciaram na formação e eclosão de ovos de resistência. A produção de estágios dormentes sob exposição de sinais de predação de vertebrados foi relatada somente para *Daphnia magna* (Pijanowska & Stolpe, 1996; Ślusarczyk, 1999; Ślusarczyk & Rygielska, 2004; Ślusarczyk, 2005) e *D. lumholzti* (Dzialowski et al., 2003) não tendo ainda sido detectada a formação de efípios na presença de sinais do gênero *Chaoborus* (Dzialowski et al., 2003; Santangelo, et al., 2011).

Em relação aos efeitos dos sinais de predadores vertebrados na eclosão de efípios, não há relatos de interferência e de alteração no padrão temporal do nascimento das neonatas, inibição e estímulo de eclosão (Angeler, 2005; Lass, et al., 2005; Bozelli et al., 2008; La et al., 2009; Santangelo et al., 2010). Por outro lado, La et al., (2009) verificaram maior eclosão de ovos de resistência na presença de cairomônio de vertebrados, provavelmente por uma possível supressão dos invertebrados através da predação por vertebrados, o que seria um sinal para eclosão. Para o clone de *D.laevis* avaliado neste trabalho, a presença de cairômionio de vertebrado e ausência de cairomônio de invertebrado não foi suficiente para estimular a eclosão. Os ovos de resistência não eclodiram sob nenhuma das situações de exposição.

A eclosão de efípios sob influência de sinais de alarme já foi avaliada para *Moina micrura* e *Diaphanosoma birgei*, não tendo sido detectado nenhum efeito na eclosão de efípios (Santangelo et al., 2010) e até o presente momento, nenhum trabalho registrou a produção de ovos de resistência na presença destes sinais.

A ausência de formação e eclosão de estágios dormentes observada neste trabalho pode ter ocorrido por diversos motivos, dentre eles podemos citar: a concentração de organismos usados para o preparo dos sinais químicos, pois dafinídeos podem detectar diferentes concentrações de sinalização, levando a diferenças na percepção dos níveis de risco de predação e, conseqüentemente, a diferenças na magnitude das respostas (Reede 1995; Castro et al., 2007); a elevada disponibilidade

alimentar que pode reduzir o efeito de sinais conspecíficos, podendo não ocorrer formação de efípios (Zadereev e Gubanov, 1996); outras combinações experimentais envolvendo predador/presa, já que estes sinais são primordiais para a formação de ovos de resistência (Ślusarczyk, 1999); e a ausência de interferência dos sinais avaliados na dormência deste clone, visto que a indução de diapausa pode ser dependente do genótipo (Lass et al., 2005).

A adaptação local do clone em relação aos regimes de predação específicas do habitat em que ele se encontra tem sido relatada. Clones provenientes de habitats com peixes mostraram-se mais sensíveis à cairomônio de peixes do que clones oriundos de locais sem peixe (De Meester, 1996; Boersma et al, 1999). Estes resultados indicam que existe uma relação entre a resposta específica de um clone e produtos químicos mediados por predadores e sua história evolutiva no que diz respeito à presença de um predador particular no habitat do qual o clone vive (Lass and Spaak, 2003). No nosso trabalho, apesar do clone *D. laevis* coexistir com ambos os predadores utilizados nos experimentos (*C. brasiliensis* e *P. vivípara*), os sinais químicos avaliados não promoveram alterações morfológicas ou nos parâmetros relacionados à história de vida.

Para cairomônio de predadores, foi observado somente número de neonatas produzidas na primeira reprodução inferior aos produzidos na segunda e terceira reprodução, para controle e cairomônio de *Chaoborus*. Para *P. vivípara* não foi observada diferença significativa entre o número de neonatas entre as gerações, apenas uma antecipação de 1 dia para a liberação da prole da primeira reprodução.

A maturação antecipada e liberação mais rápida da prole na presença de sinais de predadores vertebrados foi verificada por Santangelo et al., (2011) e Pestana et al., (2013), sendo considerada uma alteração importante por reduzir a chance de predação antes de um evento reprodutivo. A maior produção de neonatas na presença de peixes pode funcionar como uma tentativa de garantir que pelo menos alguns indivíduos sobrevivam e reproduzam, garantindo a persistência da população em longo prazo (Santangelo et al., 2011).

Respostas antagônicas tem sido mostradas em dafinídeos sob risco de predação de vertebrados e invertebrados (Weber and Declerck, 1997; Dzialowski et al., 2003). Normalmente, indivíduos cultivados sob influencia de sinais de *Chaoborus* apresentam maior espinho caudal e comprimento corporal do que os indivíduos do controle e os expostos aos sinais de peixes (Dzialowski et al., 2003).. As respostas dos organismos

expostos a cairomônio de *C. brasiliensis* e *P. vivípara*. foram semelhantes no presente trabalho. A ausência de alterações morfológicas poderia ser uma boa estratégia em ambientes tropicais onde coexistem predadores com diferentes mecanismos de captura. As alterações morfológicas que geralmente aumentam a visibilidade, como por exemplo formação de espinho e elmo, podem ser desvantajosas na presença de predadores visuais (Tollrian, 1995; Lass and Spaak, 2003).

Resultados contraditórios também têm sido relatados em relação às respostas de dafinídeos a sinais de alarme. Pestana et al., (2013) não observaram qualquer alteração significativa nos parâmetros relacionados a história de vida quando *D. magna* foi exposta somente a sinais de alarme. No estudo de Laforsch et al., (2006) as espécies de *Daphnia* avaliadas apresentaram alterações morfológicas tanto na presença de sinais de predadores, quanto na presença somente de sinais de alarme. No entanto, a presença de sinais de predação eram mais perceptíveis quando o cairomônio era produzido a partir da ingestão pelo predador, de presa conspecífica.

No nosso trabalho, os resultados demonstraram que sinais de alarme induziram, de forma mais evidente, alterações na história de vida do que sinais de predação. Indivíduos expostos aos sinais de alarme apresentaram menor tamanho corporal na primípara e menor produção de neonatas. Laforsch et al. (2006) afirmam que os sinais de alarme são não específicos, sendo, então importante considerar se no ambiente existem predadores com diferente seletividade alimentar, por exemplo, invertebrados ou peixes. Mesmo que o sinal de alarme não forneça uma informação particular sobre o predador, ele pode ser relevante por gerar um estado geral de alerta. A presença de alterações na história de vida, no experimento com sinal de alarme, e a ausência no experimento com sinais dos predadores, poderia ser indicativo de que as espécies de predadores utilizadas não são as principais ameaças para o clone de *D. laevis* utilizado, ou que para o clone avaliado o principal sinal está relacionado aos sinais produzidos pelas presas e não pelos predadores.

Santangelo et al. (2011) verificaram que *Moina micrura* apresentou menor tamanho na primípara quando exposta a cairomônio de peixes. Resultados semelhantes foram observados em nosso trabalho apenas quando os organismos foram expostos aos sinais de alarme. Se os sinais de alarme liberados por *D. laevis* estimularam um menor crescimento corporal, o estado de alerta emitido por estes sinais pode ser um sinal de

que o principal predador no habitat em que o clone vive tem preferência por presas com maior tamanho corporal, sendo possivelmente um predador vertebrado.

Experimentos adicionais, com diferentes concentrações de organismos para o preparo de sinais químicos, e o uso de mais combinações de sinais de predadores e presas poderiam fornecer respostas diferentes às obtidas neste trabalho. No entanto, a partir do que foi avaliado, concluímos que sinais de alarme e de predadores vertebrados e invertebrados, não foram responsáveis pelo mecanismo de dormência em *D. laevis* nos experimentos realizados. Sinais de alarme atuam de maneira mais efetiva na alteração dos aspectos relacionados à história de vida do que os sinais de predação e podem ser mais relevantes para o clone avaliado, que co-ocorre com multipredadores no habitat em que vive.

### Referências Bibliográficas

- Angeler, D. G. 2005. No diapause prolongation response of *Daphnia* in the presence of planktivorous mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecological Research*, 20(5), 619–622. doi:10.1007/s11284-005-0075-4
- Bozelli, R. L., Tonsi, M., Sandrini, F., & Manca, M. 2008. A Big Bang or small bangs? Effects of biotic environment on hatching. 67(2), 100–106.
- Brandão, L. P. M., Fajardo, T., Eskinazi-Sant’anna, E., Brito, S., & Maia-Barbosa, P. 2012. Fluctuations of the population of *Daphnia laevis* Birge 1878: a six-year study in a tropical lake. *Brazilian Journal of Biology*, 72(3), 479–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990818>
- Burns, C. W. 1995. Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia*, 101(2), 234–244. doi:10.1007/BF00317289
- Burns, C. W. 2000. Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, 43(1), 19–29. doi:10.1046/j.1365-2427.2000.00510.x
- Dzialowski, A. R., Lennon, J. T., O’Brien, W. J., & Smith, V. H. 2003. Predator-induced phenotypic plasticity in the exotic cladoceran *Daphnia lumholtzi*. *Freshwater Biology*, 48(9), 1593–1602. doi:10.1046/j.1365-2427.2003.01111.x
- Ferrari, M. C. O., Wisenden, B. D., & Chivers, D. P. 2010. Chemical ecology of predator–prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. The present review is one in the special series of reviews on animal–plant interactions. *Canadian Journal of Zoology*, 88(7), 698–724. doi:10.1139/Z10-029

- La, G. H., Jeong, H. G., Kim, M. C., Joo, G. J., Chang, K. H., & Kim, H.-W. 2009. Response of diapausing eggs hatching to changes in temperature and the presence of fish kairomones. *Hydrobiologia*, 635(1), 399–402. doi:10.1007/s10750-009-9913-7
- Laforsch, C., Beccara, L., & Tollrian, R. 2006. Inducible defenses: The relevance of chemical alarm cues in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1466–1472. doi:10.4319/lo.2006.51.3.1466
- Lass, S., & Spaak, P. 2003. Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia*, 491(1-3), 221–239. doi:10.1023/A:1024487804497
- Lass, S., Vos, M., Wolinska, J., & Spaak, P. 2005. Hatching with the enemy: *Daphnia* diapausing eggs hatch in the presence of fish kairomones. *Chemoecology*, 15(1), 7–12. doi:10.1007/s00049-005-0286-8
- Schoeppner, N. M. & Relyea R. A. 2005. Damage, digestion, and defence: the roles of alarm cues and kairomones for inducing prey defences, *Ecology*, 8:505–512. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00744.x
- Lurling, Miquel, Donk, V. 2001. Response of *Daphnia* to substances released from crowded congeners and conspecifics, *Journal of Plankton Research*, 25(8): 967-978.
- Pestana, J. L. T., Baird, D. J., & Soares, a. M. V. M. 2013. Predator threat assessment in *Daphnia magna*: the role of kairomones versus conspecific alarm cues. *Marine and Freshwater Research*, 64(8), 679. doi:10.1071/MF13043
- Pijanowska, J. 1997. Alarm signals in *Daphnia* ?*Oecologia*, 112:12–16.
- Pijanowska, J., & Stolpe, G. 1996. Summer diapause in *Daphnia* as a reaction to the presence of fish. *Journal of Plankton Research*, 18(8), 1407–1412. doi:10.1093/plankt/18.8.1407
- Santangelo, J. M., Bozelli, R. L., Esteves, F. A., & Tollrian, R. 2010. Predation cues do not affect the induction and termination of diapause in small-bodied cladocerans. *Freshwater Biology*, 55(7), 1577–1586. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02389.x
- Santangelo, J. M., Esteves, F. A., Tollrian, R., & Bozelli, R. L. 2011. A small-bodied cladoceran (*Moina micrura*) reacts more strongly to vertebrate than invertebrate predators: a transgenerational life-table approach. *Journal of Plankton Research*, 33(11), 1767–1772. doi:10.1093/plankt/fbr063
- Ślusarczyk, M. 1999. Predator-induced diapause in *Daphnia magna* may require two chemical cues. *Oecologia*, 119(2), 159–165. doi:10.1007/s004420050772
- Ślusarczyk, M., & Rybicka, B. 2011. Role of temperature in diapause response to fish kairomones in crustacean *Daphnia*. *Journal of Insect Physiology*, 57(5), 676–80. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.12.004



Ślusarczyk, M., & Rygielska, E. 2004. Fish faeces as the primary source of chemical cues inducing fish avoidance diapause in *Daphnia magna*. *Hydrobiologia*, 526(1), 231–234. doi:10.1023/B:HYDR.0000041599.56610.b4

Zadereev, E., & Lopatina, T. 2006. The induction of diapause in *Moina* by species-specific chemical cues. *Aquatic Ecology*, 41(2), 255–261. doi:10.1007/s10452-006-9062-2

## **Capítulo 4- Efeito inibitório de *Eucalyptus urograndis* na eclosão de ovos de resistência de *Daphnia ambigua* Scourfield, 1947**

Thécia Alfenas Silva Valente Paes; Arnola Cecília Rietzler; Daniel Marchette Maronezze ; Grace Kelly Vieira Pereira; Paulina Maria Maia-Barbosa\*

### **Resumo**

Folhas senescentes de eucalipto depositam-se na serapilheira às margens dos ambientes aquáticos e representam um potencial impacto para os organismos, devido aos compostos alelopáticos liberados. Efeitos tóxicos de eucaliptos já foram reportados para neonatas de *Daphnia* mas não para ovos de resistência, uma importante reserva de biodiversidade. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da água contendo folhas de *E. urograndis* em decomposição, na eclosão de ovos de resistência de *Daphnia ambigua*. Ovos de resistência foram expostos às concentrações de 1, 2, 3 e 6 g.L<sup>-1</sup> de folhas de *Eucalyptus urograndis* em decomposição, a períodos de tempo de decomposição com intervalos de 3, 5, 7, 14 e 30 dias e tempo de exposição dos ovos por um período de 1,3,5, 7 e 10 dias. Não foi verificado efeito de concentração sobre a eclosão dos ovos de resistência quando o tempo de exposição foi curto (um dia). O efeito inibitório na eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* está relacionado ao sinergismo entre tempo de decomposição foliar (3 dias) e tempo de exposição dos ovos (5 dias).

Palavras-chave: eucalipto, diapausa, efípio, Cladocera, alelopatia

### **Introdução**

Atualmente o Brasil possui cerca de 3,4 milhões de hectares ocupados pela cultura de eucalipto, com destaque para o estado de Minas Gerais que apresenta a maior área reflorestada, com cerca de 1 milhão de hectares plantados para a produção de carvão vegetal, celulose e lenha (Guimarães & Sans, 2007). Grande parte destas culturas localiza-se próximas a recursos hídricos, recebendo, conseqüentemente, material alóctone proveniente desta atividade. As folhas senescentes depositam-se na serapilheira

às margens dos ambientes aquáticos, e podem ser carregadas para os mesmos com as chuvas, levando consigo os constituintes químicos, (Araújo et al, 2010). Vários destes constituintes apresentam efeitos tóxicos (Souza, 2015) e a presença deles em meio aquoso representa risco aos organismos aquáticos (Zagatto & Bertoletti, 2006). O efeito tóxico do eucalipto é devido à presença de compostos fenólicos como eucaliptol, taninos e monoterpênicos (Yamagushi et al., 2011).

Plantas, algas, bactérias e fungos podem produzir metabólitos secundários (aleloquímicos) que são liberados no ambiente e podem influenciar direta ou indiretamente no crescimento e desenvolvimento de outros organismos (Rice, 1984). As substâncias alelopáticas do eucalipto podem atuar no desenvolvimento de inúmeros tipos de organismos, sendo o efeito tóxico relatado para vegetais (Souza & Cardoso, 2013), percevejo (Souza, 2015), lagarta (Souza et al., 2010), cladóceros e chironomídeos (Araújo et al, 2010; Duarte et al., 2010), o que evidencia a importância de se avaliar os efeitos do eucalipto sobre organismos terrestres e aquáticos.

Dentre os organismos aquáticos utilizados em testes de toxicidade estão os cladóceros, principalmente do gênero *Daphnia*, utilizados como bioindicadores por serem sensíveis na detecção de efeitos deletérios de substâncias químicas a organismos aquáticos (Araújo et al., 2010). Estudos ecotoxicológicos realizados com neonatas das espécies *Daphnia laevis* (espécie nativa) e *D. similis* (espécie padronizada exótica) expostas aos óleos voláteis de *Eucalyptus urograndis* e à água de decomposição foliar de *E. grandis* comprovaram efeitos de toxicidade (Zoratto, 2007; Araújo et al., 2010).

Cladóceros se reproduzem por partenogênese, mas quando submetidos à condições adversas, são capazes de produzir estágios dormentes, os ovos de resistência (Santangelo, 2009). Populações de cladóceros podem, a partir desse tipo de ovo, ser reestruturadas. Quando depositados no sedimento, funcionam como um banco de ovos com variabilidade genética e um refúgio temporal contra as condições adversas, permitindo o retorno da população após o restabelecimento das condições favoráveis no ambiente (Crispim & Watanabe, 2001). Atualmente, estas estruturas tem sido utilizadas para avaliar os efeitos de atividades antrópicas desenvolvidas no entorno do corpo d'água onde são encontradas. Efeitos negativos sobre a eclosão de estágios dormentes já foram registrados no caso de drenagem ácida de mina, metais pesados e contaminantes orgânicos (Jiang, Wang, Li, & He, 2007; Henri & Wepener, 2014;; Möst et al., 2015, Navis et al., 2015, Rogalski, 2015).

Além da avaliação de toxicidade em organismos aquáticos ativos, é importante avaliar os efeitos em estágios dormentes, já que estes poderão recompor as populações após condições de estresse. Até o momento não se conhece os efeitos dos compostos oriundos da decomposição de folhas de eucaliptos sobre os ovos de resistência produzidos por organismos aquáticos. E isso pode ser de grande relevância para ambientes aquáticos que possuem grande estoque de ovos de resistência em ambientes aquáticos com presença de *Eucalyptus* em suas margens e que possuem um estoque de ovos de resistência no sedimento.

A formação de ovos de resistência é uma característica dos organismos de *D. laevis* presente nesta lagoa Jacaré (entorno do Parque Estadual do Rio Doce - MG), e tem sido usada para explicar em parte, a dinâmica populacional desta espécie (Brandão et al., 2012; 2014). No entanto, a eclosão desses efípios em laboratório é quase nula (apenas 3% dos ovos eclodem), sugerindo a hipótese de que os compostos químicos, provenientes da decomposição foliar de *Eucalyptus* poderiam inibir a eclosão de ovos de resistência. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da água contendo folhas de *E. urograndis* em decomposição, na eclosão de ovos de resistência de *Daphnia*.

## **Material e Métodos**

Para os testes foram utilizados efípios de *Daphnia ambigua* coletados no reservatório do Parque Fazenda Lagoa do Nado, localizado na região norte de Belo Horizonte, Minas Gerais. Efípios de *D. laevis* coletados na lagoa Jacaré não foram utilizados devido às baixas taxas de eclosão (Paes et al, no prelo).

O sedimento foi coletado com um amostrador do tipo “corer”, sendo utilizados os seis primeiros centímetros. A amostra foi armazenada em frascos escuros e mantida a 4°C até a montagem do experimento. Os efípios foram separados do sedimento pelo método de flutuação por açúcar (Onbé, 1978) e pipetados do sobrenadante. Os ovos foram isolados dos efípios por meio da exposição à solução de hipoclorito a 2% por 20 minutos.

Com base em estudos já realizados por Araujo et al (2010), simulando o efeito potencial de folhas de eucalipto em ambiente aquático, foram conduzidos experimentos

para avaliar o efeito da concentração de folhas da serapilheira em decomposição, do tempo de decomposição de folhas de serapilheira e o efeito do tempo de exposição dos efípios ao material decomposto.

Para obtenção das concentrações desejadas foram colocadas 6 gramas de folhas de *Eucalyptus urograndis*, coletadas na serapilheira, em 1L de água de cultivo à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas, obtendo-se a concentração de  $6\text{g.L}^{-1}$ . Posteriormente, foram feitas diluições para obtenção das seguintes concentrações:  $1\text{g.L}^{-1}$ ,  $2\text{g.L}^{-1}$  e  $3\text{g.L}^{-1}$ . O tempo de decomposição das folhas refere-se ao tempo em que foram mantidas em contato com água de cultivo.

O tempo de exposição dos efípios na água de decomposição das folhas refere-se ao tempo em que foram mantidos refrigerados a  $4^{\circ}\text{C}$  e no escuro nesta água (condição cuja eclosão não é estimulada). Posteriormente, ovos isolados destes efípios foram mantidos em condições para eclosão ( $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12h) na água contendo o material foliar em decomposição.

Para cada experimento, os tratamentos foram montados em tréplica, totalizando 72 ovos de resistência por tratamento. Para avaliar a taxa de eclosão, as placas contendo os ovos de resistência foram mantidas à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, condição adequada para maior taxa de eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* (Paes et al., no prelo). O monitoramento da eclosão foi realizado por 15 dias.

#### *Efeito da concentração de folhas em decomposição*

Os ovos de resistência viáveis foram transferidos para uma placa de cultivo onde foi adicionado 5 mL da água de decomposição de folhas de *E. urograndis*, referente aos tratamentos de  $1\text{g.L}^{-1}$ ,  $2\text{g.L}^{-1}$ ,  $3\text{g.L}^{-1}$  e  $6\text{g.L}^{-1}$ . O tempo de decomposição das folhas e o tempo de exposição dos efípios para este ensaio experimental foi de 24 horas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tratamentos para avaliar o efeito da concentração de folhas de *E. urograndis* em decomposição, na eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* (n=3 placas contendo 24 ovos de resistência/tratamento).

Tratamento	Concentração	Tempo de decomposição	Tempo de exposição
1.1.1	1g.L <sup>-1</sup>	24h	24h
2.1.1	2g.L <sup>-1</sup>		
3.1.1	3g.L <sup>-1</sup>		
6.1.1	6g.L <sup>-1</sup>		

*Efeito do tempo de decomposição e do tempo de exposição dos efípios*

Foi desenvolvido um desenho experimental fatorial, com água na concentração de 1g.L<sup>-1</sup> e folhas decompostas, tempo de decomposição foliar de 3 e 5 dias e tempo de exposição de efípios de 3, 5, 7, 14 e 30 dias. O experimento foi montado conforme os anteriores (Tabela 2). A concentração de 1g.L<sup>-1</sup> foi escolhida, pois é a concentração de folhas de serapilheira que mais se aproxima da condição real (Araújo et al., 2008).

**Tabela 2.** Avaliação do efeito do tempo de decomposição de folhas de *E. urograndis* e do tempo de exposição dos efípios na água de decomposição, na eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* (n=3 placas contendo 24 ovos de resistência/tratamento).

Tratamento	Concentração	Tempo de decomposição	Tempo de exposição
1.3.3	1g.L <sup>-1</sup>	3 dias	3 dias
1.5.3		5 dias	3 dias
1.7.3		7 dias	3 dias
1.14.3		14 dias	3 dias
1.30.3		30 dias	3 dias
1.3.5	1g.L <sup>-1</sup>	3 dias	5 dias
1.5.5		5 dias	5 dias
1.7.5		7 dias	5 dias
1.14.5		14 dias	5 dias
1.30.5		30 dias	5 dias

*Efeito da decomposição das folhas em três dias e do tempo de exposição*

Esse ensaio experimental foi desenvolvido após a verificação de que o tempo de decomposição foliar de três dias inibia a eclosão dos ovos de resistência, e para avaliar também o efeito do tempo de exposição dos ovos na água sob essa condição de decomposição foliar. Foram utilizadas folhas de *E. urograndis*, decompostas por três dias, com tempos de exposição dos ovos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias (Tabela 3).

**Tabela 3.** Avaliação do tempo de exposição de folhas de *E. urograndis* em decomposição por 3 dias e do tempo de exposição dos efípios na água de decomposição, na eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* (n=3 placas contendo 24 ovos de resistência/tratamento).

Tratamento	Concentração	Tempo de decomposição	Tempo de exposição
1.3.1	1g.L <sup>-1</sup>	3 dias	1 dia
1.3.3			3 dias
1.3.5			5 dias
1.3.7			7 dias
1.3.10			10 dias

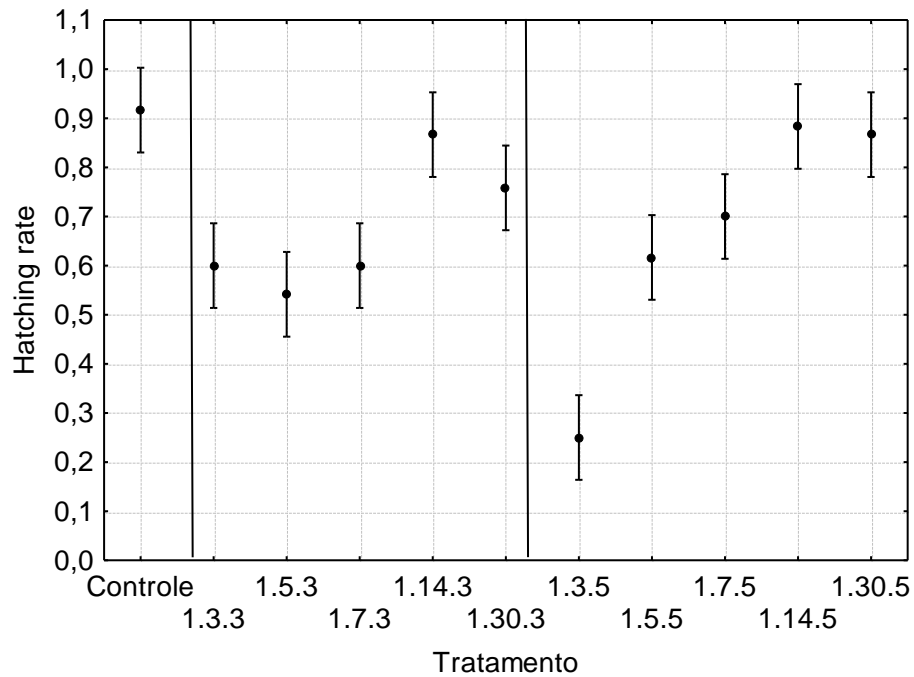
#### *Análise estatística*

Para a análise estatística foi utilizado Anova quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade das variâncias e Kruskal-Wallis para análise não paramétrica.

#### **Resultados**

Não foi observada diferença na taxa de eclosão para os tratamentos com diferentes concentrações de folhas de eucaliptos, deixadas por um dia em decomposição e um dia de exposição dos efípios (KW-H<sub>(4;15)</sub> = 3,0222; p = 0,55).

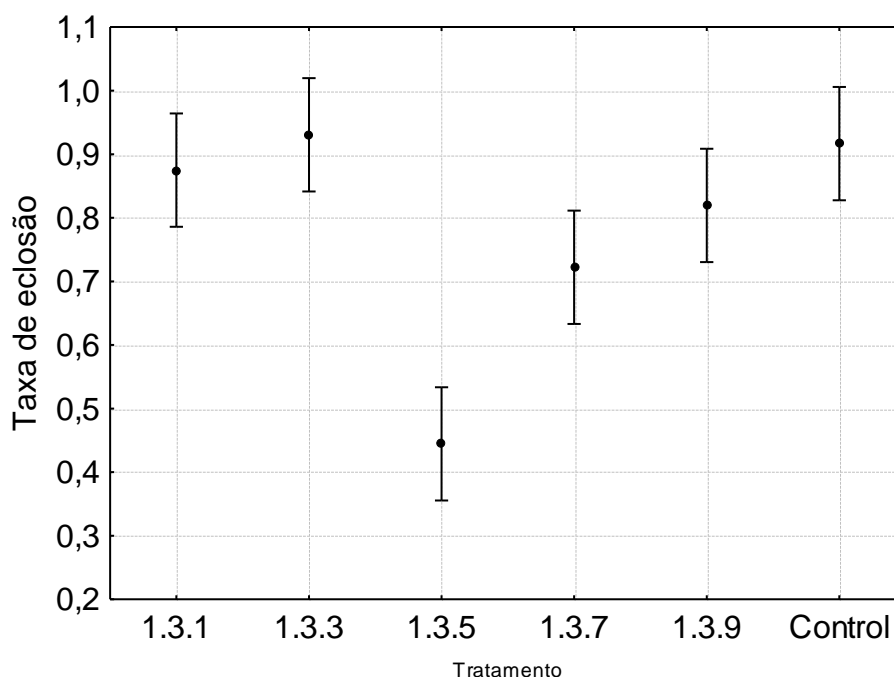
Quando os efípios foram expostos por mais tempo às folhas em decomposição, foi verificado efeito negativo na taxa de eclosão, mesmo utilizando a menor concentração avaliada neste trabalho (1g.L<sup>-1</sup>) (F<sub>(10,44)</sub> = 21,48; p < 0,01). O tratamento controle diferiu com maiores taxas de eclosão (92 ± 0,01%) dos tratamentos com tempo de decomposição das folhas inferior a 14 dias (Tukey, MS = ,00915, df = 44,000; p < 0,05). O Tratamento 1.3.5 se destacou dos demais por apresentar taxa de eclosão média inferior aos demais (25 ± 0,02%) (Figura 1).



**Figura 1.** Taxa de eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* sob diferentes tempos de decomposição de folhas de *E. urograndis* e tempo de exposição dos efípios na água de decomposição. O primeiro número do tratamento indica a concentração de folhas em decomposição ( $\text{g.L}^{-1}$ ), o segundo refere-se ao tempo de decomposição foliar (dias) e o terceiro o tempo de exposição dos ovos ao extrato aquoso (dias). Barras verticais representam intervalo de confiança.

Foi verificada diferença estatística relacionada ao tempo de exposição dos ovos ao material em decomposição, quando um grama de folhas foram decompostas por três dias ( $F_{(5, 12)}=20,065$ ,  $p=,00002$ ). O tratamento 1.3.5 apresentou novamente menor taxa de eclosão, com média de 0,44% (Figura 2).





**Figura 2.** Taxa de eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* sob diferentes tempo de exposição de folhas de *E. urograndis* em decomposição por 3 dias. O primeiro número do tratamento indica a concentração de folhas em decomposição ( $\text{g.L}^{-1}$ ), o segundo refere-se ao tempo de decomposição foliar (dias) e o terceiro o tempo de exposição dos ovos ao material em decomposição (dias). Barras verticais representam intervalo de confiança.

## Discussão

Efeitos tóxicos de eucaliptos já foram reportados para neonatas de *Daphnia* (Araújo et al., 2010; Araújo et al., 2010) mas não para ovos de resistência, uma importante reserva de biodiversidade. O efeito inibitório na eclosão de ovos de resistência de *D. ambigua* está relacionado ao sinergismo entre tempo de decomposição foliar e tempo de exposição dos ovos aos compostos liberados com a decomposição.

Os efeitos de compostos alelopáticos podem variar dependendo das espécies que os produzem e dos organismos afetados por eles. A concentração dos compostos alelopáticos produzidos por três espécies de eucaliptos (*E. camaldulensis*, *E. grandis* e *E. urophylla*) não interferiu na germinação de angico, tamboril e sorgo, mas afetou a germinação de alface. O efeito alelopático de *E. grandis* foi verificado para soja e também mostrou-se diretamente relacionado com a concentração do extrato (Luz,

2012). No presente trabalho, diferentes concentrações de folhas de *E. urograndis* não apresentaram efeitos negativos significativos sobre a eclosão dos ovos de resistência quando o tempo de exposição foi curto (um dia). Da mesma forma, os efeitos negativos sobre a eclosão dos ovos foram reduzidos com o aumento do tempo de decomposição foliar. Resultados semelhantes, em relação ao tempo de decomposição, foram observados para neonatas de *Daphnia* expostas a *E. grandis* e *E. urophila* (Zoratto, 2007).

Araújo et al. (2010) avaliando o efeito de óleos essenciais de *E. urograndis* em neonatas de *Daphnia* verificaram maior toxicidade em função do aumento do período de exposição. Os testes realizados com ovos de resistência de *D. ambigua* mostraram efeito negativo sobre a eclosão somente quando foram utilizadas folhas de eucalipto decompostas por três dias e os ovos foram expostos por cinco dias a este material, indicando que o efeito inibitório está relacionado ao tempo de decomposição das folhas e ao tempo de exposição dos ovos.

O maior tempo de decomposição das folhas provavelmente permite a degradação de compostos que agem inibindo a eclosão dos ovos. Os efeitos negativos do tempo de exposição dos ovos à água contendo esses compostos podem estar ligados ao desenvolvimento embrionário. Navis et al. (2015) demonstraram que usando pesticida, o efeito tóxico na eclosão de ovos de resistência estava intimamente relacionado ao tempo de desenvolvimento dos embriões. Para que possamos compreender melhor as interferências do eucalipto sobre a eclosão dos ovos de resistência, novos estudos precisam ser desenvolvidos para determinar que compostos foram responsáveis pela inibição da eclosão dos ovos, em que fase do processo de decomposição ele começa a ser liberado e em que fase do desenvolvimento do embrião agem mais efetivamente

Efeitos negativos relacionados aos metabólitos de eucalipto depositados no ambiente tem sido relatados para a estrutura e diversidade de plantas (Moral & Muller, 1996) e para comunidades aquáticas de invertebrados e fungos (Graça e Canhoto, 2006). A grande quantidade de serapilheira produzida por *Eucalyptus urograndis* representa um potencial impacto para ambientes aquáticos naturais, ao considerar não só os efeitos tóxicos já relatados para neonatas de *Daphnia* (Araujo et al.,2010), como também sobre os estágios dormentes, como demonstrado experimentalmente por este estudo.

Como não foi possível utilizar os ovos de resistência da lagoa Jacaré, que apresentam taxas de eclosão muito baixas, a dúvida sobre que fatores explicariam estas baixas taxas de eclosão permanecem. A continuidade dos estudos é necessária, para avaliar os efeitos dos subprodutos da decomposição das folhas separadamente, e a composição do sedimento onde estes ovos são acumulados.

### Referências Bibliográficas

Araujo, F. O. L., Duarte, L.P., Silva, G.D.F. Carazza, F., Filho, S. A. V. & A. C. Rietzler, 2010. Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de *Eucalyptus urograndis* (mirtaceae). *Quimica Nova*, 33: 1510–1513.

Brandão, L. P. M., Fajardo, T., Eskinazi-Sant'anna, E., Brito, S., & Maia-Barbosa, P. M. 2012. Fluctuations of the population of *Daphnia laevis* Birge 1878: a six-year study in a tropical lake. *Brazilian Journal of Biology*. 72: 479–487, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990818>.

Brandão, L. P. M., Pujoni, D.G.F. & Maia-Barbosa, P.M. Seasonal dynamics of *Daphnia laevis* Birge , 1878 ephippia in a tropical lake with a description of a new methodology for in situ evaluation. *Brazilian Journal of Biology*. 74: 642–648.

Carneiro I. L. R.;Karam D. & Garcia Q.G. Avaliação do potencial alelopático de três espécies de *Eucalyptus* na germinação de espécies cultivadas e nativas do cerrado. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/491185/1/Avaliacaopotencial2.pdf>

Crispim, M. C., & T. Watanabe, 2001. What can dry reservoir sediments in a semi-arid region in Brazil tell us about cladocera? *Hydrobiologia* 442: 101–105.

Duarte, L. P., R. C. Figueiredo, D. Barbosa, M. M. Nogueira, S. Augusto, & V. Filho, 2010. Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico de extratos de folhas de *Eucalyptus urograndis*. *Revista Científica do Departamento de Química e Exatas*. 1: 19–26.

Graça, M A.S. e C. Canhoto, 2006. Leaf litter processing in low order streams. *Limnética*, 25: 1-10

Guimarães, D. P.; Sans, L. M. A. 2007. Zoneamento do Potencial Produtivo do Eucalipto em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*. Piracicaba, 15: 192-197.

Henri, A. J., & V. Wepener, 2014. The effect of acid mine drainage on the hatching success of branchiopod egg banks from endorheic wetlands in South Africa. 35–48.

Jiang, X., G. Wang, S. Li, & J. He, 2007. Heavy metal exposure reduces hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment. Journal of environmental sciences (China) 19: 733–737, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17969648>.

Luz, R. S., Pedrinho, D.R., Barbosa, G.F. 2012. Efeito alelopático de *Eucalyptus urograndis* H13 na germinação e desenvolvimento inicial da soja. Conic-Semesp. Disponível em: <http://conic-semesp.org.br/anais/files/2014/trabalho-1000018008.pdf>

Roger, M & Muller, C. H. (1969) Fog drip: a mechanism of toxin transport from *Eucalyptus globulus*. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 96.: 467-475

Möst, M., A. C. Chiaia-Hernandez, M. P. Frey, J. Hollender, & P. Spaak, 2015. A mixture of environmental organic contaminants in lake sediments affects hatching from *Daphnia* resting eggs. Environmental toxicology and chemistry / SETAC 34: 338–345, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394187>.

Navis, S., A. Waterkeyn, A. Putman, L. De Meester, G. Vanermen, & L. Brendonck, 2015. Timing matters: Sensitivity of *Daphnia magna* dormant eggs to fenoxycarb exposure depends on embryonic developmental stage. Aquatic Toxicology Elsevier. 159: 176–183, <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X14003890>.

Onbe´ T. 1978. Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea-bottom sediment. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 44, 1411.

Paes, T. A.V. S, A.C. Rietzler, D. F. G. Pujoni & P.M. Maia-Barbosa. Aceito para publicação. High temperatures and absence of light affect the hatching of resting eggs of *Daphnia* in the tropics. Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Paes, T. A.V.S, A.C. Rietzler & P.M. Maia-Barbosa.2015. Techniques for the isolation of resting eggs contained within ephippium of *Daphnia*. Aquatic Science Meeting. <http://www.sgmeet.com/aslo/granada2015/viewabstract.asp?AbstractID=25887>

Rice, E. L. Allelopathy. 2. ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.

Santangelo J.M. 2009. Produção, eclosão e implicações ecológicas e evolutivas dos estágios dormentes do zooplâncton. LIMNOtemas 7: 1–36.

Souza, 2010. ISSN: 1980-9735 Bioatividade de óleos essenciais de espécies de eucalipto para o controle de *Spodoptera frugiperda* ( J . E . Smith , 1797) (Lepidoptera : Noctuidae ). Bioactivity of essential oils of eucalyptus specie. Revista Brasileira de Agroecologia 5: 157–164.

Souza, T. F. De, 2015. Avaliação de óleo essencial de *Eucalyptus urograndis* (Myrtaceae ) no controle de Pentatomidae. Revista Ciência Agrônômica. 46: 216–222.

Souza, V., & Cardoso, 2013. Efeito alelopático do extrato de folhas de *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de *Lactuca sativa* (alface) e *Phaseolus vulgaris* (feijão). Revista eletrônica de Educação e Ciência. 3: 1–6.

Yamagushi M.C.; Gusman G. S.& Vestena S. 2011. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill. e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. *Semina: Ciências Agrárias*, 32: 1361-1374.

Zagatto, P. A.; Bertoletti, E.; *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*, Ed. RiMa: São Carlos, 2006

Zoratto, A. N. A. C., 2007. Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* no vale do Rio Doce, Minas gerais. Dissertação de mestrado. 1-222.

## Conclusão geral e perspectivas futuras

A lagoa Jacaré é uma lagoa com características peculiares quanto à eclosão de ovos de resistência de *D.laevis*. As baixíssimas taxas de eclosão a torna um ecossistema aquático único que merece destaque e continuidade de estudos a respeito do mecanismo de diapausa estabelecido por *D.laevis* neste ambiente.

Neste trabalho foram obtidos alguns avanços e novas etapas de desenvolvimento de pesquisa podem então ser sugeridas.

Foi verificado que o método de desencapsulamento dos ovos de resistência contidos dentro dos efípios por hipoclorito de sódio foi eficiente e pode ser facilmente aplicado. Aconselha-se a utilização deste método em outros estudos que visam avaliar o efeito de outros fatores na eclosão de ovos de resistência.

Resultados obtidos no capítulo 2, evidenciou a particularidade dos ovos de resistência oriundos da Lagoa Jacaré. Em nenhuma das condições de fotoperíodo e temperatura houve eclosão significativa. Uma outra característica da população de *D.laevis* deste ambiente é a quase ausência de machos na coluna d'água (2 indivíduos observados em dez anos). Isso sugere que esses indivíduos de *D.laevis* são partenogenéticos obrigatórios, onde produzem ovos de resistência assexual, sem a necessidade de fertilização por machos. Assim, uma nova perspectiva para esta linha de pesquisa do LIMNEA consiste em fazer análises moleculares para se compreender as diferenças genéticas entre os indivíduos ativos na coluna d'água e os indivíduos dormentes no banco de ovos.

No capítulo 3, foi concluído que experimentos adicionais, com diferentes concentrações de organismos para o preparo de sinais químicos, e o uso de mais combinações de sinais de predadores e presas poderiam fornecer respostas diferentes às obtidas neste trabalho. Assim, sugere-se a utilização de outras espécies de peixes e também do camarãozinho “pitu” para avaliar os efeitos na produção e formação de efípios. e também o desenvolvimento desses experimentos para os demais clones estudados no capítulo 2, *D.laevis* (Pampulha) e *D.ambigua* (Nado).

Em relação ao último capítulo, recomenda-se o desenvolvimento de novos experimentos que investiguem a composição dos ovos de resistência e do sedimento, principalmente em relação aos compostos de eucalipto. Aconselha-se também avaliar o efeito da exposição de ovos de resistência com elevadas taxas de eclosão, como os da

Lagoa do Nado, ao sedimento da Lagoa Jacaré. E verificar os efeitos dos compostos isolados das folhas de eucaliptos na eclosão dos mesmos.

Além disso, sugere-se como um novo ramo da linha de pesquisa sobre ovos de resistência, a aplicação prática do uso dos mesmos para avaliar os efeitos de impactos ambientais do entorno de corpos d'água na eclosão da biodiversidade dormente. A avaliação dos efeitos de metais e pesticidas têm sido relatadas e o uso destes estágios dormentes pode ser uma nova fonte para uso em ensaios ecotoxicológicos.