



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

**Padrões de Crescimento em Otólitos
de Larvas de *Pomatoschistus pictus*
(Pisces, Gobiidae)**

Tânia Sofia Santiago Pedro

Mestrado em Biologia Marinha
Especialização em Ecologia e Conservação Marinha

2006

E. Gonçalves ©



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

**Padrões de Crescimento em Otólitos
de Larvas de *Pomatoschistus pictus*
(Pisces, Gobiidae)**

Mestrado em Biologia Marinha
Especialização em Ecologia e Conservação Marinha

Autoria da licenciada Tânia Sofia Santiago Pedro

Trabalho realizado no Instituto Superior de Psicologia Aplicada (ISPA) – UIE-E

Dissertação orientada por:

Prof^a. Dr^a. Maria Alexandra Chicharo (FCMA - UALg)

Prof. Dr. Emanuel Gonçalves (ISPA)

2006

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora:

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer, naturalmente, aos meus orientadores, Prof. Dr. Emanuel Gonçalves e Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Chícharo, pela oportunidade que me deram de pontuar estes anos dourados da minha formação académica da melhor forma. Obrigada ao Prof. Dr. Emanuel Gonçalves por todos os meios disponibilizados para que fosse possível concretizar este trabalho, e por todo o contributo de uma sólida experiência e conhecimentos nesta área. Obrigada à Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Chícharo pela disponibilidade e apoio que sempre me demonstrou, em mais do que apenas um aspecto, e pelo fundamental contributo na elaboração desta tese.

Os meus sinceros agradecimentos à Dr^ª. Rita Borges por ser este o primeiro trabalho que me propôs, por todo o apoio dado em tantas fases deste trabalho, para além do necessário, e, sobretudo, pela oportunidade de desenvolver um trabalho já tão bem preparado e organizado, graças ao esforço de toda a equipa de trabalho. Os meus agradecimentos a todos.

Ao Ricardo Beldade, com quem tanto aprendi, de mais do que uma forma, os meus profundos agradecimentos. Pela companhia em longas horas de laboratório, pelos cafezinhos nos entretantos, e pela oportunidade de adicionar ainda mais e melhor à experiência de trabalhar nesta área.

Por fim, e na ordem natural dos agradecimentos, à minha família, sabendo eu o quanto esta meta significa para vós, o meu muito obrigado por tudo aquilo que sabem que me dão todos os dias. À minha mãe, a senhora a quem dedico todo este trabalho, todos estes anos, todo este esforço, e por quem tudo fiz, tanto por mim quanto por ela. Sei o que isto significa e por isso ainda mais me orgulho.

Obrigada.

ÍNDICE GERAL

Resumo	1
Abstract.....	1
Introdução	
A espécie	3
Otólitos	4
Objectivo	5
Material e Métodos	
Amostragem	6
Processamento dos otólitos.....	7
Análise da microestrutura dos otólitos	9
Relações de crescimento.....	10
Validação	10
Retrocálculo.....	10
Resultados	
Estrutura de tamanhos	12
Morfologia e microestrutura do otólito	12
Idade e Crescimento	
Estimativas de idade.....	14
Relação entre tamanho do otólito e tamanho somático	15
Crescimento somático	15
Diferenças estatísticas entre otólitos esquerdo e direito	16
Retrocálculo	
<i>Biological Intercept</i>	16
<i>Body Proportional Hypothesis (BPH)</i>	17
Análise residual.....	17
Discussão	19
Considerações Finais	25
Referências Bibliográficas.....	26

RESUMO

Pomatoschistus pictus (Malm, 1865) é uma das espécies mais abundantes nos substratos arenosos costeiros do Parque Marinho da Arrábida, e um importante predador intermédio no meio bentónico. Assim, e dada a especial relevância do estudo das características larvares desta espécie, foram investigados os padrões de crescimento nos otólitos *sagittae* de 87 larvas de *P. pictus* capturadas em Julho de 2002, através do seccionamento frontal dos otólitos. As larvas analisadas apresentavam tamanhos entre os 4.55 mm e os 18.58 mm SL, com otólitos de diâmetro máximo entre os 85 µm e os 560 µm, e idades estimadas entre os 17 e os 69 dias. As relações de crescimento foram lineares para toda a amostra, verificando-se uma proporcionalidade constante entre o crescimento do otólito e o crescimento somático. A taxa de crescimento somático integrada foi de 0.25 mm dia⁻¹, valor significativamente superior ao registado para outros gobídeos, de águas temperadas ou tropicais. Os tamanhos à eclosão retrocalculados (1.76-2.77 mm TL) foram inferiores aos descritos na literatura. Os resultados obtidos apontam, assim, para um rápido crescimento nas primeiras fases críticas de desenvolvimento, o que poderá estar na base do sucesso desta espécie.

Palavras-chave: crescimento, otólitos, larvar, Gobiidae, *Pomatoschistus pictus*

ABSTRACT

Pomatoschistus pictus (Malm, 1865) is one of the most abundant species in the soft coastal bottoms of the Arrábida Marine Park, and is an important intermediate predator of the benthic habitat. Accordingly, and given the particular relevance of studying this species' larval characteristics, growth patterns were investigated using frontally sectioned *sagittae* otoliths from 87 *P. pictus* larvae captured in July 2002. Larvae ranged from 4.55 mm to 18.58 mm SL, otolith maximum diameter from 85 µm to 560 µm and estimated ages from 17 to 69 days. Growth relationships were linear for the entire sample, with constant proportionality between otolith and somatic growth. Integrated somatic growth rate was 0.25 mm day⁻¹, which is significantly higher than what is described for other gobiids, from temperate or tropical waters. Back-calculated

lengths at hatching (1.76-2.77 mm TL) were smaller than those described in the literature. These results therefore point to a rapid growth at the first critical development stages which may be the basis of this species' success.

Keywords: growth, otoliths, larval, Gobiidae, Pomatoschistus pictus

INTRODUÇÃO

A espécie

A família Gobiidae compreende o maior número de espécies conhecidas de peixes e é particularmente bem sucedida, quer em ambientes tropicais, ou em águas temperadas, sendo os góbios o *taxon* dominante na fauna bentónica dos pequenos peixes (Nelson, 1994). O género *Pomatoschistus* compreende onze espécies com uma distribuição Atlântico-Mediterrânica, maioritariamente restritas a águas costeiras pouco profundas (Miller, 1986).

O góbio *Pomatoschistus pictus* (Malm, 1865) é uma espécie epibentónica de pequeno tamanho (6 cm de comprimento total; Miller, 1986) que habita em fundos de areia fina a grossa, entre 1 e 55 m de profundidade. No Parque Marinho da Arrábida ocorre predominantemente em substrato arenoso (Henriques *et al.*, 1999). No Atlântico Este (Noruega a Portugal) é possível encontrar a subespécie *Pomatoschistus pictus pictus* (Miller, 1986) assim como nas Ilhas Canárias (Miller, 1990). No Mediterrâneo, concretamente no Mar Adriático e Mar de Marmara, encontra-se a subespécie *Pomatoschistus pictus adriaticus* Miller, 1972, tendo sido recentemente observada também no Golfo de Lions (Bouchereau *et al.*, 2003). Em adulto, este gobídeo alimenta-se essencialmente de crustáceos, nomeadamente copépodes e anfípodes (Miller, 1986).

A época de reprodução desta espécie estende-se de Fevereiro a Junho em Connemara (Irlanda), ou Março a Julho na Isle of Man (Reino Unido) (Miller, 1986). Em Portugal, a época de reprodução de *P. pictus* vai, pelo menos, de Março a Julho (dados não publicados). As fêmeas colocam os ovos no interior de conchas vazias de vieiras (*Pecten* sp.) ou *Glycimeris* (Miller, 1986), ou junto às folhas de *Zostera* (Russel, 1976). Os cuidados parentais são exercidos pelos machos (Magalhães, 1998), que guardam os ovos durante os cerca de 14 dias de incubação (Russel, 1976). Segundo Russel (1976) as larvas de *P. pictus* eclodem com um comprimento total de 2.7 a 3.0 cm, com mandíbulas desenvolvidas e um reduzido saco vitelino, tal como acontece com os restantes Gobiidae (Leis & Rennis, 2000), desenvolvendo-se no meio planctónico. A maturação sexual é atingida antes de um ano de idade, reproduzindo-se após o primeiro Inverno. O tempo máximo de vida é de cerca de dois anos, sendo poucos os indivíduos que sobrevivem a um segundo Inverno (Miller, 1961).

Otólitos

Os peixes teleósteos possuem, na região posterior do crânio, três canais semi-circulares que abrem numa série de câmaras expandidas interligadas, os sacos ópticos, que contêm, separadamente, os otólitos *sagitta*, *lapillus* e *asteriscus*. Estas estruturas funcionam, em conjunto com o tecido sensorial envolvente, como mecanorreceptores nas funções de audição e equilíbrio (Wright *et al.*, 2002).

A formação dos otólitos é iniciada ainda no embrião, constituindo um processo extracelular de deposição diferenciada de uma matriz proteica (opaca sob luz transmitida) e carbonato de cálcio (translúcida). A formação dos incrementos é resultado de um ciclo diário de diferentes taxas de acreção, sendo compostos por uma zona opaca, de acreção lenta (descontinuidades), alternada por uma zona translúcida, de acreção rápida (Victor, 1991). O ritmo circadiano endógeno que controla a acreção no otólito está intrinsecamente relacionado com factores externos como o fotoperíodo, ciclos subdiários de temperatura ou padrões de alimentação (Wright *et al.*, 2002).

Em muitos teleósteos, a formação do primeiro incremento encontra-se geralmente associada a um evento marcante na ontogenia da larva, como a eclosão, a absorção do saco vitelino, ou a primeira alimentação (Jones, 1986). Nesses casos, o incremento formado adquire geralmente uma maior densidade, relativamente aos restantes incrementos, sendo referido por “check”. Noutros casos, e sobretudo em larvas jovens de várias espécies com otólitos pequenos, podem ser observados alguns incrementos possivelmente formados antes da eclosão (Wright *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi utilizada uma das mais correntes aplicações da informação extraída dos otólitos, i.e. a estimação da idade, baseada na contagem directa dos incrementos diários, assim como a determinação da taxa de crescimento diário integrada. O número de incrementos do otólito pode ainda ser utilizado para a obtenção de chaves idade-comprimento e taxas de mortalidade larvares, aplicações particularmente úteis na previsão do recrutamento. A própria forma do otólito, em conjunto com as características morfológicas dos primórdios e do núcleo, pode ter uma aplicação sistemática. Em relação à microestrutura de crescimento do otólito, a espessura individual de cada incremento diário pode fornecer informações valiosas relacionadas com a ocorrência de transições ontogenéticas no período larvar, assim como permitir a determinação de taxas de crescimento diárias individuais. A análise de

transições ambientais é, também, possível através do estudo da composição química de cada incremento diário (Chícharo, 1991).

Objectivo

No Parque Marinho da Arrábida, o góbio *Pomatoschistus pictus* é uma das espécies mais abundantes nos substratos arenosos costeiros (Henriques *et al.*, 1999). Trata-se de uma espécie com um importante papel como predador intermédio, que efectua a ligação entre o zooplâncton e os grandes peixes predadores (Arruda *et al.*, 1993). Assim, o estudo das características larvares desta espécie em particular adquire especial relevância, considerando o seu papel na dinâmica subsequente do crescimento e sobrevivência dos juvenis (Searcy & Sponaugle, 2000).

O presente estudo pretende investigar os padrões de crescimento nos otólitos de larvas de *Pomatoschistus pictus*, através da determinação da taxa de crescimento integrada, comprimento à idade, comprimento à eclosão e análise da microestrutura e macroestrutura dos otólitos *sagittae* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

A amostragem foi realizada no Parque Marinho da Arrábida (PMA) (fig. 1) (Costa Oeste de Portugal – 38° 27'03''N, 09° 01'24''W) de 2 a 25 de Julho de 2002, em dois locais próximos da linha de costa, no sector do Parque com maior biodiversidade (Gonçalves *et al.*, 2002). Os locais amostrados apresentam habitats de substrato rochoso até cerca dos 13 m de profundidade e encontram-se virados a sul, protegidos da acção das ondas e dos ventos predominantes de norte e noroeste.

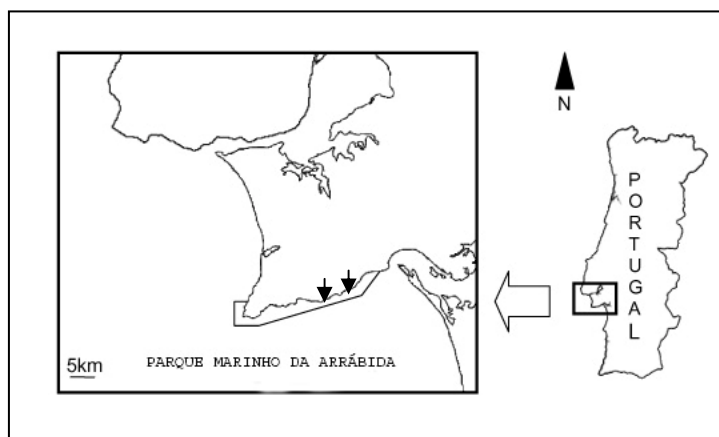


Fig. 1 – Localização da área de amostragem (estações de amostragem assinaladas pelas setas)

As amostras foram recolhidas a menos de 50 cm do substrato com uma rede de plâncton (diâmetro da boca: 30 cm; tamanho da malha: 350 μ m; razão diâmetro/comprimento: 1:3) acoplada a uma scooter subaquática, tendo sido utilizado um fluxómetro Hydrobios anexado à abertura da boca de rede para a medição do volume de água filtrada. A velocidade de arrasto foi de aproximadamente 1.3 nós (DP=0.21, n=10). Foi recolhido um total de 81 amostras, em arrastos de 5 minutos cada. Em cada arrasto, o mergulhador, após atingir o fundo, abria a rede, iniciando-se o arrasto numa direcção paralela à linha de costa, mantendo sensivelmente a mesma profundidade (a diferença média entre as profundidades de amostragem mínima e máxima foi de 2.22 m, DP=0.54, para cada amostra).

Para efeitos deste trabalho, foi analisada uma subamostra de 114 larvas recolhidas pelos métodos acima indicados, no âmbito de outros trabalhos do grupo de investigação. As amostras foram preservadas em formol salino tamponizado a 4% durante pelo menos um mês até à identificação das larvas, realizada de acordo com as características descritas por Petersen (1919) e Russel (1976) para as larvas de *Pomatoschistus pictus*.

Processamento dos Otólitos

A análise da microestrutura dos otólitos foi realizada em 114 larvas nas quais foram medidos, à lupa (Olympus SZ-PT), o comprimento padrão (SL, medido da extremidade anterior da cabeça à extremidade do uróstilo) e o comprimento total (TL, medido da extremidade anterior da cabeça à extremidade da barbatana caudal, quando presente) aproximados a 0.1 mm (fig. 2). Foram extraídos, para análise, os otólitos *sagittae* devido às suas elevadas dimensões relativamente aos *lapilli*, cujas marcas de crescimento se verificou que se encontravam abaixo do limite de resolução do microscópio. A extracção foi realizada preferencialmente no lado esquerdo do crânio da larva, tendo sido utilizados, no entanto, 14 *sagittae* do lado direito (16%) devido à danificação do *sagitta* esquerdo no processo de extracção/polimento. As diferenças entre o diâmetro e o número de anéis nos otólitos esquerdo e direito foram testadas (teste χ^2).

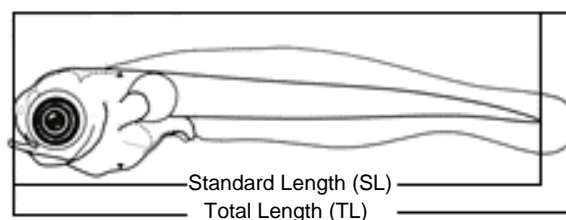


Fig. 2 – Esquema das medidas de comprimento larvar utilizadas: comprimento padrão (SL) e comprimento total (TL)

Os otólitos larvares, embora translúcidos e de tamanho reduzido, possuem incrementos de espessura reduzida inseridos numa matriz de material denso, o que torna necessária a preparação destas estruturas, de modo a expor todos os incrementos num único plano (Campana & Neilson, 1985). As técnicas de polimento podem ser aplicadas

em diferentes planos de secção (fig. 3), dependendo sobretudo do tamanho e morfologia do otólito. Segundo Panfili & Ximènes (1992), o processamento no eixo transversal deverá restringir-se aos otólitos maiores, e quando o crescimento é suficientemente rápido. O plano de secção seleccionado justifica-se pela dificuldade de obtenção de um plano que inclua simultaneamente a área do núcleo e o bordo, devido à forma côncavo-convexa dos *sagittae* desta espécie. O plano frontal revelou-se, assim, o mais adequado para estes otólitos de dimensões pequenas, contendo o plano ideal que atravessa o núcleo e atinge o bordo no raio de crescimento máximo, i.e., o eixo antero-posterior (Panfili & Ximènes, 1992).

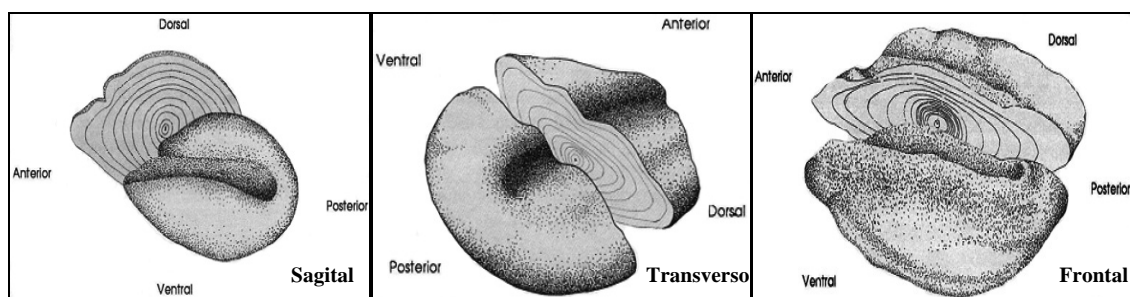


Fig. 3 - Esquema dos planos de secção num *sagitta* típico (adaptado de Secor *et al.*, 1992)

A montagem dos otólitos, para polimento, foi realizada em lâminas de vidro com cola termoplástica Crystal Bond (Aremco Products®, USA), posicionando-se o eixo antero-posterior do otólito (fig. 4) paralelamente ao eixo da lâmina. O processo de polimento foi efectuado segundo a técnica descrita por Secor *et al.* (1992), utilizando-se uma série de lixas de 12, 9, 3 e 0.3 μm embebidas em água (fig. 5). O polimento foi realizado, primeiramente, numa das faces do otólito (dorsal/ventral) (fig. 4), repetindo-se o processo na outra face, após o aquecimento da lâmina, até o núcleo se tornar visível ao microscópio, de modo a obter uma secção do *sagitta* no plano frontal (fig. 4). No processo de polimento foram danificados cerca de 24% dos otólitos, tendo sido utilizados, para a análise da microestrutura, um total de 87 *sagittae*.

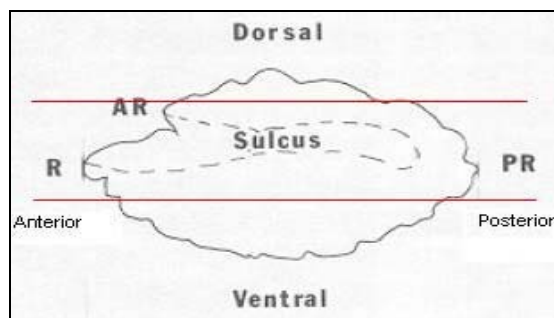


Fig. 4 – Esquema de um *sagitta* direito (R=rostro; AR=anti-rostro; PR=pós-rostro) e secção frontal (a vermelho) utilizada na análise da microestrutura (adaptado de Secor *et al.*, 1992)

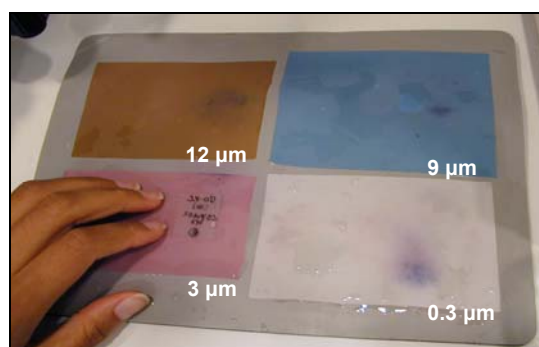


Fig. 5 – Ilustração do método de processamento com microlixas embebidas em água

Análise da Microestrutura dos Otólitos

Os otólitos foram examinados com luz transmitida num microscópio óptico Olympus BX50, com a objectiva de imersão e uma ampliação de 1000x. As contagens dos anéis foram, por norma, realizadas no eixo dorso-ventral do otólito para minimizar a influência de marcas não-diárias, potencialmente mais visíveis no eixo antero-posterior, dado que corresponde à zona de crescimento mais rápido (Morales-Nin & Panfili, 2002). A contagem dos primeiros anéis à volta do núcleo foi realizada excepcionalmente no eixo antero-posterior de forma a evitar a subestimação do número de anéis na fase inicial de crescimento. Foram enumeradas as discontinuidades (anéis opacos), incluindo o primeiro anel visível e a última discontinuidade visível seguida de uma faixa translúcida no bordo. As contagens foram realizadas por um leitor, sem conhecimento do tamanho da larva e dia de captura, do núcleo para o bordo, e do bordo para o núcleo, até que o número de discontinuidades coincidissem duas vezes.

As medições da espessura dos incrementos, assim como as medições da distância dos incrementos ao núcleo, foram efectuadas com o auxílio do software de imagem ImagePro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc.) no eixo antero-posterior, onde o

crescimento, e conseqüentemente a distância entre as marcas, são máximos (Panfili & Ximènes, 1992).

Relações de Crescimento

Foram investigadas, por meio de uma análise de regressão linear, as relações entre i) o diâmetro máximo do otólito e o comprimento padrão das larvas e ii) o comprimento padrão das larvas e a idade (crescimento somático).

A taxa de crescimento integrada foi determinada a partir da regressão entre o comprimento padrão das larvas e a idade (declive da recta).

Validação

Não foi possível realizar a validação da periodicidade de deposição dos incrementos, assumindo-se, neste trabalho, a natureza diária dos anéis nesta espécie, com base no que se encontra descrito para várias espécies de gobídeos tropicais com uma ontogenia similar (Sponaugle & Cowen, 1994; Shafer, 2000; Hernaman *et al.*, 2000). O pressuposto da natureza diária dos anéis é, ainda, baseado na validação realizada em juvenis de *Aphia minuta* capturados na zona noroeste do Mediterrâneo, igualmente uma espécie demersal de águas temperadas com ovos bentônicos (Iglesias *et al.*, 1997).

Retrocálculo

Os tamanhos das larvas à eclosão foram retrocalculados segundo os métodos proporcionais *Biological Intercept* (Campana, 1990) e *Body Proportional Hypothesis* (BPH) (Folkvord & Mosegaard, 2002).

Biological Intercept

Foi utilizada a seguinte fórmula, desenvolvida por Campana (1990), para o método do *Biological Intercept*:

$$L_i = L_c + (L_c - L_0) \times (D_i - D_c) / (D_c - D_0) \quad (\text{Eq. 1})$$

em que L_i = comprimento da larva à idade i (eclosão)

L_c = comprimento da larva à captura

D_i = diâmetro do otólito à idade i (eclosão)

D_c = diâmetro do otólito à captura

O *Biological Intercept* (L_0 , D_0) foi obtido através da média dos valores de comprimento somático e diâmetro do otólito de 15 larvas de *Pomatoschistus pictus* recém-eclodidas (idade máx. 1-2 dias; com saco vitelino reduzido, olhos pigmentados e boca funcional), amostradas em Julho de 2003 ($n=2$) e Julho de 2002 ($n=6$), e em sete larvas que eclodiram em aquários no laboratório em Maio de 2003.

A fórmula desenvolvida por Campana (1990) foi, também, utilizada na determinação do diâmetro do otólito à eclosão:

$$D_i = (L_0 D_c - L_i D_c + L_i D_0 - L_c D_0) / L_0 - L_c \quad (\text{Eq. 2})$$

Body Proportional Hypothesis (BPH)

Foi, também, utilizada a fórmula referida por Folkvord & Mosegaard (2002) para o método *Body Proportional Hypothesis*:

$$L_i = [(a + b D_i) / (a + b D_c)] \times (L_c) \quad (\text{Eq. 3})$$

em que L_i = comprimento da larva à idade i (eclosão)

L_c = comprimento da larva à captura

D_i = diâmetro do otólito à idade i (eclosão)

D_c = diâmetro do otólito à captura

Os parâmetros a e b correspondem aos coeficientes da regressão do comprimento somático sobre o diâmetro do otólito ($y=a+bx$).

De modo a validar o retrocálculo dos tamanhos à eclosão foram realizadas análises de correlação entre i) os resíduos do comprimento padrão sobre a idade e os resíduos do diâmetro do otólito sobre a idade (Thorrold & Hare, 2002) e ii) os resíduos da idade sobre o comprimento padrão e os resíduos do diâmetro do otólito sobre o comprimento padrão (Shafer, 2000).

RESULTADOS

Estrutura de tamanhos

As 87 larvas de *P. pictus* analisadas apresentavam tamanhos entre os 4.55 mm e os 18.58 mm SL (4.80 - 22.45 mm TL), pertencendo a maioria dos indivíduos (63%) às classes de comprimento [8-10[e [10-12[mm SL (fig. 6).

Adicionalmente às 114 larvas utilizadas inicialmente neste trabalho, foram identificadas nas amostras recolhidas 11 larvas pertencentes à classe [0 – 4[mm SL, não tendo sido possível, no entanto, processar os otólitos destas larvas devido às suas dimensões extremamente reduzidas (20 e 25 µm de diâmetro máximo).

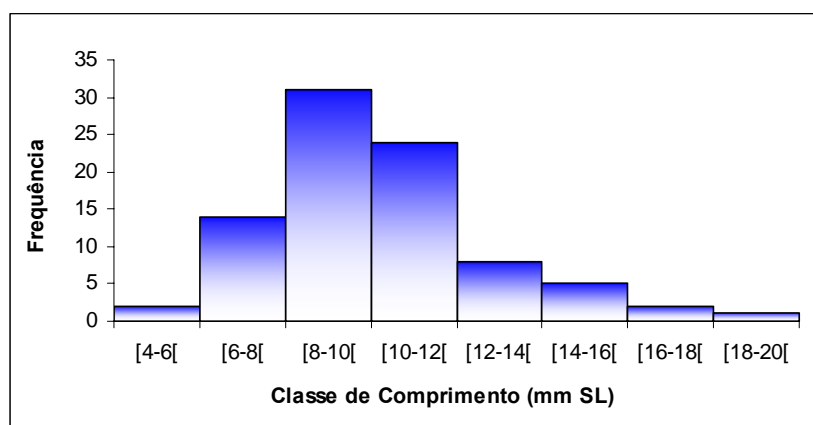


Fig. 6 – Distribuição das classes de tamanho de larvas de *Pomatoschistus pictus* analisadas neste trabalho (n=87)

Morfologia e Microestrutura do Otolito

Os 87 otólitos observados mediam entre 85 e 560 µm de diâmetro máximo, apresentando uma estrutura côncavo-convexa e uma morfologia externa relativamente uniforme para todas as classes de tamanho analisadas, com uma forma quase totalmente circular nos indivíduos mais pequenos ([4-6[mm SL; 85-123 µm de diâmetro máximo do otólito) e ligeiramente oval nos indivíduos maiores. A estrutura proeminente do rostro revelou-se evidente apenas nas larvas de maior tamanho ([18-20[mm SL; 530 µm diâmetro médio do otólito).

Todos os otólitos examinados ao microscópio óptico apresentavam incrementos compostos por zonas opacas alternadas por zonas translúcidas, com um padrão geralmente uniforme e compacto (fig. 7). Não foram observadas zonas de transição ou primórdios acessórios em nenhum dos otólitos observados, assim como marcas de crescimento não diárias, distintas pela descontinuidade dos anéis ao longo do otólito, e espessura e largura relativas (Morales-Nin & Panfili, 2002). A microestrutura interna evidenciou um núcleo alongado, em alguns casos formado por múltiplos primórdios fundidos, e geralmente com a constrição central típica dos gobídeos (Brothers, 1984). Os primeiros 9 a 21 anéis formados (média=15±3; DP=2.64) apresentavam um padrão excêntrico à volta do núcleo, presente em todos os otólitos observados (fig. 7).

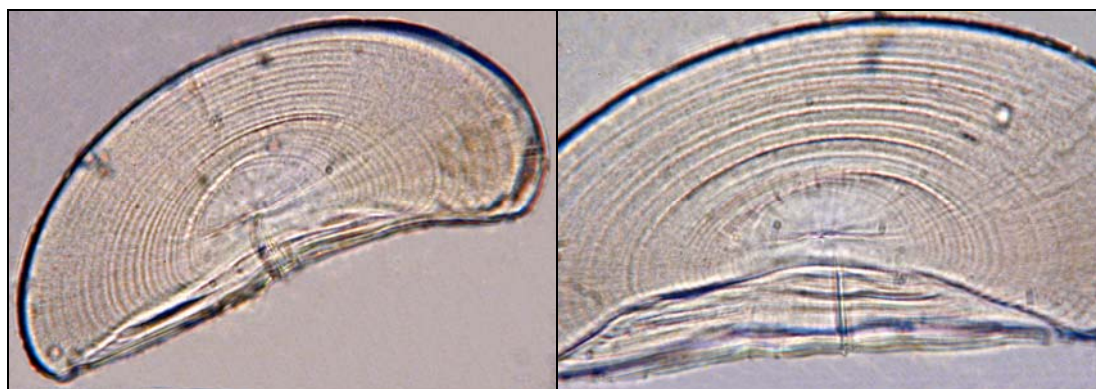


Fig. 7 – Secção frontal de dois *sagittae* de larvas de *P. Pictus* analisadas neste trabalho

A espessura dos incrementos exibiu uma tendência para aumentar com a idade, variando consideravelmente ao longo do eixo de crescimento. De um modo geral, os incrementos apresentavam uma espessura reduzida na zona próxima do núcleo, com valores entre 0.58 e 3 µm nos primeiros 10-15 anéis, aumentando até um máximo de 6.86 µm nas descontinuidades seguintes, até ao bordo (fig. 8). A espessura média dos incrementos de cinco otólitos analisados (6-14 mm SL; 163-345 µm diâmetro) variou entre 1.71 e 3.13 µm (média=2.41±0.34 µm; DP=1.24).

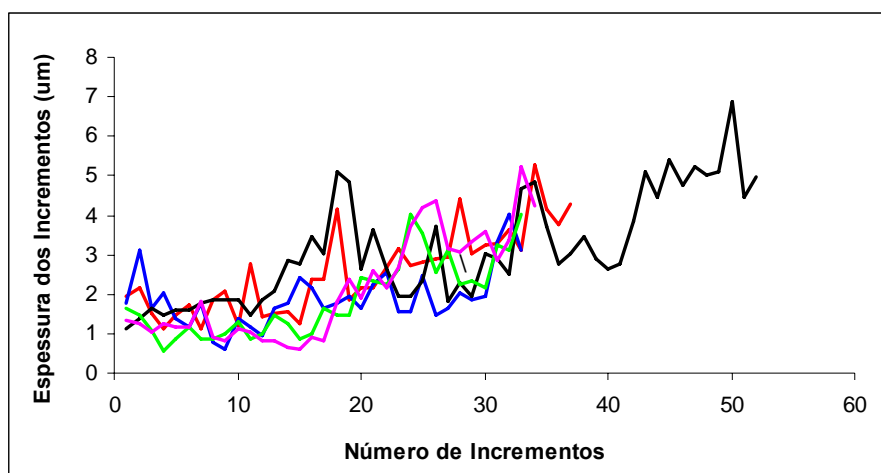


Fig. 8 – Espessura dos incrementos diários em cinco otólitos de larvas de *Pomatoschistus pictus*

Na interpretação da microestrutura dos otólitos de *P. pictus* foram encontradas três principais dificuldades: 1) a leitura de anéis na zona perinuclear revelou-se, em muitos otólitos e independentemente do tamanho, particularmente difícil devido à reduzida espessura e densidade dos incrementos na fase inicial de crescimento; 2) a menor densidade dos incrementos no eixo antero-posterior, relativamente ao eixo de contagens (dorso-ventral) dificultou as medições de espessura, possíveis em apenas alguns otólitos e, por último, 3) a visualização do último incremento provou ser particularmente difícil, na maioria dos otólitos, devido ao fenómeno de dupla refração (*birefringency*) do bordo, bastante evidente no plano de polimento utilizado.

Idade e Crescimento

Estimativas de idade

As larvas de *P. pictus* analisadas apresentavam idades entre os 17 e os 69 dias. O intervalo de tempo entre a eclosão e a formação do primeiro incremento foi ignorado nas estimativas de idade de *P. pictus*, assumindo-se que este é relativamente reduzido, tal como foi determinado para os gobídeos *Aphia minuta* (La Mesa, 1999) e *Crystallogobius linearis* (La Mesa, 2001).

O primeiro anel considerado nas contagens localizava-se a uma distância mínima de 12 µm do núcleo em 54% dos otólitos analisados (média=13±0.41 µm; DP=1.4; moda=12 µm). Nos restantes *sagittae*, a maioria (34.5%) apresentava um ou dois anéis adicionais, localizados a uma distância mínima de 8 µm do núcleo (moda=10

μm), sendo que apenas 11.5% dos otólitos exibiu anéis a partir dos 6 μm de distância ao núcleo.

Relação entre o tamanho do otólito e o tamanho somático

A relação entre o tamanho do otólito e o tamanho somático revelou-se melhor determinada através da regressão entre o diâmetro do otólito e o comprimento padrão da larva (função exponencial: $y=\exp^{(68.43+0.13x)}$; $r^2=0.85$; $n=87$, função de potência: $y=11.92x^{1.33}$; $r^2=0.87$; $n=87$). Ambas as variáveis exibem uma forte correlação linear (fig. 9) o que indica uma proporcionalidade constante entre o crescimento do otólito e o crescimento somático.

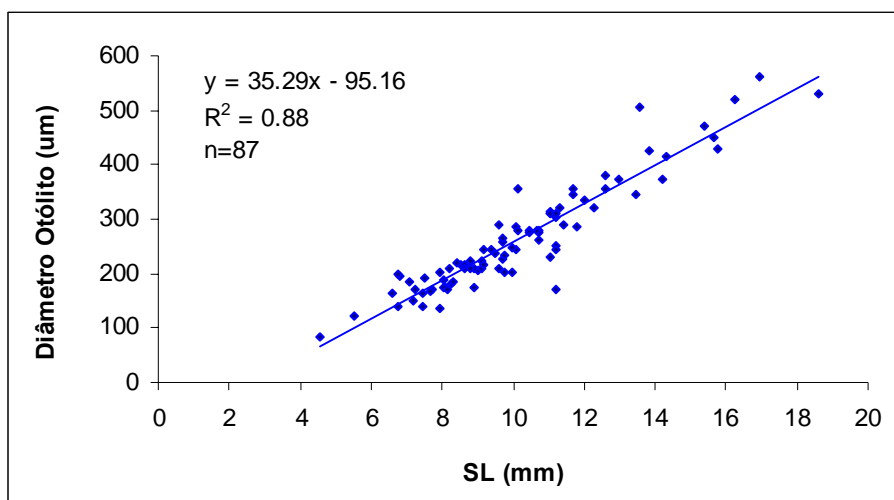


Fig. 9 – Relação entre o tamanho do otólito e o tamanho somático (SL) em larvas de *Pomatoschistus pictus*

Crescimento Somático

Uma análise de regressão linear revelou-se a mais adequada na descrição do crescimento somático integrado das larvas de *P. pictus* (função exponencial: $y=\exp^{(3.84+0.02x)}$; $r^2=0.79$; $n=87$, função de potência: $y=0.37x^{0.90}$; $r^2=0.77$; $n=87$). O comprimento padrão exibiu uma forte correlação positiva com a idade, registrando-se uma taxa de crescimento somático de 0.25 mm dia^{-1} (fig. 10).

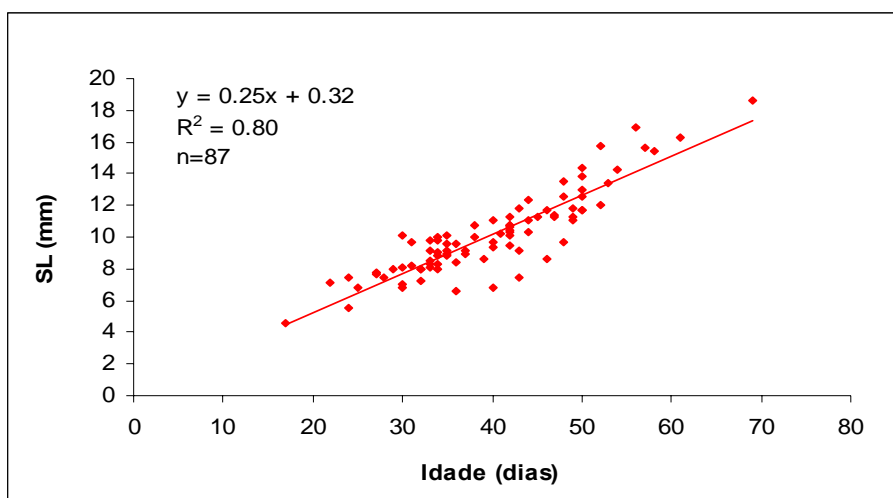


Fig. 10 – Crescimento somático em larvas de *Pomatoschistus pictus*

Diferenças estatísticas entre otólitos esquerdo e direito

Não se verificaram diferenças significativas entre o diâmetro dos otólitos esquerdo e direito ($\chi^2 = 12.53$; g.l.=10; $p>0.05$), ou entre o número de anéis dos *sagittae* esquerdo e direito ($\chi^2 = 4.95$; g.l.=11; $p>0.05$).

Retrocálculo

Os tamanhos à eclosão das 87 larvas analisadas foram retrocalculados através dos métodos proporcionais *Biological Intercept* (Campana, 1990) e *Body Proportional Hypothesis* (BPH).

Biological Intercept

O *Biological Intercept* utilizado ($L_0=2.10$, $D_0=23$) corresponde à média do comprimento padrão (2.10 ± 0.09 mm; DP=0.19) e diâmetro do otólito (23 ± 1.23 μm ; DP=2.44) das 15 larvas recém-eclodidas de *P. pictus* analisadas (1.85–2.44 mm SL; 20–25 μm diâmetro do otólito). A média dos TL determinados para estas larvas correspondeu a 2.25 ± 0.13 mm (DP=0.26). Os tamanhos à eclosão retrocalculados situaram-se no intervalo de 1.68 a 2.57 mm SL (1.76–2.77 mm TL), com uma média de 2.10 ± 0.04 mm SL (DP=0.18) e 2.25 ± 0.04 mm TL (DP=0.20). O diâmetro do otólito à eclosão retrocalculado apresentou valores entre os 12 e 34 μm (moda=24 μm) com uma média de 23 ± 1.1 μm (DP=5).

Body Proportional Hypothesis (BPH)

A partir da relação entre o tamanho somático e o tamanho do otólito ($SL=0.03$ [diâmetro do otólito] + 3.57) foram retrocalculados os tamanhos à eclosão das larvas de *P. pictus*, tendo sido obtidos valores entre os 3.25 e 5.84 mm SL (3.08-5.99 mm TL), com uma média de 4.15 ± 0.09 mm SL (DP=0.42) e 4.00 ± 0.09 mm TL (DP=0.43).

Análise Residual

De forma a confirmar a relação de proporcionalidade entre o crescimento somático e o crescimento do otólito, para a determinação da validade dos tamanhos retrocalculados, foram realizadas análises dos resíduos das variáveis SL, diâmetro do otólito e idade. Os resíduos do comprimento padrão sobre a idade e os resíduos do diâmetro do otólito sobre a idade apresentaram uma correlação positiva (fig. 11), confirmando a natureza positiva da relação entre o crescimento do otólito e o crescimento somático (Thorrold & Hare, 2002).

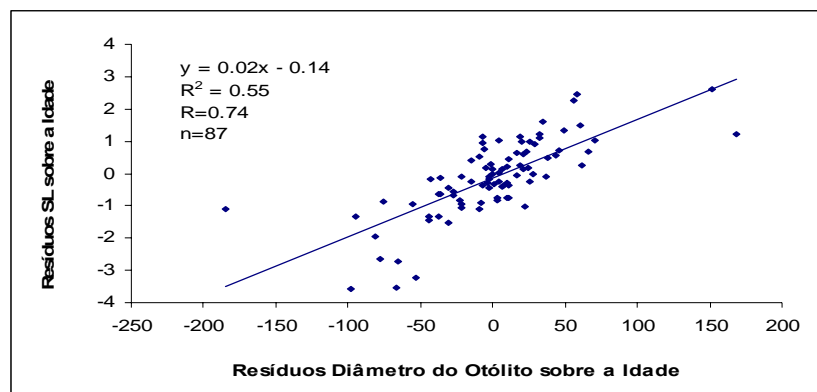


Fig. 11 – Correlação entre os resíduos dos tamanhos somático (SL) e do otólito sobre a idade

Os resíduos da idade sobre o comprimento padrão e os resíduos do diâmetro do otólito sobre o comprimento padrão apresentaram uma fraca correlação (fig. 12), o que indica a ausência de um efeito de crescimento sobre a relação de proporcionalidade entre o crescimento do otólito e o crescimento somático, i.e., a ausência de crescimento do otólito independentemente do crescimento somático (Shafer, 2000).

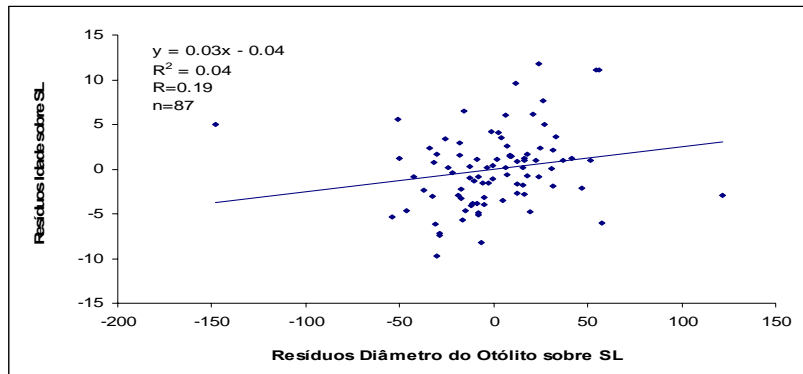


Fig. 12 – Correlação entre os resíduos da idade e tamanho do otólito sobre o comprimento padrão (SL)

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a análise do padrão de incrementos diários de crescimento em otólitos larvares de *Pomatoschistus pictus* permitiu a extracção de informações com diferentes aplicações no estudo do crescimento larvar da espécie, nomeadamente a taxa de crescimento integrada e a idade ao comprimento.

No Parque Marinho da Arrábida (PMA), segundo Beldade *et al.* (2006), as classes de tamanho mais abundantes de larvas de *P. pictus* situam-se entre os 6 e os 12 mm TL, o que coincide com a elevada abundância (63%) registada na amostra, para os tamanhos de 8 a 12 mm SL. A reduzida representatividade das larvas de maior ([16-20[mm SL) e menor tamanho ([0-6[mm SL) na amostra poderá ser explicada por factores associados à metodologia, como a danificação de otólitos no processo de extracção/processamento aliada à má conservação de algumas das amostras recolhidas. Apesar da tamponização da solução de formol é comum a acidificação das amostras preservadas durante um longo período de tempo, e a consequente dissolução ou perda de transparência dos otólitos larvares, com especial incidência nos de menores dimensões (Butler, 1992). Um factor também frequentemente responsável pelo desvio nas distribuições de tamanho de estados larvares é a capacidade de os indivíduos de maior tamanho activamente evitarem a rede, enquanto as larvas menores sofrem a extrusão da rede. De acordo com Somerton & Kobayashi (1989) este factor poderá corrigido pela determinação do rácio entre uma rede padrão e uma rede teste que elimine a possibilidade de as larvas maiores a evitarem, ou que apresente extrusão nula. Este último factor foi tido em conta na escolha do tamanho da malha de rede utilizado neste trabalho sendo que a malhagem de 350 μm se aproxima, ou é mesmo consideravelmente inferior, à malhagem utilizada em vários estudos larvares que registam capturas com distribuições de tamanho semelhantes. Ida (1972) reporta capturas, utilizando redes de plâncton com malha de 500 μm , caracterizadas por uma maior representatividade dos tamanhos de 5.5 a 7 mm TL e 3 a 4.5 mm TL para larvas de *Thunnus thynnus* (Scombridae) e *Trachurus japonicus* (Carangidae), respectivamente, enquanto que a distribuição de tamanhos encontrada para a anchova *Engraulis japonica* (Engraulidae) abrange um maior número de classes de comprimento, registando tamanhos desde os 5 aos 15 mm TL. Brogan (1994), por outro

lado, registou capturas de gobiesoscídeos e gobídeos com uma maior representatividade da classe [3-4] mm SL utilizando uma rede de plâncton com malha de 500 µm. A reduzida representatividade das larvas de maior tamanho está, ainda, de acordo com as observações de Beldade *et al.* (2006) no PMA, uma vez que este autores não observaram larvas de tamanho superior a 14 mm TL no meio de amostragem analisado, associando o facto à possibilidade do início da fase de assentamento. Contudo, neste trabalho não foram observadas quaisquer zonas de transição nos otólitos analisados, incluindo os 8 *sagittae* de larvas com 16 a 20 mm SL.

A influência do factor de encolhimento das larvas nos tamanhos determinados terá sido minimizada pela padronização da metodologia de amostragem adoptada e limitação do tempo de arrasto, assim como pela rápida preservação das amostras, após a recolha. Não obstante, a determinação da relação alométrica entre o tamanho dos otólitos e o comprimento de larvas vivas pode ser uma ferramenta útil para calibrar o encolhimento das larvas de peixes (Butler, 1992).

A estrutura e morfologia observadas nos *sagittae* de *P. pictus* são idênticas às observadas por La Mesa em otólitos de *Aphia minuta* (La Mesa, 1999) e *Crystallogobius linearis* (La Mesa, 2001), dois gobídeos maioritariamente epipelágicos do Mediterrâneo. Nas três espécies, a forma circular dos otólitos, nas larvas mais jovens, torna-se ligeiramente oval nos indivíduos maiores, à medida que aumenta o tamanho relativo do rostro.

Apesar de apresentarem reduzidas dimensões, os *sagittae* de *P. pictus* revelaram-se demasiado opacos para permitir a observação dos incrementos sem uma preparação prévia. O plano frontal de seccionamento foi considerado o mais adequado, devido às dimensões dos otólitos, e dada a impossibilidade de observar, em simultâneo, os incrementos na zona do núcleo e perto do bordo, com o plano sagital. Apesar de se tratar de um processo relativamente demorado (cerca de 30 minutos para a preparação de uma secção), o seccionamento frontal dos *sagittae* de *P. pictus* parece ser a melhor forma de observar a microestrutura dos otólitos em larvas desta espécie.

Uma das principais dificuldades encontradas na interpretação da microestrutura dos otólitos residiu na menor densidade dos incrementos no eixo antero-posterior, relativamente ao eixo dorso-ventral que, em última análise, impossibilitou as medições

de espessura para determinação de taxas de crescimento individuais. Segundo Morales-Nin & Panfili (2002), as diferenças de densidade são comuns nestas estruturas dado que a taxa de crescimento do otólito depende do eixo de orientação, o que leva a diferenças de densidade dos incrementos, de acordo com a área do otólito em que são depositados. De acordo com Ré & Gonçalves (1993), a transição de densidade entre os incrementos poderá, também, relacionar-se com os ritmos de enchimento da bexiga gasosa ou de alimentação, assim como com migrações verticais.

A microestrutura dos *sagittae* de *P. pictus* revelou incrementos estreitos ($<1 \mu\text{m}$ espessura) concentrados na zona perinuclear, típicos de peixes temperados com uma fase larvar pelágica (Campana, 1992). Nas medições de espessura individual dos incrementos, foram observados valores próximos do limite teórico de resolução do microscópio ($1 \mu\text{m}$) em três dos cinco otólitos utilizados. As espessuras médias calculadas apresentaram valores acima de $1 \mu\text{m}$, o que sugere que as idades determinadas não terão sido subestimadas devido à presença de incrementos não visíveis ao microscópio.

O momento de formação do primeiro anel não é conhecido para esta espécie. Segundo Jones (1986), a formação do primeiro incremento encontra-se geralmente associada a um evento marcante na ontogenia da larva, como a eclosão, a absorção do saco vitelino, ou a primeira alimentação, pelo que este incremento é, normalmente, proeminente em relação aos restantes. Nos otólitos de *P. pictus* observados, não foi, contudo, detectada uma diferença de espessura ou densidade no primeiro anel depositado e considerado nas contagens. No entanto, os valores do raio dos otólitos das larvas recém-eclodidas observadas ($10\text{-}13 \mu\text{m}$) coincidem com a distância ao núcleo do primeiro anel considerado nas contagens em 34.5% ($10 \mu\text{m}$) e 54% ($13 \mu\text{m}$) dos indivíduos. Ainda, a média dos diâmetros retrocalculados do otólito à eclosão coincide com a média do raio dos otólitos das larvas recém-eclodidas ($12 \mu\text{m}$), o que reforça a estimativa correcta da idade nas larvas de *P. pictus*, assumindo-se que o primeiro anel observado corresponde ao primeiro anel depositado pós-eclosão. Estes resultados, aliados ao facto de as larvas recém-eclodidas observadas apresentarem já um saco vitelino reduzido, olhos pigmentados e boca funcional, sugerem que a deposição do primeiro incremento ocorre praticamente após a eclosão, coincidindo simultaneamente com a primeira alimentação e a absorção do saco vitelino. Assim, considerou-se

desprezável o período de tempo entre a eclosão e a formação do primeiro anel, à semelhança do descrito por La Mesa para os gobídeos *Aphia minuta* (La Mesa, 1999) e *Crystallogobius linearis* (La Mesa, 2001).

O modelo de regressão linear revelou-se o mais adequado aos dados de crescimento obtidos, como é comum em modelos de crescimento da fase de desenvolvimento larvar (Campana & Jones, 1992). O diâmetro dos otólitos acompanhou o comprimento padrão das larvas de forma linear, o que indica que o *sagitta* é representativo do crescimento de *P. pictus*, podendo ser utilizado nas estimativas de crescimento da espécie. A taxa de crescimento integrado obtida a partir da relação do comprimento à idade foi de 0.25 mm dia^{-1} , um valor significativamente superior ao registado para outros gobídeos, quer para espécies de águas temperadas ou espécies tropicais. Existe pouca informação, até à data, sobre idade e crescimento na fase larvar de gobídeos, particularmente em espécies de águas temperadas. Fonds (1973) refere taxas de crescimento mensais de 3.4 a 5 mm mês^{-1} , em larvas de *Pomatoschistus minutus* mantidas em laboratório a temperaturas constantes de 15-16°C. Apesar de este congénérico partilhar as mesmas características ontogenéticas, apresentando uma distribuição mais alargada, com ocorrência no Mar Negro, o valor mínimo da sua taxa de crescimento mensal corresponde a cerca de metade do registado para *P. pictus*, com 7.5 mm mês^{-1} , sob condições de temperatura semelhantes (16-17°C no local e mês de amostragem). La Mesa registou, para juvenis dos gobídeos temperados *Aphia minuta* (La Mesa, 1999) e *Crystallogobius linearis* (La Mesa, 2001), taxas de crescimento diárias de 0.03 e 0.17 mm dia^{-1} , respectivamente. Os peixes analisados por este autor, com 14 a 55 mm TL, foram amostrados no Mar Adriático central, entre os meses de Março e Setembro, apresentando idades entre os dois a nove meses. No presente estudo, as larvas de *P. pictus* apresentavam idades entre os 17 e os 69 dias, atingindo a primeira classe de comprimento analisada por La Mesa. As larvas do gobídeo subtropical *Gobiosoma bosci* apresentam, segundo Breitburg (1989), um comportamento demersal, agrupando-se a cerca de 0.5 m do substrato antes do assentamento. A idade de larvas amostradas na costa Este dos EUA (Chesapeake Bay) em águas com temperaturas de 24.2-29.8°C (Junho), situou-se entre os 20 e 41 dias, para larvas de 7 a 11 mm TL (n=17), o que corresponde, sensivelmente, ao intervalo de idade-comprimento observado para *P. pictus*, de cerca de 25 a 50 dias para larvas de 6 a 10 mm SL. Os góbios tropicais *Stenogobius genivittatus* e *Awaous stamineus* exibem fases

planctónicas larvares particularmente longas (119-151 dias e 150-169 dias, respectivamente), que precedem a migração para água doce (Radtke *et al.*, 1988). Segundo os dados de idade ao comprimento na fase planctónica, publicados por Radtke *et al.* (1988) para juvenis recém-recrutados (12-15 mm TL) no Hawaii, estas espécies apresentam taxas de crescimento extremamente reduzidas (0.019 e 0.038 mm dia⁻¹). Estes valores poderão estar relacionados com a elevada duração da fase larvar sendo, no entanto, de notar o reduzido tamanho da amostra analisada para ambas as espécies (n=15 para *Stenogobius genivittatus* e n=8, para *Awaous stamineus*). Ainda, juvenis recém-recrutados (7-16 mm SL) dos gobídeos tropicais *Coryphopterus glaucofraenum* e *Gnatholepsis thompsoni*, amostrados no Mar das Caraíbas por Sponaugle & Cowen (1994) apresentam taxas de crescimento entre os 0.21 e 0.38 mm dia⁻¹.

O góbio *Pomatoschistus pictus* apresenta, também, uma taxa de crescimento larvar comparável a outras espécies de diferentes habitats. Segundo Ré (1983), larvas da sardinha *Sardina pilchardus* (Clupeidae) analisadas na costa central de Portugal, apresentam taxas de crescimento de 0.41 e 0.57 mm dia⁻¹ (26 mm TL máximo). A sardinha é uma espécie pelágica, com larvas pelágicas, também presente no Parque Marinho da Arrábida (Beldade *et al.*, 2006). A pescada *Merluccius merluccius* (Merlucciidae) é, por outro lado, uma espécie com uma história de vida semelhante a *P. pictus*, com larvas pelágicas e adultos demersais, apresentando, segundo Alvarez & Cotano (2005) uma taxa de crescimento de 0.14 mm dia⁻¹ para larvas de 2 a 6 mm SL, de idade inferior a 20 dias, amostradas na Baía de Biscay (Norte de França). Larvas desta mesma espécie, com idade máxima de 25 dias e 2 a 8 mm SL, amostradas por Palomera *et al.* (2005) no Mediterrâneo noroeste, exibiram uma taxa de crescimento máxima de 0.28 mm dia⁻¹. McBride *et al.* (2002) registaram, para larvas das espécies *Prionotus carolinus* e *P. evolans* (Triglidae) amostradas na costa Este dos E.U.A. (New Jersey), um crescimento de 0.3 mm dia⁻¹ no período larvar e início da fase juvenil, com indivíduos de 3 a 9 mm SL de idade máxima de 25 dias.

Frequentemente, a relação entre o tamanho do otólito e o tamanho somático não é uniforme para todos os indivíduos de uma dada população. Neste trabalho, detectou-se alguma variabilidade nos valores do diâmetro do otólito para larvas de um mesmo tamanho, o que levou à opção por modelos proporcionais, em oposição aos modelos de regressão simples, na determinação dos tamanhos retrocalculados. A análise dos resíduos da idade e diâmetro do otólito sobre o SL confirmou, contudo, a ausência de

um efeito de crescimento significativo sobre a relação de proporcionalidade entre os otólitos e as larvas de *P. pictus*, estabelecendo a validade dos tamanhos retrocalculados. A utilização do *Biological Intercept* (Campana, 1990) neste trabalho foi baseada no facto de os otólitos se formarem ainda no embrião, para todos os indivíduos. Isto significa, em termos práticos, que pode ser assumido um único ponto de origem para todas as estimativas de retrocálculo baseadas na relação entre o otólito e a larva, que corresponderá aos valores observados para estas variáveis no início da relação de proporcionalidade (Folkvord & Mosegaard, 2002).

Os tamanhos das larvas à eclosão retrocalculados segundo o método *Biological Intercept* abrangem totalmente o intervalo de tamanhos das larvas recém-eclodidas analisadas. Segundo Russel (1976), as larvas de *P. pictus* eclodem com um comprimento total de 2.7 a 3.0 mm, o qual é bastante superior ao observado, quer nas larvas recém-eclodidas (1.95-2.80 mm TL), quer em relação aos valores retrocalculados para a amostra total (1.76-2.77 mm TL). Estes dados são consistentes com os tamanhos das larvas à eclosão observados por Leis & Rennis (2000), para as larvas de gobídeos em geral, entre 1.4 e 1.6 mm TL. Os tamanhos retrocalculados das larvas à eclosão estão, ainda, de acordo com os tamanhos à eclosão registados por Bouchereau *et al.* (2003) para larvas da subespécie *Pomatoschistus pictus adriaticus* eclodidas em laboratório (1.70 a 2.67 mm TL).

O método *Body Proportional Hypothesis* (BPH) assume que se um peixe é 10% mais pequeno em relação ao comprimento médio da amostra, para um determinado diâmetro do otólito, esse peixe será sempre 10% mais pequeno que a média, ao longo de toda a sua vida (Francis, 1990). Assim, contrariamente ao método *Biological Intercept*, nesta fórmula de retrocálculo são utilizados os parâmetros da regressão do tamanho somático sobre o tamanho do otólito. Os valores retrocalculados por este método (3.08-5.99 mm TL) são consideravelmente superiores aos referidos por Russel (1976) e Bouchereau *et al.* (2003), e em relação aos tamanhos observados (larvas recém-eclodidas) e retrocalculados pelo método *Biological Intercept*. O facto de esta fórmula utilizar unicamente os parâmetros da regressão do tamanho somático sobre o tamanho do otólito, não considerando, assim, a variabilidade individual normalmente existente, poderá estar na origem da sobre-estimação dos tamanhos à eclosão retrocalculados. Estes resultados sugerem que, efectivamente, o método *Biological Intercept* é o mais adequado no retrocálculo em larvas jovens de *P. pictus*, uma vez que considera um ponto de origem biologicamente realista, para todas as estimativas de retrocálculo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gobídeo *Pomatoschistus pictus* parece exibir um crescimento consideravelmente mais rápido que outras espécies de gobídeos com características ontogenéticas semelhantes, aparentando ainda eclodir com um tamanho significativamente inferior ao registado anteriormente (Russel, 1976). Estes factos apontam para um rápido crescimento que ocorre nas primeiras fases críticas de desenvolvimento. A elevada abundância de *P. pictus* no local investigado está de acordo com os resultados obtidos, o que indica que as características larvares observadas deverão contribuir para o sucesso da espécie, influenciando positivamente o recrutamento no meio bentónico.

No futuro, será de extrema utilidade realizar um estudo de validação da periodicidade de deposição dos incrementos nos otólitos de *P. pictus*, não possível neste caso devido à não coincidência do início do trabalho com a fase inicial da época de reprodução desta espécie. A análise dos padrões de crescimento de *Pomatoschistus pictus* poderá ainda, em estudos futuros, abranger tamanhos superiores aos analisados, de forma a obter informação clara sobre o momento de assentamento desta espécie e características de crescimento dos juvenis recém-assentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arruda, L.M., Azevedo, J.N. & Neto, A.I. (1993). Abundance, age structure and growth, and reproduction of gobies (Pisces: Gobiidae) in the Ria de Aveiro Lagoon (Portugal). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 37: 509-523
2. Alvarez, P. & Cotano, U. (2005). Growth, mortality and hatch-date distributions of European hake larvae, *Merluccius merluccius* (L.), in the Bay of Biscay. *Fisheries Research* 76: 379-391
3. Beldade, R., Borges, R. & Gonçalves, E.J. (2006). Depth distribution of very nearshore temperate fish larval assemblages at close proximity to the rocky substrate. *Journal of Plankton Research* 28: 1003-1013
4. Bouchereau, J-L., Houdier, V., Marques, A. & Rebelo, J.E. (2003). A new distribution record and the reproductive strategy of *Pomatoschistus pictus adriaticus* (Pisces: Gobiidae) in the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 1157-1161
5. Breitburg, D.L. (1989). Demersal schooling prior to settlement by larvae of the naked goby. *Environmental Biology of Fishes* 26 (2): 97-103
6. Brogan, M. W. (1994). Two methods of sampling fish larvae over reefs: a comparison from the Gulf of California. *Marine Biology* 118: 33-44
7. Brothers, E.B. (1984). Otolith studies. *Special Publication of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 1: 50-57
8. Butler, J.L. (1992). Collection and preservation of material for otolith analysis. *In* Stevenson, D.K. & Campana, S.E. (eds.). *Otolith microstructure examination and analysis*. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 117. pp. 13-17

9. Campana, S.E. (1990). How reliable are growth back-calculations based on otoliths? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47: 2219-2227
10. Campana, S.E. (1992). Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. *In* Stevenson, D.K. & Campana, S.E. (eds.). Otolith microstructure examination and analysis. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117. pp. 59-71
11. Campana, S.E. & Jones, C.M. (1992). Analysis of otolith microstructure data. *In* Stevenson, D.K. & Campana, S.E. (eds.). Otolith microstructure examination and analysis. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117. pp. 73-100
12. Campana, S.E. & Neilson, J.D. (1985). Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 1014-1032
13. Chicharo, M. A. (1991). Microestrutura de otólitos em larvas de peixe. Universidade do Algarve, Faro. 85 pp.
14. Folkvord, A. & Mosegaard, H. (2002). Growth and growth analysis. *In* Panfili, J., Pontual, H. (de)., Troadec, H. & Wright, P.J. (eds.). Manual of fish sclerochronology. Ifremer-IRD coedition. Brest, France. pp. 146-166
15. Fonds, M. (1973). Sand gobies of the Dutch Wadden Sea (*Pomatoschistus*, Gobiidae, Pisces). *Netherlands Journal of Sea Research* 6: 471-478
16. Francis, R.I.C.C. (1990). Back-calculation of fish length: a critical review. *Journal of Fish Biology* 36: 883-902
17. Gonçalves, E.J., Henriques, M. & Almada, V.C. (2002). Use of a temperate reef-fish community to identify priorities in the establishment of a Marine Protected Area. *In* Beumer, J.P., Grant, A. & Smith, D.C. (eds.). Aquatic Protected Areas: What Works

- Best and How Do We Know? Proceedings of the World Congress on Aquatic Protected Areas, Cairns, Australia. pp. 261-272
18. Henriques, M., Gonçalves, E.J. & Almada, V.C. (1999). The conservation of littoral fish communities: a case study at Arrábida coast (Portugal). *In* Almada, V.C., Oliveira, R.F. & Gonçalves, E.J. (eds.). Behaviour and Conservation of Littoral Fishes. ISPA, Lisboa. pp. 473-519
 19. Hernaman, V., Munday, P.L. & Schläppy, M.L. (2000). Validation of otolith growth-increment periodicity in tropical gobies. *Marine Biology* 137: 715-726
 20. Ida, H. (1972). Variability in the number of fish taken by larva nets. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38 (9): 965-980
 21. Iglesias, M., Brothers, E.B. & Morales-Nin, B. (1997). Validation of daily increment deposition in otoliths. Age and growth determination of *Aphia minuta* (Pisces: Gobiidae) from the northwest Mediterranean. *Marine Biology* 129: 279-287
 22. Jones, C. (1986). Determining age of larval fish with the otolith increment technique. *US Fishery Bulletin* 84: 91-103
 23. La Mesa, M. (1999). Age and growth of *Aphia minuta* (Pisces, Gobiidae) from the central Adriatic Sea. *Scientia Marina* 63 (2): 147-155
 24. La Mesa, M. (2001). Age and growth of *Crystallogobius linearis* (von Duben, 1845) (Teleostei: Gobiidae) from the Adriatic Sea. *Scientia Marina* 65 (4): 375-381
 25. Leis, J.M. & Rennis, D.S. (2000). Gobiinae (Gobies). *In* Leis, J.M. & Carson-Ewart, B.M. (eds.). The larvae of Indo-Pacific coastal fishes. *Fauna Malesiana Handbook* 2, Brill. pp. 611- 616
 26. Magalhães, A. (1998). Territorialidade e utilização de espaço em *Pomatoschistus pictus* (Pisces: Gobiidae). Tese de Mestrado em Etologia, ISPA. 42 pp.

27. McBride, R.S., Fahay, M.P. & Able, K.W. (2002). Larval and settlement periods of the northern searobin (*Prionotus carolinus*) and the striped searobin (*P. evolans*). Fisheries Bulletin 100: 63-73
28. Miller, P.J. (1961). Age, growth and reproduction of the rock goby, *Gobius paganellus* L., in the Isle of Man. Journal of the Marine Biological Association of the U.K. 41: 737-769
29. Miller, P.J. (1986). Gobiidae. In Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., Nielsen, J. & Tortonese, E. (eds.). Fishes of the northeastern Atlantic and the Mediterranean. Vol. III. Unesco, UK. pp. 1019-1085
30. Miller, P.J. (1990). Gobiidae. In Quero, J.C., Hureau, J.C., Karrer, C., Post, A. & Saldanha, L. (eds.). Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Vol. II. JNICT, Lisbon, SEI, Paris; and UNESCO, Paris. pp. 925-951
31. Morales-Nin, B. & Panfili, J. (2002). Age estimation. In Panfili, J., Pontual, H. (de)., Troadec, H. & Wright, P.J. (eds.). Manual of Fish Sclerochronology. Ifremer-IRD coedition. Brest, France. pp. 91-98
32. Nelson, J. S. (1994). Fishes of the World. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York. 600 pp.
33. Palomera, I., Olivar, M. P. & Morales-Nin, B. (2005). Larval development and growth of the European hake *Merluccius merluccius* in the northwestern Mediterranean. Scientia Marina 69 (2): 251-258
34. Panfili, J. & Ximénès, M.C. (1992). Measurements on ground or sectioned otoliths: possibilities of bias. Journal of Fish Biology 41: 201-207
35. Petersen, C.G.J (1919). Our Gobies (Gobiidae). From the egg to the adult stages. Report of the Danish Biological Station 26:45-66

36. Radtke, R.L., Kinzie, R.A. & Folsom, S.D. (1988). Age at recruitment of Hawaiian freshwater gobies. *Environmental Biology of Fishes* 23: 205-214
37. Ré, P. (1983). Growth of pilchard larvae *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1972) in relation to some environmental factors. *Investigación Pesquera* 47 (2): 277-283
38. Ré, P. & Gonçalves, E. (1993). Growth of sprat *Sprattus sprattus* larvae in the German Bight (North Sea) as inferred by otolith microstructure. *Marine Ecology Progress Series* 96: 139-145
39. Russel, F.S. (1976). The eggs and planktonic stages of British marine fishes. Academic Press. 524 pp.
40. Searcy, S.P. & Sponaugle, S. (2000). Variable larval growth in a coral reef fish. *Marine Ecology Progress Series* 206: 213-226
41. Secor, D.H., Dean, J.M. & Laban, E.H. (1992). Otolith removal and preparation for microstructural examination. *In* Stevenson, D.K. & Campana, S.E. (eds.). Otolith microstructure examination and analysis. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117. pp. 19-57
42. Shafer, D.J. (2000). Evaluation of periodic and aperiodic otolith structure and somatic-otolith scaling for use in retrospective life history analysis of a tropical marine goby, *Bathygobius coalitus*. *Marine Ecology Progress Series* 199: 217-229
43. Somerton, D. A. & Kobayashi, D. R. (1989). A method for correcting catches of fish larvae for the size selection of plankton nets. *Fisheries Bulletin U.S.* 87: 447-455
44. Sponaugle, S. & Cowen, R.K. (1994). Larval durations and recruitment patterns of two Caribbean gobies (Gobiidae): contrasting early life histories in demersal spawners. *Marine Biology* 120 (1): 133-143

45. Thorrold, S.R. & Hare, J.A. (2002). Otolith applications in reef fish ecology. *In* Sale, P.F. (ed.). Coral reef fishes. Dynamics and diversity in a complex ecosystem. Academic Press, USA. pp. 243-264
46. Victor, B.C. (1991). Settlement strategies and biogeography of reef fishes. *In* Sale, P.F. (ed.). The ecology of fishes on coral reefs. Academic Press, San Diego, California. pp. 231-260
47. Wright, P.J., Panfili, J., Morales-Nin, B. & Geffen, A.J. (2002). Otoliths. *In* Panfili, J., Pontual, H. (de)., Troadec, H. & Wright, P.J. (eds.). Manual of fish sclerochronology. Ifremer-IRD coedition. Brest, France. pp. 31-57