

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



Influência do comportamento vocal no sucesso
reprodutor do xarroco lusitano *Halobatrachus didactylus*
(Bloch & Schneider, 1801)

RITA ANDREIA OLIVEIRA CARRIÇO

MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA
Especialização em Ecologia e Conservação Marinha

Faro

2011

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



Influência do comportamento vocal no sucesso
reprodutor do xarroco lusitano *Halobatrachus didactylus*
(Bloch & Schneider, 1801)

RITA ANDREIA OLIVEIRA CARRIÇO

Tese co-orientada por:

Professor Doutor Paulo Fonseca (F.C.U.L., D.B.A.)

Professora Doutora Maria Clara Amorim (I.S.P.A.)

Professora Doutora Deborah Power (UALG, F.E.R.N)

MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA

Especialização em Ecologia e Conservação Marinha

Faro

2011

AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta dissertação gostaria de agradecer a todos que, directa ou indirectamente, me ajudaram durante a sua realização ou que simplesmente me apoiaram, tendo contribuído para a realização deste objectivo, o meu sincero muito obrigada.

- Ao Professor Doutor Paulo Fonseca, por ter aceite a orientação do meu projecto de mestrado, por todo o apoio, disponibilidade e revisão da tese.

- À Professora Doutora Maria Clara Amorim, por ser minha co-orientadora e por todo o seu entusiasmo, as suas sugestões e ajuda imprescindível durante o trabalho, em especial no tratamento estatístico e revisão da tese.

- À Professora Doutora Deborah Power, por ter aceite a orientação interna do meu projecto de mestrado, por toda a informação, sugestões e disponibilidade ao apoiar esta dissertação.

- A todo o grupo de investigação Fisiologia Comportamental e Comunicação do Departamento de Biologia Animal da FCUL, em particular Raquel Vasconcelos, Joana Jordão, Sílvia Pedroso, Andreia Ramos e Daniel Alves, por toda a assistência, ajuda e colaboração no trabalho de campo.

- À Márcia Pinto também pela ajuda e colaboração no trabalho de campo.

- À Professora Doutora Teresa Modesto e respectivo Centro de Ciências do Mar (CCMAR) da Universidade do Algarve pela análise às amostras de sangue.

- À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) que financiou o projecto Acoustic communication in the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus* (PDCT/MAR/58071/2004), no âmbito do qual esta dissertação foi inserida.

- À Base Aérea N°6 do Montijo por ter permitido a realização deste estudo nas suas instalações.

- A todos os meus colegas da licenciatura e mestrado por partilharem comigo todo este percurso académico.

- Aos meus amigos por toda a força, incentivo e por estarem presentes ao longo deste percurso. Em especial à Rafaela Paiva e ao André Vicente, que para além do apoio também ajudaram directamente.

- À Família, por todo o apoio, incentivo, compreensão, ajuda e paciência demonstrada.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 3 |
| 1. Selecção sexual e sucesso reprodutor | 3 |
| 1.1 Comunicação acústica em peixes | 6 |
| 1.2 Produção de sons em peixes | 7 |
| 1.3 Audição em peixes | 9 |
| 2. Influências dos Androgénios no comportamento reprodutor | 10 |
| 3. Batrachoidideos | 12 |
| 3.1 Descrição geral da espécie: o xarroco, <i>Halobatrachus didactylus</i> | 12 |
| 4. Objectivos | 15 |

INFLUÊNCIA DA EMISSÃO DAS VOCALIZAÇÕES DE CORTE (SIRENES) NO SUCESSO REPRODUTOR DO XARROCO LUSITANO, *HALOBATRACHUS DIDACTYLUS* (Bloch & Schneider, 1801)

| | |
|-------------------------------|----|
| Resumo | 17 |
| 1. Introdução | 18 |
| 2. Materiais e Métodos | 21 |
| 2.1 Análise Hormonal | 22 |
| 2.2 Análise morfométrica | 22 |
| 2.3 Quantificação dos ovos | 23 |
| 2.4 Registo e análise de sons | 23 |
| 2.5 Análise Estatística | 24 |

| | |
|----------------------------|----|
| 3. Resultados | 25 |
| 4. Discussão | 29 |
| Referências bibliográficas | 32 |

SUCESSO REPRODUTOR EM MACHOS DE XARROCO LUSITANO, *HALOBATRACHUS DIDACTYLUS* (Bloch & Schneider, 1801): INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO MACHO E DA DIMENSÃO DO NINHO

| | |
|----------------------------|----|
| Resumo | 37 |
| 1. Introdução | 38 |
| 2. Materiais e Métodos | 40 |
| 2.1 Análise Estatística | 41 |
| 3. Resultados | 42 |
| 4. Discussão | 47 |
| Referências bibliográficas | 51 |
| | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| ANEXO | 62 |

Resumo

As espécies da família Batrachoididae têm sido bons modelos de estudo nas áreas da comunicação, neurofisiologia e endocrinologia. O xarroco Lusitano é uma espécie com um repertório acústico particularmente elaborado para peixes. Os machos desta espécie emitem vocalizações de corte (as sirenes) para atrair as fêmeas para o acasalamento, permanecendo depois o macho no ninho a cuidar dos ovos até aos juvenis possuírem vida livre. Neste trabalho pretendeu-se avaliar se os machos com maior actividade vocal têm melhor qualidade (avaliado através de índices morfométricos e níveis de androgénios) e maior sucesso reprodutor, sendo este avaliado através do número de ovos de cada postura. Pretendeu-se ainda, num segundo estudo, compreender a contribuição do tamanho dos machos e da área dos ninhos ocupados para o seu sucesso reprodutor.

O registo da actividade acústica foi efectuado através de hidrofones colocados em frente de 7 abrigos ocupados pelos machos experimentais, tendo sido realizadas gravações de 6 horas diárias durante os meses de Maio a Julho de 2010. No final dos cerca de 15 dias de gravação realizados por macho, foram recolhidas amostras de sangue para análises hormonais (Testosterona e 11-Cetotestosterona). Paralelamente foram também colocados 87 abrigos artificiais numa zona intertidal do estuário do Tejo. Todos os ninhos foram verificados quinzenalmente e foi registada a ocupação (número de machos e fêmeas), dimensões dos indivíduos (comprimento total e standard), área do ninho, e presença de posturas, tendo-se tirado a respectiva fotografia quando existia.

Os resultados vieram indicar a existência de correlações significativas entre o número de ovos e a taxa de canto, o esforço vocal e a condição física. No entanto, uma análise de regressão mostrou que apenas a taxa de canto revelou ser um bom preditor do número de ovos, explicando cerca de 77% da variabilidade. Para a taxa de canto e esforço vocal foram observados valores superiores para machos com posturas. Contrariamente, valores de peso eviscerado e condição física registaram-se superiores em machos sem ovos. Através deste estudo foi também possível concluir que o sucesso reprodutor se encontrava correlacionado com a área do ninho e com o tamanho do macho, mas só a área do ninho foi um bom preditor (explicando 60% da variabilidade) do tamanho da postura obtida. Deste modo, estes resultados demonstram pela primeira vez que o comportamento vocal é o factor mais importante para o sucesso reprodutor de um peixe.

Palavras-chave: Comunicação acústica, vocalizações de corte (sirenes), xarroco Lusitano, *Halobatrachus didactylus*, Batrachoididae, sucesso reprodutor.

Abstract

Batrachoididae species are good models for the study of communication, neurophysiology and endocrinology. The Lusitanian toadfish (*Halobatrachus didactylus*) has an extremely large acoustic repertoire for fish. Males of this species produce advertisement calls (boatwhistles) to attract females for mating and stay in the nest providing parental care until the offspring is free-swimming. The aim of this study was to test if males with higher calling rates have better quality (evaluated by androgen levels and morphometric measurements) and higher reproductive success, i.e. higher number of eggs in their nest. The effect of male size and nest internal area in male reproductive success was also studied.

Acoustic activity was monitored with hydrophones placed in front of 7 experimental shelters occupied by males. Recordings were performed during 6 hours per day between May and July 2010. Blood samples for hormone analysis (testosterone and 11-ketotestosterone) were taken. Another set of 87 artificial shelters were placed on an intertidal zone of the estuary of the river Tagus. All nests were checked every fortnight for occupation (number of males and females), size of individuals (standard and total length), and presence of clutches. When eggs were present a photograph was taken.

Results demonstrated significant correlations between the number of eggs, calling rate, calling effort and male physical condition. However, a regression analysis showed that only the calling rate was a good predictor of reproductive success, explaining about 77% of variability in the number of eggs. Higher calling rates and calling effort were significantly higher in males that spawned. On the contrary, eviscerated weight and physical condition were higher in males without eggs.

This study also documented a significant influence of the nest area and male length on male's reproductive success. However, the regression analysis showed that only the size of nests was a significant predictor of the number of eggs (explaining about 60% of variability). In conclusion, these results demonstrate for the first time that mainly vocal behaviour has a significant effect on the reproductive success in a fish.

Key-Words: Acoustic communication, toadfish, *Halobatrachus didactylus*, advertisement calls, boatwhistles, reproductive success, Batrachoididae.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Selecção sexual e sucesso reprodutor

O sucesso reprodutor tem sido interpretado com base na teoria da selecção sexual de Darwin. As diferenças nas capacidades reprodutivas são atribuídas a dois mecanismos principais: a competição entre machos e a escolha por parte das fêmeas, sendo designados respectivamente por selecção intra-sexual e inter-sexual (Andersson, 1994; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2009).

Apesar de machos e fêmeas contribuírem de igual modo para o *pool* genético da prole, o investimento energético das fêmeas é geralmente superior, nomeadamente devido à ocorrência de anisogamia. O gâmeta feminino, por ser de maiores dimensões que o masculino e por possuir uma maior quantidade de reservas nutritivas, acarreta um elevado custo energético levando a que as fêmeas produzam menos gâmetas e apresentem um potencial para produzir descendência mais limitado do que os machos (Alcock, 2009). Consequentemente, estas deverão seleccionar bons parceiros, em termos de qualidade genética, para assegurar a sobrevivência da prole e, deste modo, aumentar a sua *fitness* (Andersson, 1994). Por outro lado, os machos têm que competir entre si para ter acesso às fêmeas, uma vez que estas, devido ao seu comportamento selectivo e incapacidade de se reproduzirem a uma taxa rápida, representam um recurso limitado. Adicionalmente, o dispêndio de energia na prestação de cuidados parentais é também um factor a considerar no balanço energético da reprodução.

A ocorrência de competição intra-sexual na reprodução é comum em teleósteos. A forma mais comum consiste na competição entre machos dominantes (machos tipo I), sendo normalmente machos maiores, com diferenciação de ornamentos morfológicos, exprimindo sinais de corte e defendendo territórios para a reprodução (Oliveira *et al.*, 2005). Esta forma de competição consiste na presença simultânea de machos que investem recursos para atracção de fêmeas, possuindo mais armamentos e ornamentos, evidenciando a sua dominância e por isso conseguindo mais facilmente o acesso às fêmeas (Taborsky *et al.*, 2008). Por outro lado existem machos que exploram o investimento dos anteriores (machos parasitas ou “sneakers”), tentando, na altura da desova, fertilizar as posturas de fêmeas atraídas por outros machos (Taborsky *et al.*, 2008). Estas tácticas alternativas de reprodução podem ser classificadas de acordo com a sua plasticidade durante o tempo de vida dos indivíduos como fixas, sequenciais ou reversíveis. Adicionalmente, as diferenças entre os vários morfotipos de uma espécie

podem envolver um conjunto de características incluindo o comportamento reprodutivo, a diferenciação morfológica ou diferenciação no tecido de gónadas e glândulas acessórias (Oliveira *et al.*, 2005).

Embora diferenças intra-sexuais na morfologia e comportamento determinem normalmente a vantagem competitiva de certos indivíduos, em espécies com intensa competição dos machos pelo acesso às fêmeas são os indivíduos com menor capacidade competitiva que usualmente adoptam táticas de acasalamento alternativas para se reproduzirem (Oliveira *et al.*, 2001). Uma vez que os machos são geralmente o sexo mais competitivo, os polimorfismos sexuais ocorrem sobretudo neste sexo. Os casos conhecidos de polimorfismos sexuais correspondem maioritariamente a estratégias reprodutivas alternativas, classificadas como ‘Bourgeois’ e parasíticas. Os machos ‘Bourgeois’ competem activamente entre si para aceder às fêmeas, defendendo territórios de reprodução e podendo prestar cuidados parentais, enquanto que os machos parasitas exploram o investimento dos anteriores, mimetizando a morfologia e comportamento das fêmeas, de modo a fertilizarem os ovos. Contribuem, deste modo, para a diminuição do sucesso reprodutivo dos anteriores (Gonçalves *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2001). Os machos ‘Bourgeois’ investem em características exibicionistas, como ornamentos morfológicos, sinais de cortejamento (como por exemplo os ‘humming calls’ em *Porichthys notatus* ou as sirenes em *Halobatrachus didactylus*), a libertação de feromonas ou a ornamentação dos ninhos (Oliveira *et al.*, 2001). Pelo contrário os machos parasitas tentam aproximar-se do local sem serem notados, libertando o esperma antes que o macho ‘Bourgeois’ possa reagir à sua presença, ou ainda cooperar com o macho de modo a que este tolere a sua presença na zona de acasalamento (Oliveira *et al.*, 2001).

A escolha do macho por parte da fêmea pode ser baseada nas suas características comportamentais e morfológicas, tais como intensidade de corte, dimensão, coloração, grau de ornamentação, e feromonas, bem como no tamanho do ninho, na qualidade do território e outros recursos fornecidos (Bradbury & Verhencamp, 1998). O macho exhibe a sua qualidade à fêmea através de sinais visuais, químicos, sonoros ou eléctricos emitidos durante a corte, que são bons exemplos de características seleccionadas sexualmente (Bradbury & Verhencamp 1998). Por outro lado, características importantes na escolha de parceiros podem também ser importante na competição entre machos (‘Bourgeois’), como o tamanho ou armamentos, que têm assim também a função de ornamentos (Griggio *et al.*, 2007).

A selecção intra e inter-sexual actuam deste modo em conjunto, tornando-se essa interacção num factor determinante para o sucesso reprodutor dos indivíduos. Os benefícios da escolha de parceiro têm sido desde sempre um tema central da teoria da selecção sexual. A selecção de um parceiro sexual é favorecida quando os benefícios da escolha de um bom parceiro para o acasalamento excedem os custos dessa procura (Fagundes *et al.*, 2007). Esta escolha pode traduzir-se em benefícios reprodutivos directos e indirectos. Os benefícios directos podem incluir recursos alimentares dados à fêmea, um melhor território, maior protecção e reforço do tamanho da prole, etc. Por exemplo, em espécies com cuidados parentais, a fêmea pode escolher um parceiro que dê melhores cuidados parentais e beneficiar de uma maior taxa de sobrevivência das crias. Por sua vez os benefícios indirectos podem determinar uma maior taxa de sobrevivência e resistência a parasitas e, conseqüentemente, um aumento do sucesso reprodutor (Andersson, 1994; Barbosa & Magurran, 2006).

No entanto, um elevado nível de escolha pode acarretar custos, nomeadamente a redução nas oportunidades de reprodução devida à diminuição de potenciais parceiros envolvidos na formação de outros pares reprodutores (Rose *et al.*, 2003). Outros custos envolvem o tempo e energia dispendidos, o aumento do risco de predação e do risco de ataque por entrada no território dos machos. Assim, e embora o número de estudos tenha vindo a aumentar, particularmente no que diz respeito aos custos, pouco trabalho tem sido desenvolvido em peixes comparativamente a outros taxa (Fagundes *et al.*, 2007).

A qualidade dos potenciais parceiros e o seu conseqüente sucesso reprodutor poderão ser avaliados através de diversos parâmetros, tais como a dimensão corporal. É espectável que a dimensão tenha um papel importante na escolha de parceiro sexual, já que se por um lado machos maiores têm vantagem no estabelecimento e defesa de áreas de desova e de territórios de melhor qualidade, por outro lado, fêmeas de maiores dimensões possuem um potencial reprodutivo superior e poderão ajudar na defesa do território. Uma preferência por parceiros maiores tem sido verificada em diversos estudos realizados em peixes teleósteos (Rose *et al.*, 2003).

Para maximizar o sucesso reprodutor, a selecção deverá favorecer mecanismos que ajustem o esforço parental ao valor reprodutivo da descendência, por exemplo através de uma avaliação parental do número ou idade dos descendentes e da possibilidade da sua perda por predação. O tamanho da postura poderá também ser

ajustado à qualidade parental quer através de investimento no comportamento sexual quer pela redução da postura (Rose *et al.*, 2009).

1.1 Comunicação acústica em peixes

Apesar dos peixes serem o maior grupo de produtores de sons entre os vertebrados, o conhecimento da função dos sinais acústicos é incomparavelmente inferior neste grupo quando comparado com anfíbios, aves e mamíferos (Ladich, 2004). Os peixes emitem sons durante interações agonísticas, comportamentos de corte e desova, podendo ainda emitir sons durante a natação (Ladich, 2004; Kasumyan, 2009).

Comparativamente a outros tipos de comunicação, a transmissão de informação através de sinais sonoros possui claras vantagens, nomeadamente a elevada velocidade de propagação e considerável distância de acção. Estas características, aliadas a uma sensibilidade auditiva direccionada, permitem aos peixes identificar a fonte do sinal, tornando a comunicação acústica bastante eficiente (Kasumyan, 2009). Este tipo de comunicação torna-se especialmente importante em habitats de reduzida visibilidade, quer por escassez de luz quer devido a elevada turbidez da água (Hawkins & Myrberg, 1983). No entanto, uma vez que os sinais acústicos dos peixes exibem tipicamente mais energia a baixas frequências (tendo consequentemente um grande comprimento de onda), a distância a que o som é propagado em águas baixas é consideravelmente reduzida. Para além disso, o ruído de fundo em águas rasas é mais elevado a baixas frequências contribuindo para que os sinais acústicos sejam mais facilmente mascarados pelo ruído ambiente (Ladich & Fine, 2006 ; Ladich, 2004).

A diversidade dos sinais acústicos produzidos pelos peixes está associada ao mecanismo de produção de som e a variações no seu padrão de activação, podendo surgir diferenças entre espécies da mesma família e até na mesma espécie (diferenças individuais), assim como variações associadas ao contexto da produção de sons. A diversidade pode ainda depender da época do ano, da actividade circadiana, do desenvolvimento ontogenético, da motivação, estatuto social e dimorfismo sexual (Amorim, 2006; Vasconcelos, 2006).

Apesar da diversidade de sons não ser tão elevada como noutros *taxa*, a variabilidade entre os sons produzidos por indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes poderá mediar a avaliação dos adversários ou o reconhecimento da identidade dos competidores bem como promover o isolamento reprodutivo (pré-zigótico) e a

escolha do parceiro com melhores características ou maior motivação (Amorim, 2006). Os sons produzidos durante a corte e a desova podem também ser interpretados como sinais para promover a cooperação entre macho e fêmea, sendo que o interesse do emissor e do receptor consiste na libertação sincronizada dos gâmetas, proporcionando melhores hipóteses para o sucesso reprodutor (Hawkins & Amorim 2000, Myrberg & Lugli, 2006).

Embora inúmeras espécies de peixes produzam sons, são escassos os estudos que relacionam a actividade vocal e as características dos sons com a qualidade do macho, e menos frequentes ainda, estudos que evidenciem o papel dos sinais acústicos na escolha de parceiros e conseqüentemente no sucesso reprodutor (Ladich, 2004; Amorim *et al.* 2010). O único exemplo conhecido refere a preferência de fêmeas de *Stegastus partitus* (Pomacentridae) por vocalizações de corte de baixa frequência, produzidas por machos de maiores dimensões (Myrberg *et al.*, 1986). Fêmeas da mesma espécie tendem ainda a favorecer machos com elevadas taxas de corte, que tenham melhor condição corporal e que possuam menor probabilidade de canibalizar os seus ovos (Knapp & Kovach, 1991). Tem sido demonstrado também que fêmeas de *Pomacentrus partitus* usam os sons de corte dos machos conspecíficos para localizar os ninhos durante o período reprodutor, sendo até mesmo capazes de distinguir os sons provenientes de diferentes machos da mesma espécie, tendo a modalidade acústica um importante papel na selecção sexual (Myrberg *et al.*, 1986).

1.2 Produção de sons em peixes

A produção de sons em peixes é normalmente realizada em proximidade do receptor. Sobretudo em águas rasas estes deverão ter uma maior dificuldade de propagação devido à baixa frequência dos sons emitidos (Ladich & Fine, 2006 ; Ladich, 2004).

Os peixes apresentam diferentes mecanismos de produção de som, sendo o taxon que apresenta a maior diversidade destes mecanismos entre os vertebrados (Ladich & Fine, 2006). A acção de músculos sónicos associados à bexiga gasosa é um dos mecanismos mais importantes na produção de sons comunicativos de elevada intensidade em peixes, sendo o mecanismo presente no xarroco *Halobatrachus didactylus*. A contracção destes músculos (intrínsecos ou extrínsecos) gera vibração de baixa frequência (< 1000 Hz) na bexiga gasosa e a conseqüente produção de som

(Ladich & Fine, 2006). Os sons produzidos são geralmente pulsados e repetitivos. Estas características contrastam com a maioria dos sinais dos vertebrados terrestres, que possuem frequências superiores, são tonais e exibem frequentemente uma clara modulação de frequência. (Ladich, 2004; Ladich & Fine, 2006). Outra classe de mecanismos de produção de som encontra-se associada à acção das barbatanas peitorais e pode envolver a vibração da cintura peitoral ou alterações bruscas na tensão dos tendões peitorais. Ainda outro exemplo de mecanismo sónico consiste na estridulação por fricção de estruturas ósseas, tais como dentes, raios de barbatanas ou vértebras (Ladich & Fine, 2006).

Nos Batrachoidideos o padrão temporal das vocalizações é determinado por uma rede motora vocal que recebe informação através do sistema auditivo. Esta rede inclui os centros vocais e acústicos do prosencéfalo e mesencéfalo que podem modular o output do gerador do padrão vocal (GPV) situado no rombencéfalo, que inclui o circuito neuronal motor que enerva os músculos sónicos da bexiga gasosa. A actividade rítmica do GPV determina directamente a taxa de contracção dos músculos sónicos, determinando assim as características temporais das vocalizações, incluindo duração e frequência fundamental (inverso do período dos pulsos de som, i.e. da contracção dos músculos sónicos) (Remage-Healey & Bass, 2004; Remage-Healey & Bass, 2006).

Os peixes podem comunicar quer através da produção de diferentes tipos de sons ou alterando as características de um determinado som de acordo com o contexto (Amorim, 2006; Amorim *et al.*, 2008a). Por exemplo, um som composto por pulsos de baixa frequência pode variar consoante o contexto social, no número de pulsos bem como na sua taxa de repetição, e consequentemente na sua duração (Amorim, 2006; Kasumyan, 2008).

As características de sons simples mais comumente analisadas são: a duração do som, o número de pulsos no som, o período dos pulsos (o intervalo entre as amplitudes máximas de pulsos adjacentes) ou taxa de repetição dos pulsos, a frequência dominante (isto é, a frequência com mais energia) e as frequências máximas e mínimas do som. Estas características podem ser representadas graficamente por sonogramas (representação gráfica da frequência do som ao longo do tempo) e oscilogramas (representação gráfica da amplitude do som ao longo do tempo) (Kasumyan, 2008).

Estudos comportamentais têm demonstrado que tanto o conteúdo espectral como as características temporais de cada som, incluindo o número e a taxa de repetição dos pulsos, poderão ser relevantes na comunicação (Ladich, 2004; Amorim *et al.*, 2008a).

Diferenças na duração dos sons, no número e na taxa de repetição dos pulsos poderão ocorrer em famílias relacionadas, permitindo a discriminação de espécies (Myrberg *et al.*, 1978; Ladich, 2004; Amorim *et al.*, 2008). Variações intra-específicas poderão reflectir identidade individual e ainda o reconhecimento do estado de motivação do emissor do som (Mann & Lobel, 1998; Amorim & Vasconcelos, 2008).

1.3 Audição em peixes

Algumas espécies de peixes possuem um sistema de recepção auditiva relativamente bem desenvolvido e podem discriminar diferentes sons com características acústicas distintas tais como frequência, amplitude e outras. Poderão até eventualmente ser capazes de determinar a direcção da fonte do som e a distância a essa fonte (Kasumyan, 2008).

A audição nos peixes é mediada sobretudo pelos órgãos receptores otolíticos presentes no ouvido interno, localizados de cada lado da cabeça, perto do mesencéfalo. O ouvido interno é composto por três câmaras principais, *utrículus*, *sacculus* e *lagena*, ligadas por canais semi-circulares preenchidos com endolinfa, um líquido com uma composição iónica e viscosidade particulares (Pitcher, 1994; Webb *et al.* 2008). Os três órgãos receptores contêm um epitélio sensorial (mácula) e uma estrutura de carbonato de cálcio (otólitos). A mácula encontra-se coberta por células ciliadas que detectam o movimento dos otólitos, que como têm uma densidade três vezes superior à do tecido circundante, respondem ao som com uma vibração de menor amplitude e diferença de fase (Wysocki, 2006). Não existem estruturas externas óbvias para indicar a sua presença. Nos clupeídeos, no entanto, existe uma ligação indirecta para o exterior através do sistema da linha lateral, e em outros peixes existe uma pequena abertura através de um estreito ducto endolinfático (Webb *et al.*, 2008).

Medições da sensibilidade auditiva da maioria das espécies de peixes revelaram que os peixes respondem a um intervalo relativamente estreito de frequências, geralmente entre 50Hz (ou abaixo) até 1000 ou 1500 Hz (Webb *et al.*, 2008). A capacidade auditiva dos peixes é influenciada pela sua sensibilidade e pelo uso de estruturas auditivas acessórias, podendo variar entre dois extremos, denominados de generalistas e especialistas (Webb *et al.*, 2008). Os especialistas, que incluem espécies tão diversas como mormirídeos, anabantídeos e ciprinídeos, caracterizam-se por

possuírem especializações morfológicas (vesículas cheias de gás ou adaptações ósseas ligadas à parte anterior da bexiga gasosa) que podem estar próximas ou em contacto directo com o ouvido interno, melhorando a capacidade auditiva. Este incremento na performance auditiva é devido à transmissão ao ouvido interno das flutuações de pressão induzidas pelo estímulo acústico na bexiga gasosa. Estas espécies são capazes de detectar sons com frequências superiores a 3000 kHz (Vasconcelos, 2006; Webb *et al.*, 2008).

As espécies generalistas, como batrachoidídeos e salmonídeos, não possuem estruturas especializadas, respondendo principalmente ao componente cinético das ondas sonoras de baixa frequência (< 1kHz) e a intensidades elevadas (Vasconcelos, 2006; Webb *et al.*, 2008).

O sistema auditivo é particularmente importante para os vertebrados aquáticos quando a sua orientação visual é restrita. Os sons provenientes de diferentes fontes permitem a obtenção de informação relevante para a sobrevivência, para encontrar parceiros e presas ou evitar predadores (Wysocki & Ladich, 2005).

2. Influência dos Androgénios no comportamento reprodutor

As hormonas esteróides são sobretudo produzidas nas gónadas e no tecido interrenal e são classificadas em quatro grupos principais: progestinas, corticóides, androgénios e estrogénios (Oliveira & Gonçalves, 2008).

Os androgénios actuam na diferenciação dos caracteres sexuais primários e secundários dos machos, na expressão do comportamento reprodutivo, na regulação da resposta do hipotálamo e da glândula pituitária e na espermatogénese (Oliveira *et al.*, 2008).

A modulação social destas hormonas consiste num mecanismo adaptativo através do qual os indivíduos ajustam a sua motivação de acordo com o contexto social que enfrentam. Assim, as interações sociais dentro de uma determinada rede social vão estimular a produção de androgénios nos indivíduos e os níveis individuais destes deverão ser função do estatuto social e da estabilidade do ambiente social em que o animal vive. Deste modo, estes deverão ter um papel fundamental como mediadores endócrinos dos efeitos do contexto social na expressão do comportamento, permitindo ao animal ajustar o seu comportamento social ao contexto através da modulação

sensorial, cognitiva e mecanismos neuro-motores subjacentes à comunicação animal (Oliveira, 2005).

Os androgénios são conhecidos por modularem o comportamento social dos machos em Teleósteos, especificamente no controlo da territorialidade, corte e cuidados parentais. A testosterona é um dos mais comuns, principalmente em mamíferos e aves. Nos machos de teleósteos, os androgénios mais comumente encontrados em circulação são, para além da Testosterona (T), a 11-alfa-hidroxy-testosterona (11-OHT) e a 11- Cetotestosterona (KT), sendo esta última o principal androgénio envolvido na regulação da actividade biológica dos indivíduos (Oliveira & Gonçalves, 2008). Em aves e mamíferos alguns dos efeitos comportamentais masculinizantes dos androgénios presentes nas gónadas dependem da conversão da T em estradiol (E2) pela aromatase. No entanto, nos peixes, a KT é o androgénio mais abundante no plasma na maioria das espécies, tendo sido sugerido ser mais eficaz do que a T na expressão das exibições sexuais masculinas (Oliveira & Gonçalves, 2008). Normalmente observa-se uma diferença sexual marcada nas hormonas em circulação, com concentrações muito baixas ou indetectáveis no plasma de estradiol (E2) e elevadas concentrações de KT nos machos, e o padrão inverso nas fêmeas (Oliveira & Gonçalves, 2008).

As hormonas podem afectar a comunicação através da modulação da produção do sinal pelo emissor, na percepção do sinal pelo receptor ou no processamento central da mensagem por ambos (Oliveira, 2005). Em termos de modulação do comportamento vocal, as hormonas esteróides têm demonstrado modular a actividade do mecanismo sónico da bexiga gasosa a diferentes níveis. A administração de androgénios (KT e T), estrogénios (E2) e glucocorticóides (cortisol) aumenta rapidamente a duração de vocalizações induzidas através de estimulação eléctrica do circuito motor vocal, o que sugere a modulação pelas hormonas esteróides dos circuitos vocais do rombencéfalo (GPV), nestas espécies (Ramage-Healey & Bass, 2004; Oliveira & Gonçalves, 2008). Ramage-Healey & Bass (2004, 2005) demonstraram que as hormonas esteróides podem modular hierarquicamente o output do núcleo vocal, tendo efeitos em sítios específicos ao nível do mesencéfalo e do rombencéfalo para produzir efeitos rápidos e sustentados na actividade vocal. O androgénio 11-Cetotestosterona produz aumentos rápidos e sustentados na actividade vocal de *P. notatus*, observando-se elevações desta hormona em machos de tipo I vocalmente activos versus machos em silêncio. Experiências de playback também demonstraram que os androgénios modificam rapidamente os padrões motores vocais nos machos de batrachoidideos. Ramage-Healey & Bass (2005)

simularam intrusões territoriais (“desafios vocais”) através de playbacks de sirenes com *Opsanus beta*, e observaram alterações rápidas (5-20 min.) quer nas vocalizações quer nos níveis de 11-Cetotestosterona. A administração exógena de androgénios também promove o desenvolvimento dos músculos sónicos em machos e fêmeas juvenis bem como em sneakers (que não usam as vocalizações para atrair as fêmeas), efeito acompanhado por um aumento na área do sarcoplasma das mitocôndrias nas miofibrilhas (Brantley *et al.*, 1993; Oliveira & Gonçalves, 2008).

A sensibilidade auditiva também parece ser modulada por esteróides sexuais. As fêmeas de *P. notatus* localizam os machos para acasalar (McKibben & Bass, 1998), verificando-se plasticidade auditiva sazonal nesta espécie (Sisneros *et al.*, 2004): as hormonas esteróides induzem nas fêmeas uma melhoria na precisão da codificação temporal, discriminando melhor as frequências dominantes dos sons de acasalamento pelos machos (Sisneros *et al.*, 2004).

3. Batrachoidideos

A família Batrachoididae é uma das famílias de peixes melhor estudadas em termos do comportamento e dos aspectos neurofisiológicos da produção e detecção de sinais acústicos, tendo-se tornado num importante modelo de estudo nesta área (Bass & McKibben, 2003). Esta família é composta por 3 subfamílias, 22 géneros e 73 espécies, estando a produção de sons bem documentada em quatro espécies: *Opsanus tau*, *O. beta*, *Porichthys notatus* e *H. didactylus*, que diferem no seu repertório acústico (Bass & McKibben, 2003; Amorim, 2006).

Esta família é caracterizada por migrar para águas menos profundas durante a época reprodutiva. Os machos ocupam um abrigo onde permanecem durante várias semanas, emitindo vocalizações intensas para atrair as fêmeas, e guardando ovos e juvenis após as posturas (Bass & McKibben, 2003).

3.1 Descrição geral da espécie: o xarroco lusitano, *Halobatrachus didactylus*

O modelo utilizado no presente trabalho foi o xarroco lusitano (Fig. 1), *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801). Este peixe teleóstéo pertencente à família Batrachoididae possui uma distribuição tipicamente subtropical no Atlântico-

Este, principalmente entre a Península Ibérica Central e o Golfo da Guiné (Roux, 1986) (Fig. A, Anexo). Habita geralmente estuários e zonas costeiras, em águas pouco profundas, ocupando sedimento arenoso e vasoso, e encontrando-se predominantemente em abrigos e cavidades rochosas (Costa, 2004). É um predador generalista, alimentando-se preferencialmente de crustáceos, moluscos e pequenos peixes (Costa, 2004).

A época de reprodução ocorre entre Maio e Agosto, sendo o pico da desova geralmente nos meses de Maio e Junho (Modesto & Canário, 2003a). Os machos são territoriais e ocupam ninhos sob rochas ou fendas, onde guardam os ovos, defendendo-o contra predadores ou intrusos (Amorim *et al.* 2010; Vasconcelos *et al.* 2010). A estratégia de reprodução desta espécie baseia-se na emissão de vocalizações específicas com o intuito de atrair as fêmeas para os ninhos. Estas colocam escassas centenas de ovos aderentes às paredes do ninho, para depois serem fertilizados pelo macho, que ficará responsável pelos cuidados parentais até os juvenis possuírem vida livre (Costa, 2004; dos Santos *et al.* 2000).

Tal como na espécie *P. notatus* (Girard, 1854), os machos de *H. didactylus* também apresentam polimorfismo sexual, com dois morfotipos que diferem a nível endócrino, no tamanho das gónadas, na bexiga gasosa, nos músculos sónicos e no tipo de estratégia reprodutiva (Modesto & Canário 2003). Os machos tipo I apresentam um comportamento territorial de protecção do ninho e emitem vocalizações (as sirenes) para atrair as fêmeas para acasalar. Têm ainda maiores dimensões, músculos sónicos mais desenvolvidos, gónadas mais pequenas e glândulas acessórias (às gónadas) de maiores dimensões (Modesto & Canário 2003). Os machos de tipo II, também designados por 'sneakers' ou machos parasitas, possuem normalmente um tamanho menor, não emitem vocalizações, e usam a estratégia de mimetizar o comportamento das fêmeas para conseguir chegar perto dos ovos e assim tentar obter fecundações. Possuem gónadas de maiores dimensões de modo a poderem fecundar de um modo oportunista os ovos guardados por outros machos tipo I, a uma maior distância. (Modesto & Canário, 2003). Os machos de tipo I apresentam ainda um aumento significativo na massa dos músculos sónicos durante a época reprodutiva, que não ocorre quer nas fêmeas quer nos machos tipo II (Modesto & Canário, 2003). Uma hipótese que poderá explicar esta hipertrofia sazonal é o aumento, no início do período reprodutivo, dos níveis de KT (mas não T) em machos de tipo I quando comparados com machos de tipo II, e que deverão modular o crescimento dos músculos sónicos,

sugerindo que este androgénio terá um importante papel no dimorfismo sexual dos músculos sónicos e no comportamento reprodutivo (Modesto & Canário, 2003).

Esta espécie possui um repertório acústico muito diversificado relativamente às espécies de peixes vocais conhecidos. É caracterizado por pelo menos 5 tipos de vocalizações: sirene, tamborilado longo, tamborilado, duplo-coacho, coacho, e ainda por emitir combinações de diferentes tipos de sons (dos Santos *et al.* 2000; Amorim *et al.* 2008a). Apesar de apenas os machos tipo I produzirem vocalizações de corte, tanto as fêmeas como os sneakers produzem vocalizações agonísticas em situações de perturbação (dos Santos *et al.* 2000).

Estudos recentes têm mostrado a existência de uma enorme variabilidade na taxa de emissão de sirenes pelos machos territoriais. Elevadas taxas de vocalização e um aumento do esforço vocal reflectem uma melhor condição física dos machos, medida através do conteúdo lipídico dos músculos somáticos (Amorim *et al.*, 2010). Assim a taxa de vocalização a par do esforço vocal deverão ser bons indicadores da qualidade do macho. A capacidade parental e a qualidade do macho deverão, por sua vez, não só ter um papel fundamental na comunicação inter-sexual como estar sob forte selecção por parte das fêmeas, uma vez que deverão ser factores determinantes para o sucesso reprodutor (Amorim *et al.*, 2010). Porém, a influência da actividade vocal no sucesso reprodutor de *H. didactylus* não se encontra ainda confirmada, sendo o alvo deste estudo.



Fig. 1 – Exemplos de xarroco, *Halobatrachus didactylus*

4. Objectivos

Os objectivos deste estudo consistiram em avaliar a influência do comportamento vocal no sucesso reprodutor do xarroco lusitano (*H. didactylus*). Este trabalho encontra-se dividido em dois artigos, cujos objectivos consistiram em:

- Avaliar a contribuição da taxa de emissão de sirenes, dos níveis de androgénios e de outras características físicas dos machos (i.e. vários atributos que possam contribuir para a qualidade do macho) para o seu sucesso reprodutor, avaliado através do número de ovos presentes no ninho;
- Uma vez que na primeira parte do trabalho os machos foram estudados em ninhos de iguais dimensões, pretendeu-se compreender a influência da dimensão dos ninhos ocupados pelos machos e do tamanho dos machos no sucesso reprodutor.

Influência da emissão das vocalizações de corte (sirenes) no
sucesso reprodutor do xarroco Lusitano, *Halobatrachus*
didactylus (Bloch & Schneider, 1801)

Resumo

Os machos de xarroco Lusitano utilizam sinais acústicos para atrair as fêmeas na altura da reprodução, podendo estes sinais serem bons indicadores dos potenciais recursos dos machos e da sua qualidade física, e conseqüentemente garantir um maior sucesso reprodutor. Neste estudo pretendeu-se averiguar se a actividade de canto e características físicas do macho são bons preditores do sucesso reprodutor dos machos tipo I avaliado pelas posturas que conseguiram obter. Por outro lado, pretendeu-se relacionar a actividade vocal de machos nidificantes com a sua qualidade física e os níveis de androgénios circulantes. Foram colocados 7 abrigos experimentais na zona intertidal do estuário do Tejo, nos quais foram instalados hidrofones para se proceder ao registo acústico dos machos que ocupavam estes ninhos, nos meses de Maio a Julho de 2010. Foram recolhidas amostras de sangue para análise hormonal (Testosterona e 11-Cetotestosterona) e realizadas análises morfométricas aos indivíduos estudados. A contagem dos ovos foi efectuada através das fotografias tiradas das posturas.

Foi verificada a existência de correlações significativas entre o número de ovos e a taxa de canto e o esforço vocal (percentagem de tempo a cantar). Estas variáveis apresentaram valores significativamente superiores em machos com ovos do que em machos sem posturas, sugerindo que estas características têm um papel importante no sucesso reprodutor dos machos. Uma análise de regressão revelou que as taxas de canto média e máxima são bons preditores do número de ovos, explicando cerca de 77% da variabilidade das posturas obtidas. Não se verificou uma relação significativa entre os níveis hormonais e a actividade vocal e sucesso reprodutor. Os níveis elevados de cortisol observados e a prestação de cuidados parentais poderão ter inibido a produção de androgénios. Os valores obtidos podem não traduzir os níveis reais durante a actividade vocal uma vez que oscilam muito rapidamente com o contexto social. Observou-se ainda uma correlação entre o peso dos músculos sónicos e a taxa de canto, uma vez serem estes responsáveis pela produção de sons em peixes da família Batrachoididae. Por outro lado o peso eviscerado e a condição física indicaram valores superiores em machos sem posturas, o que poderá ser explicado pela energia dispendida pelos machos parentais na defesa do ninho e prestação de cuidados parentais.

Palavras-chave: Batrachoididae, comunicação acústica, androgénios, qualidade do macho, escolha de parceiros, actividade vocal.

Introdução

O estudo da comunicação acústica tem conhecido um desenvolvimento crescente em diversos grupos de vertebrados, tendo vindo a revelar um conjunto de adaptações na produção e percepção dos sinais vocais essenciais para a escolha de parceiros sexuais e o sucesso reprodutor em várias espécies (Bass & McKibben, 2003). Parte da investigação realizada tem incidido na relação entre a produção de sinais acústicos e o correspondente sucesso reprodutor. Recorrendo aos sinais envolvidos na atracção sexual tem-se procurado estudar não só a evolução dos sistemas de comunicação mas também o papel da selecção sexual na modelação dos comportamentos reprodutivos (Andersson, 1994; White *et al.*, 2009).

Machos de diversas espécies utilizam sinais acústicos para, entre outras funções, atrair fêmeas para o acasalamento, exibindo os seus atributos através destes sinais, com os quais informam os potenciais parceiros acerca das suas qualidades (McKibben & Bass, 1998). Os sinais acústicos poderão ser bons indicadores das características dos machos, nomeadamente da sua qualidade física, saúde, capacidade de aprendizagem e resistência ao stress (White *et al.*, 2009). As fêmeas poderão assim seleccionar os machos com base em características sinalizadas pela sua actividade vocal e pelas características dos sinais acústicos. Por exemplo, a capacidade de reconhecer o tamanho do macho através da frequência do seu som pode ser importante pois machos maiores são normalmente dominantes, garantem melhores territórios ou locais de desova, e têm maior sucesso reprodutivo (Janicke *et al.*, 2008; Appleby & Redpath, 1997)). Os sons parecem ser muito importantes na selecção sexual em várias espécies vocais de vários taxa e as fêmeas parecem ser mais atraídas por machos com maior actividade vocal (Fish, 1972; Appleby & Redpath, 1997), sendo esta conseguida ou através da redução dos intervalos de silêncio ou do aumento da duração dos sons (Appleby & Redpath, 1997). Os machos da ave *Poephila guttata* com maior actividade vocal produzem também uma descendência mais resistente/robusta (Houtman, 1992; Appleby & Redpath, 1997). As fêmeas de algumas espécies parecem ainda preferir machos com repertórios mais complexos. A complexidade dos sons parece assim estar correlacionada com o tamanho do território, sobrevivência, e sucesso reprodutor (Appleby & Redpath, 1997). Alguns parâmetros acústicos encontram-se relacionados como o tamanho do peixe, tais como som de frequência dominante mais baixa, amplitude elevada e aumento da duração do som, observada em peixes de maiores

dimensões (Myrberg *et al.*, 1993; Connaughton *et al.*, 2000). As fêmeas devem assim ser capazes de extrair informação sobre o tamanho dos machos e a sua prontidão para a fertilização e possível guarda dos ovos, a partir dos sons de corte produzidos por estes, de modo não só a beneficiarem da escolha correcta de um macho da sua espécie, mas também do que melhor potencie a sobrevivência da sua descendência (Amorim, 2006). É assim espectável um benefício para as fêmeas se as características das vocalizações traduzirem uma melhor qualidade e condição física do macho e/ou níveis de androgénios mais elevados, que poderão significar melhor capacidade para defender território, maior taxa de fertilização, melhor pool genético, melhores cuidados parentais nas espécies que os possuam, traduzindo-se numa maior probabilidade de sucesso reprodutor (Andersson, 1994).

Os peixes teleósteos são o maior grupo de vertebrados produtores de sons, emitindo vocalizações para atrair as fêmeas para o acasalamento (Ladich, 2004). No entanto ainda não foi estabelecida uma relação entre a actividade vocal e o sucesso reprodutor neste grupo.

Apesar da actividade vocal não ser aparentemente muito dispendiosa em peixes possui sempre certas restrições fisiológicas, sendo limitada pela resistência à fadiga, que deverá influenciar as baixas taxas de vocalização espontânea, que apenas deveram ser elevadas em pequenos picos de actividade (Amorim *et al.*, 2002; Mitchell *et al.* 2008). Estes constrangimentos sugerem que a taxa de emissão destes sinais deverá ser um indicador honesto da qualidade dos emissores (Amorim *et al.*, 2010).

Os androgénios modulam o comportamento territorial e de corte mas também as características dos sinais acústicos, podendo influenciar a ritmicidade dos geradores de padrão central e a actividade vocal (Oliveira, 2004). Os machos territoriais da família Batrachoididae possuem níveis elevados de testosterona e 11-Cetotestosterona (11-kT) durante as épocas em que vocalizam quando comparados com períodos em que se encontrem em silêncio, sugerindo que estas hormonas esteroides deverão regular a actividade vocal durante o período reprodutor (Modesto & Canário, 2003; Ramage-Healey & Bass, 2006; Forlano *et al.*, 2007). A libertação de androgénios causa uma hipertrofia dos músculos sónicos, por aumento da região miofibrilar e expansão do sarcoplasma, entre outras alterações morfológicas que se deverão traduzir no aumento da capacidade de contracção dos músculos sónicos, tornando a produção de sons mais eficaz e conduzindo a um aumento da amplitude do som (Connaughton *et al.* 2000; Modesto & Canário, 2003). Os músculos sónicos podem triplicar a sua massa durante a

época reprodutiva em algumas espécies, sendo esta hipertrofia iniciada pelo aumento dos níveis de testosterona que desencadeiam o aumento das áreas miofibrilares e do retículo sarcoplasmático das fibras dos músculos sónicos (Connaughton *et al.*, 2002). A bexiga gasosa e os seus músculos sónicos associados do xarroco lusitano (*H. didactylus*) aumentam de tamanho ao longo da vida, e são 25% a 30% maiores em machos tipo I do que nas fêmeas, o que deverá explicar as diferenças sexuais na produção de sons (Modesto & Canário, 2003).

A família Batrachoididae produz sons através da contracção dos músculos sónicos associados à bexiga natatória, sendo o grupo de peixes vocais melhor estudados (Bass & McKibben, 2003; Maruska & Mensinger, 2009). Os machos de xarroco produzem sinais acústicos de chamamento durante a época de reprodução, sem contacto visual com as fêmeas, com o objectivo de atrair potenciais parceiros e eventualmente repelir rivais (Brantley & Bass, 1994). Os machos são territoriais, ocupando ninhos durante toda a época reprodutiva, possuem uma estratégia poligínica e prestam os cuidados parentais às posturas obtidas, permanecendo no ninho, defendendo-o, e cuidando dos ovos até os juvenis possuírem vida livre (Cotter, 2008).

No xarroco Lusitano, *Halobatrachus didactylus*, o sinal acústico de chamamento é longo (cerca de 1 s), tonal e de baixa frequência, sendo designado por sirene (dos Santos *et al.* 2000). A sirene é altamente estereotipada, mostrando diferenças inter-individuais durante curtos períodos de tempo (<10 min) (Amorim & Vasconcelos, 2008). A frequência fundamental das sirenes é determinada pela taxa de contracção do músculo sónico, responsável pela frequência fundamental de 50-60 Hz (Amorim & Vasconcelos, 2008; Amorim *et al.*, 2010). Diversas harmónicas ocorrem em múltiplos da frequência fundamental, estando a energia do som concentrada nessas bandas (Amorim & Vasconcelos, 2008).

A taxa de vocalização e o esforço de vocalização, i.e. a percentagem de tempo dispendido a vocalizar, reflectem a condição do macho *H. didactylus* (conteúdo lipídico dos músculos somáticos) e, numa menor proporção, poderá também reflectir a hipertrofia dos músculos sónicos e a presença de gónadas de maiores dimensões (Amorim *et al.*, 2010). Machos em melhores condições contraem os músculos sónicos a uma taxa superior, emitindo sirenes com pulsos com períodos mais curtos (Amorim *et al.*, 2010). Deste modo, os machos de xarroco poderão indicar às fêmeas a sua qualidade através da taxa e esforço de vocalização.

Como já mencionado, até à data não existe nenhum estudo em peixes que relacione características dos sons e actividade vocal com o sucesso reprodutor. O xarroco Lusitano é um óptimo modelo para abordar este aspecto uma vez que é uma espécie muito vocal (Amorim & Vasconcelos, 2008) e devido à facilidade de acesso durante a época reprodutiva a ninhos naturalmente ocupados e às suas posturas. Com este estudo pretendeu-se 1) relacionar a actividade vocal de machos nidificantes com a sua condição e outras características físicas e os níveis de androgénios circulantes e 2) averiguar se a actividade vocal medida pela taxa de canto e pelo esforço vocal (percentagem de tempo a cantar) é um bom preditor do sucesso reprodutor dos machos nidificantes avaliado pelas posturas que conseguiram atrair.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado durante a época de reprodução do xarroco Lusitano, de Maio a Julho de 2010. Foram colocados 7 abrigos artificiais (dimensões internas: 53,5 x 30 x 19 cm) de forma semicilíndrica e fechados numa das extremidades. Estes ninhos foram envolvidos numa rede de plástico com uma abertura à frente, de modo a assegurar a permanência do macho ao longo do estudo, mas deixando uma abertura suficientemente grande para a entrada das fêmeas e de potenciais presas. Estas redes não só não interferiram com a propagação do sinal acústico como permitiram interacções visuais (Fig. B, Anexo). Os ninhos foram colocados na zona intertidal do estuário do Tejo, nas instalações da Base Aérea N°6 no Montijo (38° 42'N, 8° 58'W) (Fig. C, Anexo) com um espaçamento de 1,5 m, numa posição em que só ficavam expostos ao ar durante as marés mais baixas (na lua cheia e lua nova) (Fig. D, Anexo). A fim de registar a actividade acústica destes machos ao longo de 15 dias foi colocado um hidrofone a 10 cm da entrada de cada ninho, fixado a uma haste de ferro de 8 mm de diâmetro, parcialmente enterrado no substrato arenoso.

Foram também posicionados outros 87 abrigos semelhantes aos experimentais na zona intertidal da mesma praia que foram espontaneamente ocupados. Nestes abrigos não foram colocadas redes podendo os peixes entrar e sair livremente. Os ninhos ficavam também quinzenalmente expostos ao ar e aí eram recolhidos 7 machos para serem colocados nos abrigos enredados.

O registo acústico foi iniciado 48h depois da colocação dos machos nos ninhos enredados, uma vez que se verificou que geralmente só após este período de habituação

é que estes iniciavam a actividade vocal. Foram efectuadas 6h diárias de gravação. Na maré viva seguinte, quando o ninho ficava novamente exposto ao ar, os peixes eram retirados dos ninhos, anestesiados (ver abaixo) e era recolhida uma amostra de sangue. Os peixes foram depois eutanasiados e levados para o laboratório para proceder a análises morfométricas.

Análise Hormonal

No final de cada quinzena, foram obtidas amostras de sangue dos 7 machos monitorizados para posterior doseamento de androgénios (Testosterona, 11-Cetotestosterona) (Fig. E, Anexo). Os peixes foram anestesiados com doses iguais de MS 222 (Tricaine Methane Sulphonate, Pharmaq, Norway) e bicarbonato, sendo de seguida retirado sangue da veia caudal. A duração de todo o processo não excedeu 4 minutos, o que é importante para evitar alterações nos níveis hormonais induzidas pela manipulação dos animais. Os peixes foram depois sacrificados com uma dosagem em excesso do mesmo anestésico. Foram ainda retiradas amostras de sangue a 14 machos dos ninhos não enredados que foram posteriormente libertados. O sangue foi imediatamente centrifugado durante 10 minutos a 3500 RPM com uma microcentrifugadora portátil (BIOGEN, Spectrafuge mini, 6000 rpm) e o sobrenadante (plasma) congelado até as amostras serem enviadas para Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, onde os níveis de androgénios circulantes foram quantificados com RIAs (Radioimmunoassays) segundo Modesto & Canário (2003).

Análise morfométrica

No laboratório, foram medidos o peso total e o peso eviscerado (± 1 g), o peso das glândulas acessórias, gónadas, fígado, bexiga natatória e músculos sónicos ($\pm 0,01$ g), bem como o comprimento total e standard (± 1 mm).

Foram analisados um total de 28 machos de *H. didactylus* com um comprimento total (CT) que variou entre os 34,0 cm e os 48,5 cm ($42,5 \pm 4,0$ cm; média \pm desvio padrão) e o comprimento standard (CS) entre 29,5 cm e 32,0 cm ($36,5 \pm 3,3$ cm). O peso total variou entre 627,0 g e 1899,0 g ($1217,7 \pm 328,0$ g) e o peso eviscerado entre 537,0 g e 1610,0 g ($1057,4 \pm 296,4$ g). O peso das gónadas variou entre 5,49 g e 30,17 g ($11, 20 \pm 5,06$ g); o peso das glândulas acessórias entre 2,24 g e 6,54 g ($4,30 \pm 1,15$ g); peso do fígado entre 20,00 g e 155,88 g ($42,80 \pm 37,40$ g); peso da bexiga-natatória

variou entre 15,01 g e 41,67 g ($24,30 \pm 5,48$ g) e o peso dos músculos sónicos variou entre 12,00 g e 30,68 g ($18,20 \pm 3,61$ g).

Quantificação dos ovos

Os ninhos que apresentavam ovos foram fotografados (Fig. F, Anexo), tendo a dimensão da postura sido determinada à posteriori, de modo a obter uma estimativa do sucesso reprodutor de cada macho. Para cada imagem, e recorrendo ao programa Image J (Wayne Rasband, NIH, USA), foi delimitada e medida a área total ocupada pelos ovos. Em seguida determinaram-se 3 sub-áreas representativas acompanhadas da contagem do número de ovos. Finalmente o número total de ovos foi estimado através do produto do número médio de ovos nestas sub-áreas pela razão entre a área total e a média das 3 subáreas. Este método foi calibrado através da comparação com a contagem manual de 8 fotografias, sendo o erro obtido inferior a 10%.

Registo e análise de sons

As vocalizações dos sete machos enredados foram capturadas por 7 hidrofones (High Tech 94 SSQ, sensibilidade -165 dB re 1 V/ μ Pa, frequência de resposta ± 1 dB 30 Hz - 6 KHz), filtradas para remover a componente DC (filtro analógico construído no laboratório), pré-amplificadas e digitalizadas (M-AUDIO Ultra 8R, conversão A/D a 48 kHz) e registadas num computador portátil com o programa Adobe Audition 3.0 (Adobe Systems Inc., 2005). Esta cadeia áudio permite gravar os 7 canais (i.e. os 7 machos) sincronamente.

Para cada grupo de 7 machos foram realizadas 6 horas diárias de gravação, 3 horas antes e 3 h depois da preia-mar em períodos que variaram entre 10 e 15 dias. As gravações decorreram entre 27 de Maio e 25 de Julho de 2010, tendo sido registados os sons produzidos por um total de 28 machos.

A temperatura da água foi registada a intervalos de 5 minutos através de um 'data logger' (Lotech USB-501-LT) encerrado num recipiente estanque e colocado no interior de um dos ninhos, tendo variado entre 18 e 26°C.

A análise dos sons foi feita com os programas CoolEdit Pro 2.0 e Adobe Audition 3.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) (Fig. G, Anexo). A taxa de emissão das sirenes (número de sirenes emitidas por hora) foi contabilizada minuto a minuto, para cada indivíduo, por observação dos oscilogramas para os 7 machos gravados em simultâneo. Foram determinadas as taxas médias e máximas para cada

macho. As sirenes foram atribuídas a um dado indivíduo com base numa relação sinal ruído claramente superior à dos vizinhos condicionada pela elevada atenuação dos sinais entre dois ninhos consecutivos. Foi ainda quantificado o esforço vocal para cada indivíduo (nº de horas a emitir sirenes/ nº de horas gravadas x 100).

Análise estatística

Foram analisados dez potenciais preditores do sucesso reprodutor.

Para perceber se os principais parâmetros em estudo se encontravam relacionados foi gerada uma matriz de Correlação de Spearman entre o logaritmo do número de ovos e as características do macho, nomeadamente: os níveis de Testosterona e 11- Cetotestosterona, o logaritmo do comprimento total, os resíduos da condição física, do peso das gónadas, das glândulas acessórias, do fígado e músculos sónicos, e ainda a taxa de canto média e o esforço vocal. Foram utilizados os resíduos das regressões lineares simples do peso das gónadas, glândulas acessórias, fígado, músculos sónicos no peso eviscerado como medida desses parâmetros controlados pela influência do peso do corpo. Esta relação dá uma medida do peso observado de determinados órgãos relativo ao valor médio esperado (dado pelo modelo de regressão) para um determinado tamanho corporal, ou seja, um macho com um resíduo positivo elevado do peso das gónadas, terá em média, gónadas mais pesadas do que a média para o seu tamanho. Do mesmo modo, como medida da condição física, utilizou-se os resíduos da regressão entre o logaritmo do peso eviscerado e o logaritmo do comprimento total. A transformação logarítmica do peso e do comprimento total dos machos foi utilizada para linearizar as relações alométricas.

Foi também realizada uma correlação entre os níveis de androgénios (Testosterona e 11- Cetotestosterona) e as características dos machos: o logaritmo do comprimento total, os resíduos da condição física, do peso das gónadas, das glândulas acessórias, do fígado e músculos sónicos, taxa de canto e o esforço vocal.

O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para verificar a existência de diferenças nos 10 preditores acima mencionados entre machos que obtiveram ovos e machos sem ovos.

Seguidamente efectuou-se uma análise de Regressão linear para testar o efeito dos parâmetros da actividade vocal: taxa de canto média e máxima, esforço vocal e os diversos parâmetros morfométricos (variáveis independentes) no número de ovos

(variável dependente). As transformações logarítmica da taxa de canto e a aplicação da raiz quadrada no número de ovos foram utilizadas para normalizar os dados.

A análise estatística foi efectuada através do programa Statistica 7.0 para Windows (StatSoft, Inc., 2005).

Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis: comprimento total, número de ovos, taxa de canto, esforço vocal, níveis de Testosterona e 11-Cetotestosterona, condição física, resíduos do peso das gónadas, glândulas acessórias, fígado e músculos sónicos. O número de ovos encontrou-se positivamente correlacionado com a taxa de canto média seguido do esforço vocal e de T mas negativamente correlacionado com a condição. A taxa de canto encontrou-se positivamente correlacionada com peso relativo dos músculos sónicos.

| | Log CT | Log (Nºovos+1) | taxa canto | esforço vocal | T | 11KT | COND | RES Gon | RES GA | RES Fig | RES MS |
|---------------|--------|----------------|-------------|---------------|-------------|-------|--------------|---------|-------------|-------------|-------------|
| Log CT | – | -0,25 | -0,35 | -0,32 | -0,40 | -0,18 | 0,13 | 0,08 | 0,36 | -0,30 | -0,19 |
| Log(Nºovos+1) | | – | 0,60 | 0,52 | 0,45 | -0,05 | -0,41 | 0,19 | 0,24 | 0,15 | 0,08 |
| taxa canto | | | – | 0,93 | 0,12 | 0,04 | -0,29 | 0,20 | 0,23 | 0,19 | 0,43 |
| esforço vocal | | | | – | 0,29 | 0,10 | -0,18 | 0,13 | 0,21 | 0,05 | 0,34 |
| T | | | | | – | 0,34 | -0,04 | 0,09 | 0,14 | 0,60 | 0,02 |
| 11KT | | | | | | – | -0,02 | 0,09 | 0,35 | 0,11 | 0,37 |
| COND | | | | | | | – | -0,24 | -0,29 | 0,10 | 0,16 |
| RES Gon | | | | | | | | – | 0,43 | 0,56 | 0,22 |
| RES GA | | | | | | | | | – | 0,23 | 0,23 |
| RES Fig | | | | | | | | | | – | 0,44 |
| RES MS | | | | | | | | | | | – |

Tabela 1 – Correlações entre o número de ovos e os parâmetros vocais e morfométricos encontrados nos ninhos dos machos de xarroco Lusitano. Os valores apresentados são os coeficientes de correlação de Spearman. Diferenças significativas são indicadas a negrito, restantes valores indicados sem realce são não significativos, $P < 0.05$. CT – Comprimento total, T – Testosterona, 11KT – 11- Cetotestosterona, COND – Condição física, RES Gon – Resíduos do peso das gónadas, RES GA – Resíduos do peso das glândulas acessórias, RES Fig – Resíduos do peso do fígado, RES MS – Resíduos do peso do músculos sónicos.

Comprovou-se existir uma diferença significativa na taxa de canto média e máxima de machos com e sem ovos (Taxa média: Mann-Whitney: $U = 10.0$, $P = 0.002$;

Taxa máxima: $U=9.5$, $P=0.002$), sendo a taxa de canto significativamente superior em machos com ovos, apesar da elevada variabilidade (Fig. 1 e 2).

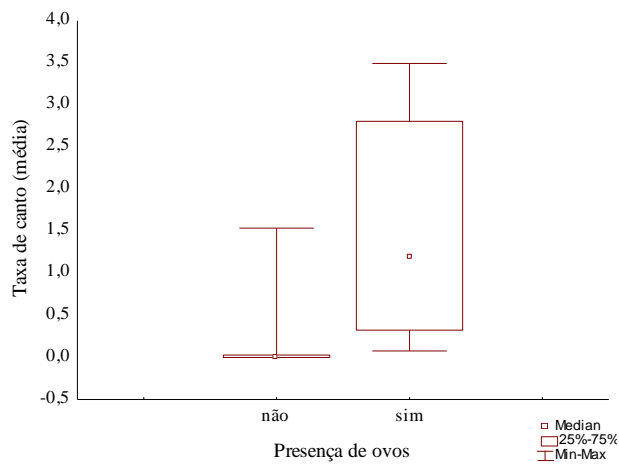


Fig. 1 – Comparação da taxa de canto média em machos com e sem ovos. Parcelas representando os percentis, em forma de caixas com bigodes, $p<0.05$, teste Mann-Whitney U

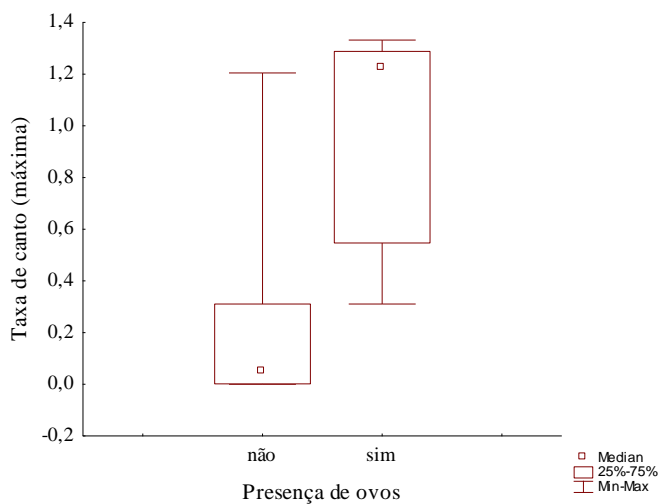


Fig. 2 – Comparação da taxa de canto máxima em machos com e sem ovos. Parcelas representando os percentis, em forma de caixas com bigodes, $p<0.05$, teste Mann-Whitney U.

Para o esforço vocal também se observou existirem diferenças significativas entre machos com e sem ovos ($U= 18.0$, $P=0,008$). Tendo-se observado um esforço vocal superior para machos com ovos (Fig. 3).

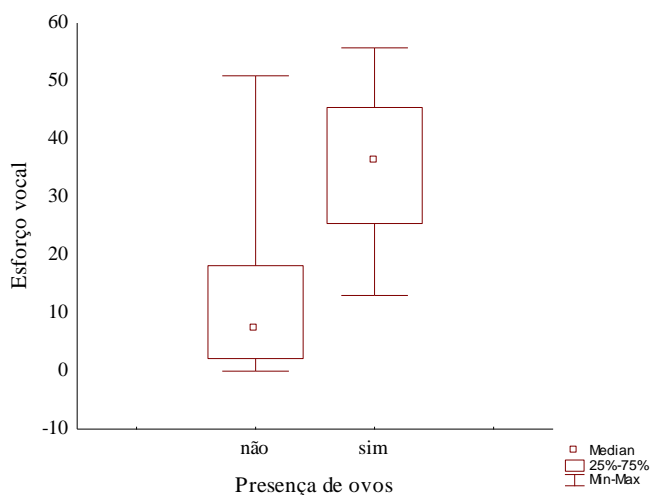


Fig. 3 – Comparação do esforço vocal em machos com e sem ovos. Parcelas representando os percentis, em forma de caixas com bigodes, $p < 0.05$, teste Mann-Whitney U.

Por outro lado também se verificaram diferenças em determinadas características físicas nos machos com e sem ovos, sendo o peso eviscerado e os resíduos da condição física significativamente superiores em machos sem ovos (Peso eviscerado: $U = 27.0$, $P = 0.04$; condição física: $U = 23.0$, $P = 0.02$; Fig. 4 e 5). Já os níveis de testosterona apresentaram-se superiores em machos com ovos ($U = 17.0$, $P = 0.04$; Fig. 6).

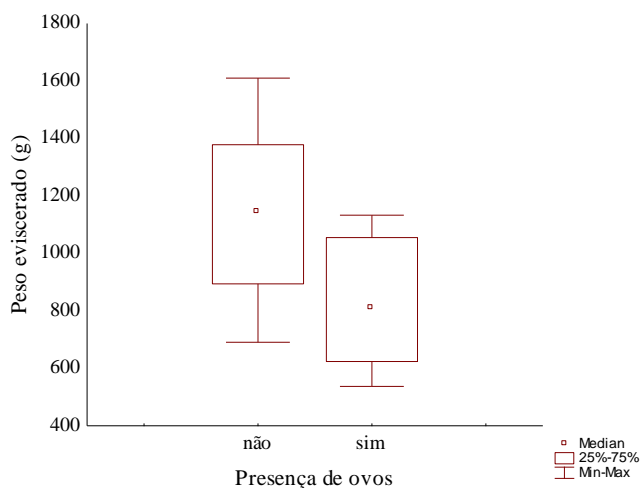


Fig. 4 – Comparação dos resíduos do peso eviscerado, em machos com e sem ovos. Parcelas representando os percentis, em forma de caixas com bigodes, $p < 0.05$, teste Mann-Whitney U.

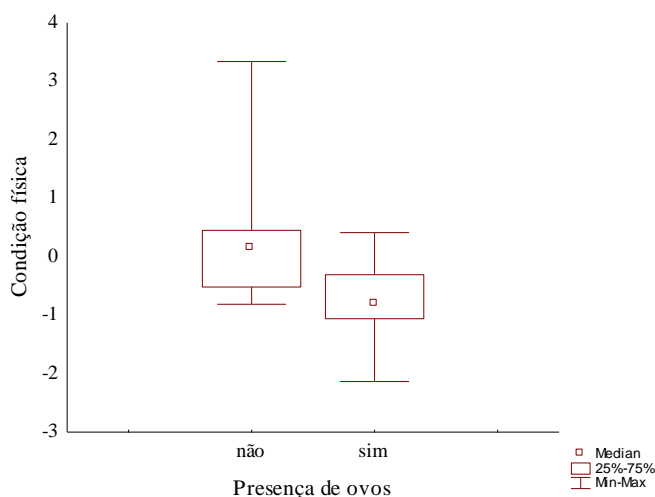


Fig. 5 – Comparação dos resíduos da condição física, em machos com e sem ovos. Parcelas representando os percentis, em forma de caixas com bigodes, $p < 0.05$, teste Mann-Whitney U.

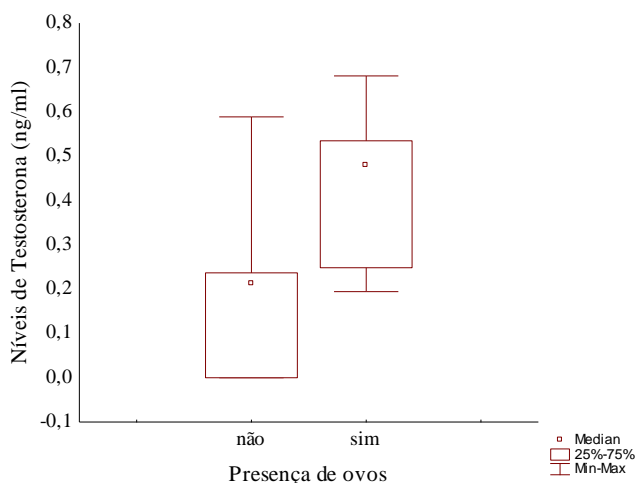


Fig. 6 – Mediana dos níveis de Testosterona em machos com e sem ovos. Parcelas representando os percentis, em forma de caixas com bigodes, $p < 0.05$, teste Mann-Whitney U.

Para os restantes parâmetros avaliados (Comprimento total: $U=42.0$, $P=0.19$; Peso gónadas: $U=48.0$; $P=0.40$; Peso glândulas acessórias: $U=41.0$, $P=0.21$; Peso fígado: $U=53.0$, $P=0.58$; Peso músculos sónicos: $U=57.0$, $P=0.75$; 11-Cetotestosterona: $U=40.0$, $P=0.71$) não foram verificadas diferenças significativas.

Através de uma análise de Regressão linear foi possível comprovar que a taxa de canto é um bom predictor do número de ovos, explicando cerca de 70% da variabilidade ($R^2=0.71$; Fig. 7). Com a utilização da taxa de canto máxima (T max) o R^2 aumenta para 0.77, explicando esta variável apenas mais 6% da variabilidade (Regressão linear, $F_{1,25}=57.42$, $P < 0.001$).

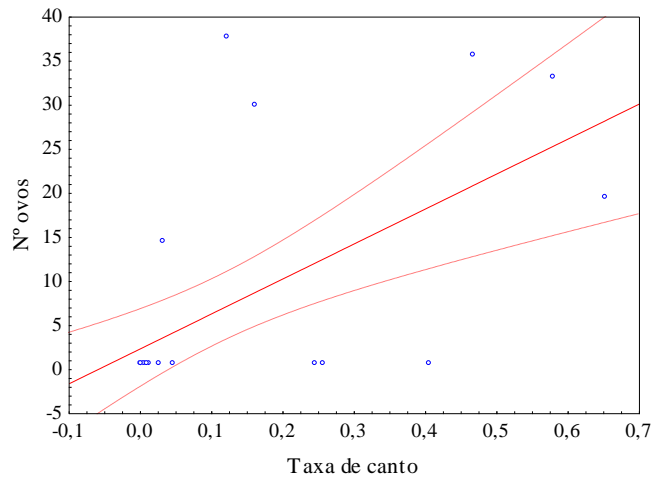


Fig. 7 – Relação entre o número de ovos (raiz quadrada $x + 0.5$) e a taxa de canto média ($\log x + 1$) e intervalos de confiança a 95%.

Discussão

Os sinais vocais são essenciais para o sucesso da reprodução nas espécies da família Batrachoididae (Bass & Mckibben, 2003). Neste trabalho procurou-se investigar se a taxa de canto e o esforço vocal são bons preditores do sucesso reprodutor dos machos nidificantes, através da contabilização do número de ovos que conseguiram obter. E por outro lado se a actividade vocal de machos nidificantes estará relacionada com as suas qualidades físicas, como a condição e os níveis de androgénios circulantes.

Verificou-se existir uma correlação significativa entre o número de ovos (indicador do sucesso reprodutor) e a taxa de canto, o esforço vocal e a condição física. No entanto apenas a taxa de canto (média e máxima) revelou ser um bom preditor explicando cerca de 77% da variabilidade do tamanho das posturas obtidas pelos machos de xarroco. Consistentemente, a taxa de canto e esforço vocal foram significativamente superiores nos machos em que foi detectada a presença de posturas em relação a machos sem ovos, o que mostra que uma maior actividade vocal nesta espécie tem um efeito significativo no seu sucesso reprodutor. Diversos estudos têm sugerido que no xarroco Lusitano e em outros Batrachoidideos, os sinais acústicos e as dimensões do corpo deverão revelar informação sobre a qualidade individual durante competições ou escolha de parceiros (Amorim *et al.* 2010). O presente estudo vem corroborar estas sugestões uma vez que a taxa de canto parece ser usada pelas fêmeas na escolha de parceiros para acasalar. Em várias espécies de insectos, anfíbios, aves e mamíferos, o tamanho dos indivíduos e características sexuais secundárias tais como os

sinais acústicos podem afectar directamente o resultado de competições entre machos e o sucesso do acasalamento (e.g. Castellano *et al.*, 2000).

A actividade vocal parece ser assim um importante parâmetro na escolha de parceiros em peixes, uma vez que as fêmeas poderão beneficiar de melhores cuidados parentais, melhores territórios, bons genes ou facilidade de localização dos machos (Brantley & Bass, 1994). As taxas de canto mais elevadas também deveram ter um papel importante na indicação da motivação dos machos para a reprodução, facilitando a libertação sincronizada dos gâmetas (Amorim *et al.*, 2003). Mckibben & Bass (1998) demonstraram também noutra espécie de batrachoidideo (*P. notatus*) que as fêmeas grávidas eram atraídas pelos sons dos machos reproduzidos a elevadas taxas.

Estes resultados indicaram valores de condição física e peso eviscerado superiores em machos sem ovos. Os cuidados parentais em machos de xarroco Lusitano têm custos, pois os machos tipo I passam por um período de reduzida alimentação enquanto guardam e tratam dos ovos, e defendem os ninhos vigorosamente durante cerca de 30 dias até os juvenis possuírem vida livre (Modesto & Canário, 2003a; Vasconcelos *et al.*, 2010). Deste modo isto poderá explicar uma melhor condição física em machos que não possuam ovos, uma vez que não terão tido a necessidade de despender toda essa energia, na defesa e cuidado dos ovos.

Neste trabalho verificou-se que os parâmetros vocais não se encontraram relacionados com os níveis hormonais. No entanto, os níveis de testosterona (T) mas não de 11 ceto-testosterona (11KT), o principal androgénio nos peixes teleósteos (Oliveira, 2004) foram superiores em machos com posturas. Estes resultados poderão ser explicados pelo facto de, uma vez que a recolha do sangue é realizada quando os peixes se encontram expostos ao ar nas marés de grande amplitude e/ou o facto de se encontrarem retidos nos ninhos pelas redes, sendo uma situação de maior stress, os níveis de cortisol serão necessariamente mais elevados, quando comparados com os níveis em xarrosos que não se encontravam confinados (dados não apresentados). Isto sugere que o facto de se encontrarem confinados deverá ser responsável pelo aumento dos níveis de cortisol, que deverão interferir com os níveis de androgénios, principalmente os níveis 11KT que estão relacionados com a actividade vocal em peixes (Ramage-Healey & Bass 2005). No entanto, machos que exibiram actividade vocal foram bem sucedidos na atracção de parceiros e apresentaram uma condição física semelhante aos peixes que se encontravam livres, sugerindo que o sucesso reprodutor não deverá ter sido afectado pelo confinamento (dados não apresentados). Existem

estudos que apontam o cortisol como inibidor das enzimas de conversão dos precursores 11KT. O composto Metyrapone, presente no cortisol pode inibir a enzima 11-B-hydroxilase que está presente não apenas na síntese do cortisol mas também na biosíntese da 11KT a partir de T (Oliveira & Gonçalves, 2008). Na carpa comum, os níveis elevados de cortisol afectam o eixo cérebro-pituitária-gónadas, resultando numa grande diminuição da produção testicular de androgénios, incluindo a 11KT (Goos & Consten, 2002). Por outro lado a prestação dos cuidados parentais poderá influenciar os baixos níveis de androgénios detectados.

A acrescentar ainda o facto de os níveis de androgénios analisados não reflectirem os níveis hormonais que os animais deveriam ter durante o período de actividade vocal. Os níveis de androgénios alteram-se rapidamente, não sendo bons indicadores em estudos de amostragem de comportamento durante longos períodos. Por exemplo na tilápia, e em batrachoidideos, os androgénios variam muito rapidamente em função das interacções sociais (Oliveira *et al.*, 1996; Ramage-Healey & Bass 2005). De facto, os efeitos mais estudados de 11KT e de T na actividade vocal são efeitos a curto-prazo (Ramage-Healey & Bass, 2004). Deste modo, os níveis de androgénios registados provavelmente não reflectem os perfis hormonais dos indivíduos amostrados e não deverão traduzir informação precisa das relações entre os níveis de esteróides, o comportamento vocal e o sucesso reprodutor.

Como esperado obteve-se também uma correlação significativa entre o peso dos músculos sónicos e a taxa de canto. Uma vez que estes músculos são responsáveis pela produção de sons, Amorim *et al.* (2009) sugere que em Batrachoidideos, machos com músculos sónicos mais pesados devem mostrar capacidades vocais superiores e emitir sons com maior amplitude.

Deste modo, foi possível concluir com este trabalho que o comportamento vocal e o tipo de vocalizações emitidas durante a corte deveram influenciar as posturas obtidas pelos machos desta espécie, tendo um efeito significativamente positivo no seu sucesso reprodutor. Este estudo é o primeiro a demonstrar experimentalmente que a produção de sons influencia o sucesso reprodutor num peixe teleósteo, sugerindo que vocalizações constantes e a taxas elevadas deveram funcionar como um indicador honesto da qualidade do macho e do seu grau de motivação e prontidão para a reprodução em Batrachoidideos.

Referências Bibliográficas

- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton: Princeton University Press.
- Amorim, M. C. P., McCracken, M. L., Fine, M. L. (2002). Metabolic costs of sound production in the oyster toadfish, *Opsanus tau*. *Canadian Journal of Zoology* 80, 830-838.
- Amorim, M.C.P., Fonseca P.J., Almada V.C. (2003). Sound production during courtship and spawning of *Oreochromis mossambicus*: male-female and male-male interactions. *Journal of Fish Biology* 62, 658–672.
- Amorim M. C .P. (2006). Diversity of Sound Production in Fish. *Communication in Fishes*. In Ladich F., Collin S.P., Moller P. and Kapoor B.G. (eds) *Fish communication*. Enfield, NH: Science Publishers, pp. 71–105.
- Amorim M. C. P. & Vasconcelos R. O. (2008). Variability in the mating calls of the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*: cues for potential individual recognition. *Journal of Fish Biology* 73, 1267–1283.
- Amorim, M. C. P., Vasconcelos, R.O. and Parreira, B. (2009). Variability in the sonic muscles of the Lusitanian toadfish (*Halobatrachus didactylus*): acoustic signals may reflect individual quality. *Canadian Journal of Zoololy* 87, 718-725.
- Amorim M. C. P., Simões J. M., Mendonça N., Bandarra N. M. , Almada V. C., Fonseca P.J. (2010). Lusitanian toadfish song reflects male quality. *The Journal of Experimental Biology* 213, 2997-3004.
- Appleby, B. M., Redpath S.M. (1997). Indicators of male quality in the hoots of Tawny owls (*Strix aluco*). *Journal of Raptor Research* 31(1):65-70.
- Bass A. H., McKibben J. R. (2003). Neural mechanisms and behaviors for acoustic communication in teleost fish. *Progress in Neurobiology* 69, 1–26.

Brantley R.K., Bass A.H. (1994). Alternative male spawning tactics and acoustic signals in the plainfin midshipman fish, *Porichthys notatus* (Teleostei, Batrachoididae). *Ethology* 96, 213–232.

Castellano S., Ross A., Laoretti F., Doglio S, Giacomini C. (2000). Call intensity and female preferences in the European green toad. *Ethology* 106, 1129–1141.

Connaughton, M. A., Taylor, M. H. and Fine, M. L. (2000). Effects of fish size and temperature on weakfish disturbance calls: implications for the mechanism of sound generation. *Journal of Experimental Biology* 203, 1503–1512.

Connaughton M. A., Fine M. L., Taylor, M. H. (2002). Weakfish sonic muscle: influence of size, temperature and season. *The Journal of Experimental Biology* 205, 2183–2188.

Cotter J. C. (2008). Distribution and structure of the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801) in the Tagus estuary and gender and morphotype identification by ultrasonography. MSc Dissertation, University of Lisbon.

Dos Santos M.E., Modesto T., Matos R. J., Grober M. S., Oliveira R. F., Canário A. (2000). Sound production by the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *Bioacoustics The International Journal of Animal Sound and its recording*, Vol 11, pp. 309-321.

Fish, J. F. (1972). The effect of sound playback on the toadfish. In *Behavior of Marine Animals*, Vol. 2 (Winn, H. E. & Olla, B., Eds), pp. 386–434. New York: Plenum Press.

Forlano P. M., Ramage-Healey L., Sisneros J. A.; Bass A. H. (2007). Steroid-induced plasticity in the auditory and vocal motor system: Recent studies in a teleost fish. *Evolutionary Molecular Strategies and Plasticity*, 25-50.

Goos H. J. T., Consten D. (2002). Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular Cell Endocrinology* 197, 105-116.

Houtman, A.M. (1992). Female Zebra Finches choose extra pair copulations with genetically attractive males. *Proceedings of the Royal Society London B*. 249, 3-6.

Ladich, F. (2004). Sound production and acoustic communication. In *The Senses of Fish Adaptations for the Reception of Natural Stimuli* (ed. G. von der Erude, J.Mogdans and B.G. Kapoor), pp. 210–230. New Delhi: Kluwer, Dordrecht and Narosa.

Janicke T., Hahn S., Ritz M. S., Peter H.U. (2008).Vocal performance reflects individual quality in a nonpasserine. *Animal behaviour* 75, 91-98.

Maruska K. P., Mensinger A.F. (2009). Acoustic characteristics and variations in grunt vocalizations in the oyster toadfish *Opsanus tau*. *Environmental Biolology of Fishes* 84, 325–337.

McKibben J.R., Bass A.H. (1998). Behavioral assessment of acoustic parameters relevant to signal recognition and preference in a vocal fish. *Journal of Acoustical Society of America* 104, 3520–3533.

Mitchell S., Poland J., Fine M. (2008). Does muscle fatigue limit advertisement calling in the oyster toadfish *Opsanus tau*? *Animal behaviour* 76, 1011-1016.

Modesto T., Canário A. V. M. (2003). Hormonal control of swimbladder sonic muscle dimorphism in the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3467-3477.

Modesto T., Canário A. V. M. (2003a) Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *General and Comparative Endocrinology* 131, 220–231.

Myrberg A., Ha S., Shablott M. (1993). The sounds of bicolor damselfish (*Pomacentrus partitus*): predictors of body size and a spectral basis for individual recognition and assessment. *Journal of Acoustical Society of America* 94(6), 3067-3070.

Oliveira R. F., Almada V.C., Canário A.V.M. (1996). Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Hormones and Behavior* 30, 2–12.

Oliveira, R. F. (2004). Hormones, social context and animal communication. *Animal Communication Networks*, ed. Peter K. McGregor. Published by Cambridge University Press.

Oliveira R.F. & Gonçalves D.M. (2008). Hormones and Social Behaviour of Teleost Fish. *Fish Behaviour*.

Remage-Healey L., Bass A. H. (2004). Rapid, Hierarchical Modulation of Vocal Patterning by Steroid Hormones. *The Journal of Neuroscience*, June 30, 24(26):5892–5900.

Remage-Healey L., Bass A. H. (2005). Rapid elevations in both steroid hormones and vocal signaling during playback challenge: a field experiment in Gulf toadfish. *Hormones and Behavior* 47, 297– 305.

Remage-Healey L., Bass A. H. (2006). A rapid neuromodulatory role for steroid hormones in the control of reproductive behavior. *Brain Research* 9; 4C: 5.

Vasconcelos R. O., Simões J. M, Almada V. C., Fonseca P. J., Amorim M. C. P. (2010). Vocal Behavior During Territorial Intrusions in the Lusitanian Toadfish: Boatwhistles Also Function as Territorial ‘Keep-Out’ Signals. *Ethology* 116, 155–165.

White D. J., King A. P., West M. J., Gros-Louis J., Tuttle E. M. (2009). Effects of singing on copulation success and egg production in brown-headed cowbirds, *Molothrus ater*. *Behavioral Ecology* 21 (2), 211-218.

Sucesso reprodutor em machos de xarroco *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801): influência do tamanho do macho e da dimensão do ninho

Resumo

Durante a época reprodutora, os machos de *Batrachoides* migram para águas rasas para estabelecer ninhos, e emitem vocalizações para atrair as fêmeas para acasalar, defendendo o ninho contra predadores e prestando cuidados parentais até os juvenis possuírem vida livre. Neste estudo foi investigada a influência do tamanho dos machos de xarroco lusitano e das dimensões dos ninhos ocupados no seu sucesso reprodutor, estimado pelo número de ovos obtidos. Foram colocados 87 abrigos artificiais de diferentes tamanhos numa zona intertidal do estuário do Tejo que foram ocupados espontaneamente por indivíduos desta espécie. Todos os ninhos foram verificados quinzenalmente durante marés baixas de grande amplitude, e foi registado o tamanho do ninho, a ocupação (número de machos e fêmeas), dimensões dos ocupantes (comprimento total), e a presença de posturas. Foi tirada uma fotografia sempre que houve posturas para posterior contabilização dos ovos.

Verificou-se que os ninhos de tamanho médio foram percentualmente mais ocupados. Observou-se uma proporcionalidade directa entre o tamanho dos machos e a dimensão dos ninhos escolhidos por estes, indicando que a preferência por ninhos médios se deve à distribuição de tamanhos dos machos reprodutores. Em termos de sucesso reprodutor, observou-se que o número de ovos estava positivamente correlacionado tanto com a área do ninho ocupado como com o tamanho do macho. Uma análise de regressão mostrou que só a área do ninho é um preditor significativo do tamanho da postura obtida. Considerando ainda só os machos com ovos, verificou-se que o número de ovos conseguidos estava positivamente correlacionado com o tamanho do macho mas não com a área do ninho. Estes resultados sugerem que a área do ninho e possivelmente o tamanho do macho sejam factores importantes no sucesso reprodutor dos machos desta espécie. Ninhos com maiores dimensões apresentam uma maior área de substrato para colocar um maior número de ovos. Por outro lado, machos maiores deverão ter uma melhor capacidade para defender ninhos maiores e prestarem melhores cuidados parentais, a par de outras características como maior fertilidade. Todas estas características deverão ser alvo de selecção por parte das fêmeas, na medida em que deverão garantir um maior sucesso reprodutor.

Palavras-chave: *Halobatrachus didactylus*, Batrachoididae, sucesso reprodutor, tamanho dos machos, dimensão do ninho.

Introdução

Os peixes teleósteos possuem diversas estratégias reprodutoras. As fêmeas tentam maximizar o seu sucesso reprodutivo escolhendo o melhor parceiro para acasalar. Para além das características físicas dos machos, estas também deverão seleccionar recursos que lhes permitam aumentar o sucesso na reprodução. A competição intra-sexual dos machos por esses recursos deverá, deste modo, provocar uma correlação positiva entre as características físicas dos machos e a qualidade dos recursos defendidos por estes (Marconato *et al.*, 1989). Diferenças individuais no sucesso reprodutivo tenderão a ser explicadas por factores como a competição por parceiros ou locais de acasalamento e a escolha do par reprodutor (Kvarnemo, 1995).

Em espécies que possuam cuidados parentais, torna-se vantajoso para as fêmeas avaliar a condição do macho e prever o seu sucesso reprodutivo anteriormente à escolha do parceiro (Andersson, 1994). Vários autores sugerem que o tamanho corporal e condição do indivíduo poderão ser bons indicadores de um futuro bom investimento parental por parte do macho, o que por sua vez deverá influenciar o sucesso reprodutivo (Marks *et al.*, 2009; Myrberg & Lugli, 2006). Por outro lado, em peixes poligâmicos com cuidados parentais, o sucesso reprodutivo dos machos deverá depender principalmente do número de fêmeas que conseguirem atrair, assim como da sua capacidade para cuidar e defender a prole (Marconato *et al.*, 1989).

Na família Batrachoididae os machos estabelecem ninhos em águas rasas durante a época de reprodução, produzindo vocalizações para atrair as fêmeas a desovarem nos seus ninhos, ficando depois os machos responsáveis por guardar os ovos e prestar os cuidados parentais (Brantley & Bass, 1994). Durante o inverno, estes peixes vivem em águas mais profundas, onde se alimentam e procuram abrigo. Na Primavera-Verão efectuam migrações sazonais, deslocando-se para águas menos profundas, para estabelecerem ninhos onde permanecem durante toda a época reprodutora. As fêmeas, que efectuam esta migração para escolherem um parceiro sexual e desovarem, deslocam-se em seguida para outros habitats a fim de se alimentarem e procurarem abrigo, ficando a protecção dos ovos a cargo dos machos (Costa, 2004).

O xarroco Lusitano distribui-se pelo Atlântico Oriental e habita estuários e lagoas costeiras, tendo o estuário do Tejo como limite norte (Roux, 1986). A época reprodutora decorre de Maio a Agosto no sul de Espanha (Palazón-Fernández *et al.*, 2001), mas em Portugal concentra-se de Maio a Julho (Modesto & Canário, 2003;

Costa, 2004). Um dos factores relevantes para a reprodução consiste na temperatura da água, sendo a actividade reprodutora apenas observada a temperaturas superiores a 18/19°C (Costa, 2004).

A estratégia de reprodução de machos de *H. didactylus* consiste na emissão de vocalizações específicas (sirenes de corte), de modo a atrair fêmeas para desovarem nos seus ninhos (Amorim & Vasconcelos, 2008). As fêmeas libertam poucas centenas de ovos de uma só vez, com dimensões de cerca de 5 a 8 mm de diâmetro (Palazón-Fernández *et al.*, 2001; Costa, 2004). Aos ovos e juvenis são posteriormente prestados cuidados parentais por parte do macho, que os defendem contra predadores e cuidam dos alevins até estes possuírem vida livre (Roux, 1986). Esta estratégia é também observada noutras espécies da mesma família, nomeadamente *Opsanus* sp. e *Porichthys notatus* (Fine & Thorson, 2008; Sisneros *et al.*, 2009).

O sistema reprodutor em *H. didactylus* é poligínico, podendo o macho territorial permanecer no mesmo ninho durante várias semanas, continuando a emitir vocalizações para atrair fêmeas adicionais (observação pessoal, ver Fine & Thorson, 2008). As fêmeas produzem apenas uma postura por época reprodutora, estando assim dependentes da capacidade parental de um único macho para o seu sucesso reprodutivo (Modesto & Canário 2003). Deste modo é de prever que as sirenes produzidas pelos machos do xarroco Lusitano informem as fêmeas do tamanho e condição do macho, características bastante relevantes para a defesa do ninho e prestação de cuidados parentais (Zahavi, 1975; Bradbury & Vehrencamp, 1998). Um estudo prévio mostrou que a taxa de emissão de sirenes por machos nidificantes da espécie em estudo reflecte a sua condição mas não a sua dimensão (Amorim *et al.*, 2010). No entanto este estudo considerou uma variabilidade restrita de tamanhos de machos. Para além disso, estudos realizados com outros batrachoidideos mostraram que o tamanho do ninho pode ser um factor limitante para o sucesso reprodutor dos machos, uma vez que apresentem uma área limitada para receber posturas (DeMartini, 1991).

No capítulo anterior estudou-se o efeito de vários factores no sucesso reprodutor dos machos, no entanto estes não apresentaram grande variabilidade nas suas dimensões corporais e os ninhos eram standardizados, o que não permitiu a avaliação adequada destes dois factores (tamanho do macho e dimensão do ninho). No presente estudo, foi introduzida a variação na dimensão do ninho, obtendo-se consequentemente uma maior variabilidade dos ocupantes, o que permitiu estudar o efeito destes dois factores no sucesso reprodutor do xarroco.

O objectivo deste estudo consistiu assim, em avaliar se o tamanho dos machos de xarroco Lusitano e o tamanho dos ninhos ocupados por estes contribuem para o seu sucesso reprodutor contabilizado pelo número de ovos obtidos.

Materiais e Métodos

Este estudo decorreu entre 5 de Maio e 26 de Julho de 2010, durante a época de reprodução do xarroco Lusitano, numa área intertidal do estuário do Tejo situada nas instalações da Base Aérea N°6, no Montijo (38° 42'N, 8° 58'W) (Fig. C, Anexo).

Foram colocados 87 ninhos (abrigos artificiais) em substrato vaso-arenoso no limite inferior da zona intertidal apenas exposto durante marés vivas (Fig. D, Anexo). Foram colocados ninhos de betão ou cerâmica com 5 dimensões, de forma semi-cilíndrica, e fechados numa das extremidades. Estes abrigos tinham tamanho suficiente para acomodar um macho e várias fêmeas. Foram designados do mais pequeno para o maior por: tamanho 1 (44,5 cm-comprimento; 19,5 cm-largura; 9 cm-altura; 0,123 m²-área); tamanho 2 (54,5 cm x 20,5 cm x 14,5 cm; 0,163 m²); tamanho 3 (53,5 cm x 25,5 cm x 17,5 cm; 0,183 m²); tamanho 4 (53,5 cm x 30 cm x 19 cm; 0,261m²); e tamanho 5 (54 cm x 30 cm x 18 cm; 0,313 m²). Os tamanhos 2 e 3, assim como os tamanhos 4 e 5 corresponderam a abrigos semelhantes, com a diferença que tanto o tamanho 3 como o 5 possuíam um alargamento na parte posterior em relação aos abrigos 2 e 4, respectivamente. O tamanho 1 era um telhão de cerâmica, sendo os restantes estruturas de cimento (Fig. H a M, Anexo). Os ninhos foram dispostos com um espaçamento de 1,5 m entre si, e apenas ficavam expostos ao ar nas marés mais baixas na lua nova e na lua cheia. Na primeira quinzena foram colocados 8 ninhos de tamanho 1, 11 ninhos de tamanho 2, 8 ninhos de tamanho 3, 28 de tamanho 4 e 32 de tamanho 5. Estes números variaram de quinzena para quinzena, uma vez que foram retirados alguns ninhos que estavam a ser usados noutros estudos que decorreram simultaneamente.

Todos os ninhos foram verificados quinzenalmente e foi registada a sua ocupação (número de machos e fêmeas presentes no ninho), dimensões dos ocupantes (comprimento total e standard medidos com uma precisão de 1 mm), bem como a presença de posturas (Fig. N, Anexo). Os ninhos que apresentavam ovos foram fotografados (Fig. F, Anexo), tendo a dimensão da postura sido determinada à posteriori, de modo a obter uma estimativa do sucesso reprodutor de cada macho. Para tal recorreu-se ao programa Image J. Para cada imagem foi inicialmente delimitada e em

seguida medida a área total ocupada pelos ovos. De seguida seleccionou-se 3 áreas representativas mais pequenas para contagem do número de ovos. Finalmente o número total de ovos foi estimado pelo produto da relação entre a área total e a média das 3 subáreas pelo número médio de ovos contados nestas sub-áreas. Este método foi calibrado através da comparação com a contagem manual de 8 fotografias, sendo o erro inferior a 10%. A monitorização da temperatura durante a época de campo foi registada a intervalos de 15 minutos através de um ‘data logger’ (Lotech USB-501-LT) encerrado num recipiente estanque e colocado no interior de um dos ninhos.

Análise estatística

A ocupação diferencial pelos machos dos vários ninhos foi avaliada através de uma Análise de Covariância (ANCOVA). Nesta análise a variável dependente foi o número de ninhos ocupados e a variável independente (ou factor) foi o tamanho dos ninhos. Esta variável foi considerada com três níveis (nível 1 - tamanho 1; nível 2 – tamanho 2 e 3 agrupados; nível 3 – tamanho 4 e 5 agrupados). Foi utilizada como co-variável a percentagem de ocupação dos ninhos para controlar o efeito da fase da época de reprodução. Assim uma maior percentagem de ocupação do número total de ninhos será esperada no pico da época de reprodução. A percentagem de ninhos disponível de cada tamanho (consideramos mais uma vez 3 níveis (nível 1 - tamanho 1; nível 2 – tamanho 2 e 3 agrupados; nível 3 – tamanho 4 e 5 agrupados) foi também usada como co-variável uma vez que variou ao longo da época de reprodução. Dado que esta última co-variável teve um efeito não significativo, foi retirada da análise.

Foi também realizada uma ANCOVA para avaliar a relação entre a escolha do tamanho do ninho e o tamanho do ocupante, utilizando as variáveis comprimento total do macho como variável dependente e a dimensão do ninho como factor com três níveis. Usou-se novamente a co-variável percentagem de ocupação dos ninhos para controlar o efeito da fase da época de reprodução. No entanto esta co-variável não apresentou um efeito significativo, pelo que foi retirada da análise. Foi assim realizada uma Análise de Variância (ANOVA), sendo o comprimento total a variável dependente e o tamanho do ninho o preditor. De modo a verificar os pressupostos da homogeneidade de variâncias realizou-se o teste de Hartley & Cochran. A normalidade foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors.

Foi ainda realizada uma análise de correlação (Pearson) para averiguar a existência de uma relação entre o comprimento total do macho e a área do ninho no

sucesso reprodutor (número de ovos). Seguidamente, e uma vez que ambas as variáveis estavam positivamente relacionadas com o número de ovos, efectuou-se uma análise de regressão para testar o efeito do comprimento total do macho e da área do ninho (variáveis independentes) no número de ovos (variável dependente). Através da análise dos resíduos foram verificados os pressupostos da normalidade, da homogeneidade de variâncias e da independência dos erros.

A análise estatística foi efectuada através do programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2005) e PASW 18.0 para Windows.

Resultados

Foram analisados dados relativos a um total de 359 ninhos, cuja variação da ocupação ao longo das 4 quinzenas amostradas pode ser observada no gráfico da Fig. 1. Registou-se um pico de ocupação na primeira quinzena de Junho, sendo as restantes quinzenas relativamente constantes.

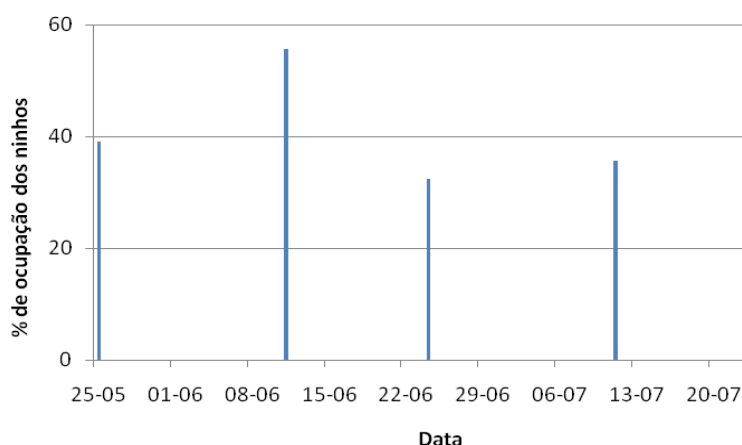


Fig. 1 – Variação da percentagem de ocupação dos ninhos ao longo das quinzenas amostradas, entre 25 de Maio e 26 de Julho de 2010.

Encontraram-se diferenças de ocupação entre as classes de tamanho dos ninhos (ANCOVA, $F_{2,355}=12.81$ $P < 0.001$), sendo os ninhos médios (tamanho 2) os mais ocupados (Figs. 2 e 3).

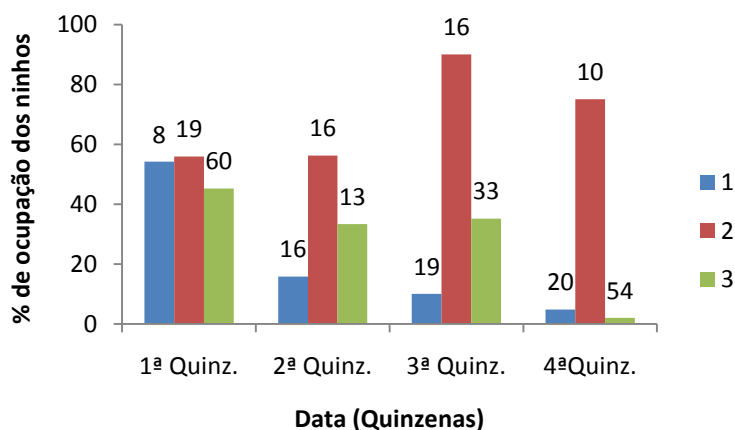


Fig. 2 - Variação da percentagem de ocupação para cada tamanho de ninhos (1- azul, tamanho 1; 2- vermelho, tamanho 2 e 3 agrupado; 3- verde, tamanhos 4 e 5 agrupados) ao longo das quinzenas amostradas. N indicado para cada tipo de ninho em cada quinzena.

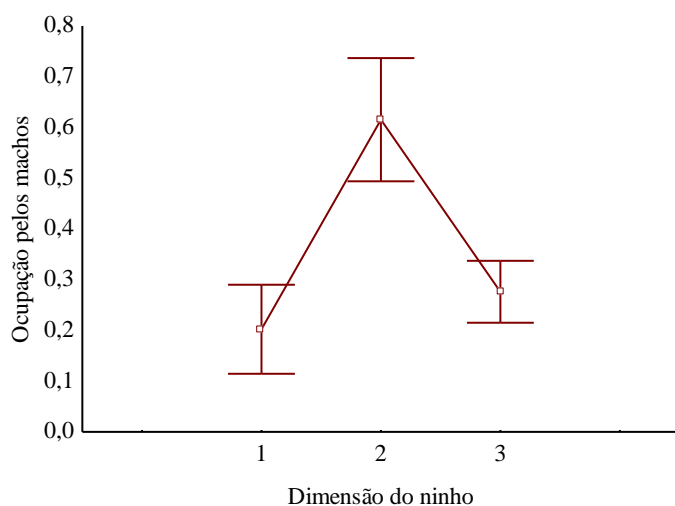


Fig. 3 – Variação de ocupação para os diferentes tamanhos de ninhos (1 – tamanho 1; 2 - tamanho 2 e 3 agrupados; 3 - tamanho 4 e 5 agrupados). Os círculos representam médias ponderadas para a média da covariável: percentagem de ocupação de ninhos. As barras de erro representam intervalos de confiança a 95%.

Observou-se também uma influência significativa da co-variável % de ocupação dos ninhos (ANCOVA, $F_{1,355}=31,87$ $P < 0.001$), que evidencia que a variação de competição por acesso a ninhos associadas à fase da época de reprodução teve um efeito no tamanho de ninho escolhido.

A escolha do tamanho do ninho foi significativamente influenciada pelo comprimento total do macho (ANOVA, $F_{2,112}=34.66$, $P < 0.001$), sendo que machos maiores tenderam a ocupar ninhos também com maiores dimensões, tendo sido observada uma proporcionalidade directa entre o comprimento total do macho e a dimensão do ninho (Fig. 4). Observou-se ainda que os machos intermédios foram os

mais abundantes dos machos que ocuparam os ninhos artificiais ao longo da época de reprodução (Fig. 5).

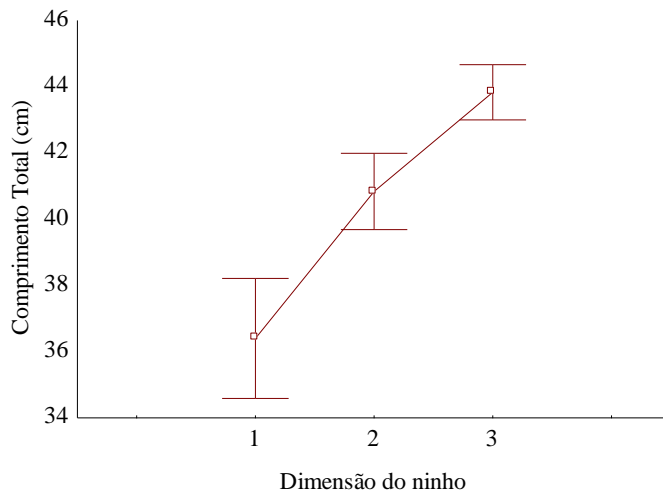


Fig. 4 – Variação da distribuição do comprimento dos machos pelos diferentes tamanhos de ninhos. (1 – tamanho 1; 2 - tamanho 2 e 3 agrupados; 3 - tamanho 4 e 5 agrupados). Os círculos representam médias e as barras de erro intervalos de confiança a 95%.

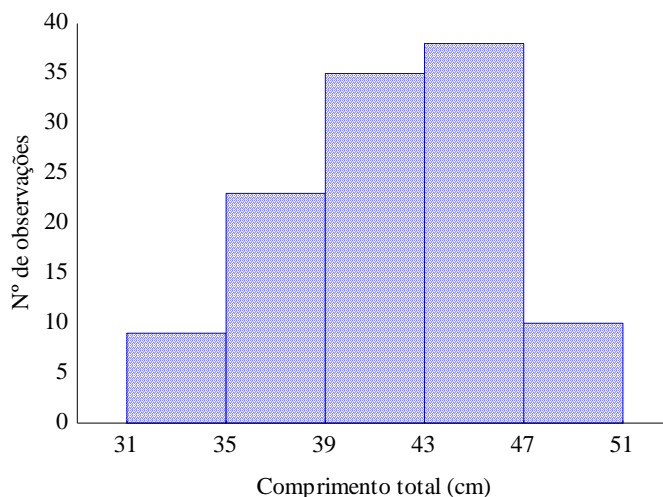


Fig. 5 – Histograma da distribuição das diferentes classes de tamanhos, comprimento total medido em cm.

O sucesso reprodutor, representado pelo número de ovos encontrados em cada ninho, encontrou-se positivamente correlacionado com a área do ninho (Correlação de Pearson, $n=103$, $r=0.27$, $P<0.01$; Fig. 6) e com o tamanho do macho (CT) ($n=103$, $r=0.26$, $P<0.01$; Fig. 7), mas só a área do ninho foi um bom preditor do número de ovos obtidos (Regressão linear, $F_{1,102}=166.87$, $P<0.001$, $R^2= 0.62$; $\log(\text{nº de ovos}) = 7.52 \times \text{área do ninho}$; Fig. 7), uma vez que o CT foi excluído do modelo final. Se considerarmos apenas os casos em que os machos obtiveram ovos verificamos que existe uma relação positiva significativa entre o número de ovos obtidos e o tamanho do

macho (Correlação de Pearson, $n=64$, $r=0.31$, $P<0.05$) mas não com a área do ninho ($n=64$, $r=0.16$, $P>0.05$).

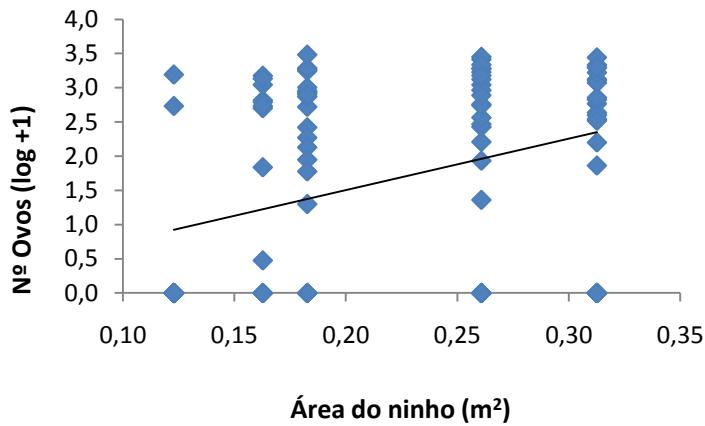


Fig. 6 – Relação entre o número de ovos (log +1) e a área do ninho (m²).

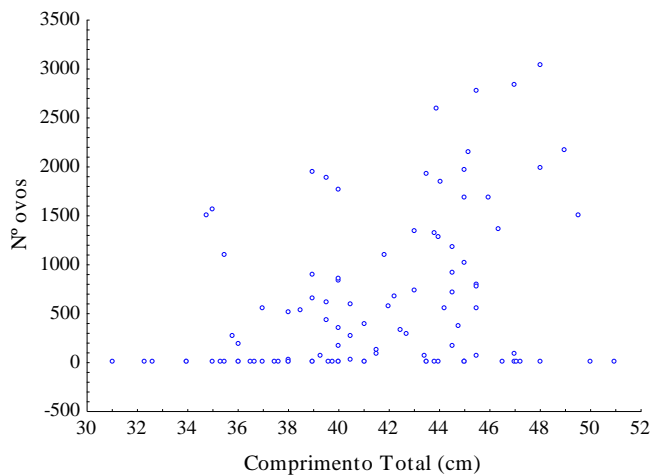


Fig. 7 - Relação entre comprimento total dos machos nidificantes (CT) e o número de ovos obtidos. De notar para os machos com ovos uma relação positiva significativa entre o número de ovos obtidos e o tamanho do macho.

Através das figuras 8 e 9 pode-se também observar a variação do número médio de ovos observado em cada ninho ao longo da época reprodutora, verificando-se uma diminuição considerável das posturas nas últimas quinzenas, indicando o final da época. A figura 10 revela a variação do número de machos com ovos para cada tamanho de ninho ao longo das quinzenas, notando-se um maior número de peixes com ovos nos ninhos maiores (tamanho 3), apresentando os ninhos intermédios (tamanho 2) um número bastante constante, e os ninhos pequenos (tamanho 1) com valores mais reduzidos.

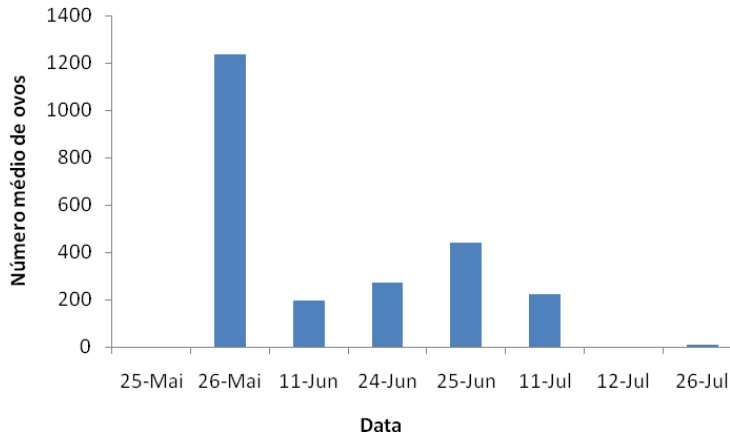


Fig. 8 – Variação do número médio de ovos nos ninhos com posturas ao longo da época reprodutora.

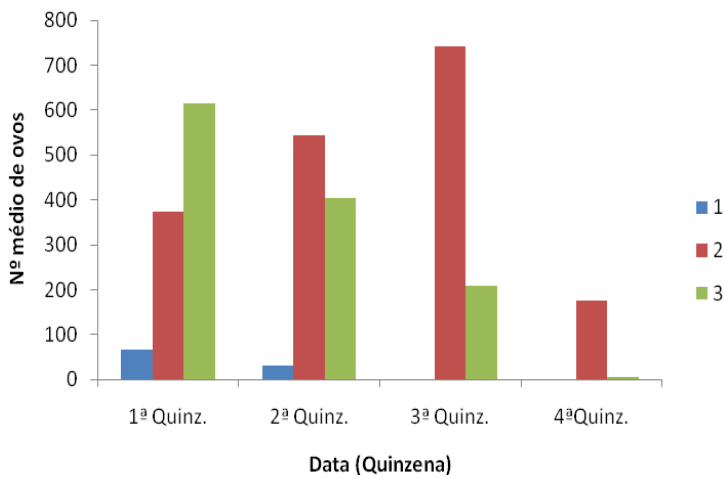


Fig. 9 – Variação do número médio de ovos para cada tamanho de ninho (1-azul, tamanho 1; 2-vermelho, tamanho 2 e 3 agrupados; 3-verde, tamanho 4 e 5 agrupados), ao longo da época reprodutora.

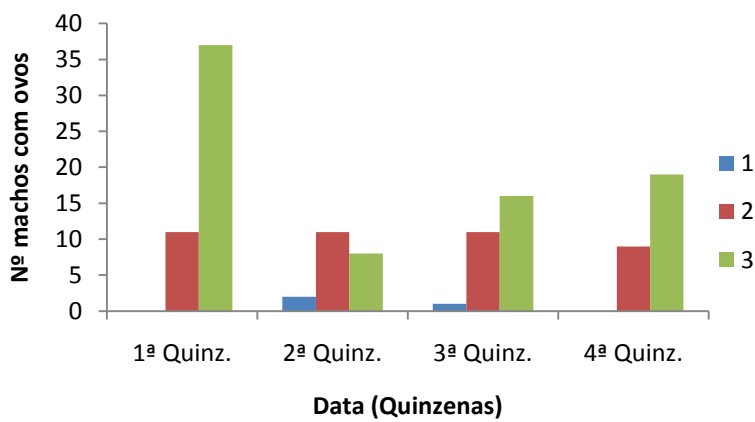


Fig. 10 – Variação do número de machos com ovos, para cada tamanho de ninho (1-azul, tamanho 1; 2-vermelho, tamanho 2 e 3 agrupados; 3-verde, tamanho 4 e 5 agrupados), nas várias quinzenas.

A temperatura média da água variou aproximadamente entre os 18 e os 26°C, tal como se pode observar através da Figura 11.

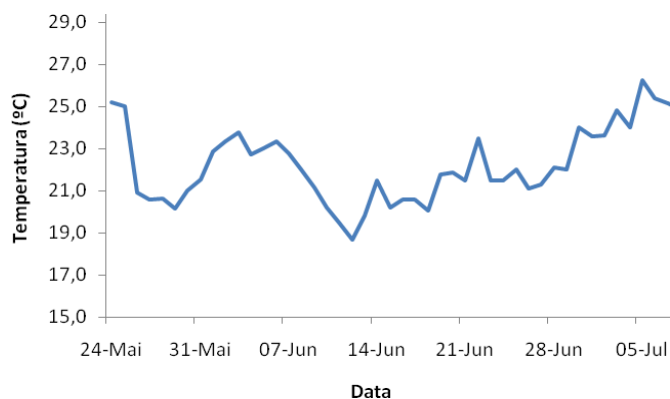


Fig. 11 – Variação da temperatura média ao longo da época reprodutora.

Discussão

Neste trabalho estudou-se as preferências dos machos do xarroco Lusitano pelas dimensões de ninhos ocupados, e a contribuição do tamanho do macho e da área do ninho disponível para a deposição de ovos para o sucesso reprodutor dos machos.

Verificou-se uma relação directa entre o aumento do comprimento do macho e o aumento da dimensão do ninho escolhido, o que indica claramente que machos maiores deverão possuir melhores capacidades para defenderem áreas superiores, tendendo assim a procurar ninhos maiores. Apesar de necessitarem de provavelmente despenderem mais energia na sua defesa, um ninho maior poderá receber um maior número de ovos, traduzindo-se assim num aumento do sucesso reprodutor. A preferência deverá assim representar um compromisso entre a vantagem de um ninho grande o suficiente para acomodar vários ovos e um mais pequeno com menores custos de defesa e manutenção (Kvarnemo, 1995). A ocupação preferencial observada pelos ninhos médios vem traduzir o facto de estes serem os mais adequados às dimensões dos machos amostrados. Em góbios de areia, experiências realizadas em aquários demonstraram que quando a machos de diversos tamanhos lhes era oferecida a escolha entre um ninho de maiores ou menores dimensões, mostraram preferência por ninhos proporcionais à sua dimensão corporal e não pelos maiores ninhos disponíveis (Kvarnemo, 1995). Correlações entre a qualidade do ninho e a qualidade do macho são muitas vezes o resultado da competição entre machos (intra-sexual). Machos maiores

desalojam frequentemente machos de menores dimensões, mesmo em situações em estes já tenham ocupado o ninho, podendo comer os ovos do oponente ou não cuidar deles (Lindstrom, 1992).

Tanto o tamanho do macho como a área do ninho apresentaram uma correlação significativa com o número de ovos obtidos. No entanto, só a área do ninho foi um bom preditor do número de ovos explicando cerca de 60% da variabilidade do tamanho das posturas obtidas pelos machos de xarroco. Estudando só os machos com posturas constatou-se que só o seu comprimento estava correlacionado com o tamanho da postura obtida. Estes resultados sugerem, quer directamente quer indirectamente, por obterem ninhos maiores, que machos com maiores dimensões conseguem obter maiores posturas, o que se deverá traduzir conseqüentemente num maior sucesso reprodutor. Se as fêmeas exibem preferência pelas dimensões do ninho ou pelo tamanho do macho necessita ainda de ser esclarecido. Diversos estudos apontam para que em espécies parentais a qualidade do macho e dos recursos disponíveis deveram influenciar o sucesso reprodutor. DeMartini (1988) observou que o sucesso dos machos de outra espécie de batracoidídeos (*Porichthys notatus*) estaria positivamente correlacionado com a sua dimensão corporal e com a área dos ninhos ocupados por estes. Em várias espécies de peixes com cuidados parentais, recursos como o território ou a disponibilidade dos ninhos são importantes determinantes na escolha das fêmeas e conseqüentemente no sucesso reprodutor dos machos (Lindstrom, 1992).

A dimensão do ninho é um factor limitante no sucesso reprodutor, sendo a competição pelos locais desova conhecida em aves e peixes (Kvarnemo, 1995). Para espécies que ocupam ninhos durante época reprodutora, a área do ninho deverá estar directamente relacionada com o seu fitness, uma vez que a dimensão do substrato deverá limitar o número máximo de ovos que poderá receber (Takahashi *et al.*, 2001). Um importante constrangimento ao número de fêmeas que um macho consegue atrair para acasalar consiste no espaço disponível para colocarem os ovos no ninho, especialmente em espécies em que os ovos são colocados numa única camada (Lindstrom, 1992). Nessas situações a escolha por parte da fêmea tornar-se-á muito difícil, se existirem mais fêmeas para desovarem do que espaço disponível para colocar os ovos, o que resultará na ausência de variância no sucesso reprodutivo dos machos, que consiste num dos pré-requisitos para a selecção sexual poder actuar (Lindstrom, 1992). No entanto, no presente estudo a área dos ninhos nunca foi limitativa pois os ninhos eram observados aproximadamente a cada 15 dias, iniciando-se o processo de

ocupação de ninhos e atracção de fêmeas em cada amostragem. A figura 9 corrobora este facto, uma vez que os ninhos de tamanho maior não apresentaram um número superior de ovos em relação ao ninhos de tamanho médio.

DeMartini (1988) verificou que a área disponível para a desova influenciava significativamente o sucesso reprodutor dos machos, no entanto o tamanho do macho mostrou ter mais influência do que a área do ninho em experiências realizadas em abrigos naturais. A preferência das fêmeas por machos com maiores dimensões tem sido documentada numa variedade de espécies de peixes, sendo claramente um factor que influencia a escolha de parceiros para o acasalamento. Machos maiores deverão ser preferidos devido á sua capacidade para defender recursos importantes para a reprodução, por prestarem melhores cuidados parentais, possuírem maior fertilidade, e ainda por possuírem melhores capacidades de proteger as fêmeas de outros perigos externos (Pollock et al., 2008). Na espécie *Pimephales promelas*, os machos deverão ser melhor sucedidos na defesa dos ovos de potenciais intrusos, aumentando a possibilidade de sobrevivência dos ovos, o que representa um benefício reprodutivo directo para as fêmeas. E se o tamanho for de facto um indicador honesto da produção de esperma, a selectividade das fêmeas deverá estar direccionada para os machos de maiores dimensões, o que resultará num maior sucesso reprodutivo. Ovos que não sejam fertilizados representam um enorme desperdício reprodutivo para as fêmeas uma vez que possuem um elevado custo energético para serem produzidos. Deste modo, se machos mais pequenos forem incapazes de fertilizar posturas inteiras de ovos, a pressão selectiva tenderá a favorecer fêmeas com preferências por machos maiores (Pollock et al., 2008).

A área do ninho revelou explicar aproximadamente 60% do sucesso reprodutor nos machos de xarroco lusitano, o que deverá indicar que outros factores como a qualidade do macho e o seu comportamento deverão ter uma importância significativa, tal como verificado no capítulo anterior, em que se pode constatar que a taxa de canto e o esforço vocal são fundamentais para o sucesso reprodutor dos machos de xarroco. É de salientar que o número de ovos obtidos foi considerado como uma boa medida no sucesso reprodutor. No entanto, não foram contabilizados o número de ovos não fecundados nem o número de ovos fertilizados por outros machos, o que deveria ser abordado em estudos futuros.

Diversos estudos têm sugerido que o xarroco lusitano segue um padrão de migração sazonal ao longo do ano, sendo encontrado principalmente em águas

profundas nos meses de inverno, e realizando uma migração para águas rasas nos meses de verão durante a época reprodutora (Amorim *et al.*, 2010). Amorim *et al.* (2010) observou que a ocupação de abrigos na zona intertidal por esta espécie coincidia com a sua época reprodutora. O padrão de ocupação observado entre Maio e Julho veio corroborar estudos anteriores em que se verificou um pico de ocupação no final de Maio/início de Junho, começando a ocorrer uma diminuição a partir do mês de Julho. Estes resultados também estão de acordo com o padrão de ocupação de abrigos na zona intertidal encontrado noutras espécies de teleósteos com cuidados parentais por parte do macho, tal como góbios e blenídios nas costas temperadas (Almada *et al.*, 1994).

Em batrachoidídeos o período de migração para águas mais rasas pode ser explicado pela maior disponibilidade de substrato adequado para o estabelecimento dos ninhos e pela temperatura adequada ao comportamento reprodutivo e ao desenvolvimento da descendência. A temperatura da água é um dos factores determinantes na reprodução, tanto em *H. didactylus*, como noutros batrachoidídeos, verificando-se que a actividade reprodutora apenas é observada para temperaturas superiores a 18/19 °C (Costa, 2004). Este estudo veio comprovar esse aspecto, uma vez que se observou uma variação aproximada da temperatura média da água entre os 18 e os 26°C, sendo este parâmetro favorável ao sucesso da época reprodutora.

Assim, foi possível concluir com este trabalho que machos maiores escolhem tendencialmente ninhos maiores, proporcionalmente ao seu tamanho e que a área do ninho contribuiu significativamente para o sucesso reprodutor dos machos, conseguindo os residentes de ninhos maiores um maior número de ovos. Uma vez que machos maiores ocupam ninhos com áreas maiores e que neste trabalho a área para deposição dos ovos nunca chegou a ser realmente limitativa, salienta-se a necessidade da realização de estudos adicionais que averiguem o efeito relativo destes dois factores na escolha das fêmeas e que verifiquem o grau de fertilização dos ovos por outros machos.

Referências Bibliográficas

Almada V. C., Gonçalves E. J., Santos A. J., Baptista C. (1994) Breeding ecology and nest aggregations in a population of *Salaria pavo* (Pisces: Bleniidae) in an area where nests sites are very scarce. *Journal of Fish Biology* 45, 819–830.

Amorim M. C. P., Vasconcelos R. O. (2008). Variability in the mating calls of the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*: cues for potential individual recognition. *Journal of Fish Biology* 73, 1267–1283.

Amorim M. C. P., Simões J.M., Mendonça N., Bandarra N. M., Almada V. C., Fonseca P. J. (2010). Lusitanian toadfish song reflects male quality. *The Journal of Experimental Biology* 213, 2997-3004.

Andersson M. (1994). *Sexual selection. Monographs in behavior and ecology.* Princeton University Press.

Bradbury, J. W., Vehrencamp, S. L. (1998). *Principles of Animal Communication.* Sunderland: Sinauer Associates.

Brantley R. K., Bass A. H. (1994). Alternative male spawning tactics and acoustic signals in the plainfin midshipman fish, *Porichthys notatus* (Teleostei, Batrachoididae). *Ethology* 96, 213–232.

Costa J.L. (2004). The biology of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801), and its role in the structuring and functioning of the biological communities; special reference to the Mira estuary population. PhD Dissertation, University of Lisbon.

DeMartini E. E. (1988). Spawning success of the male plainfin midshipman. I. Influences of male body size and area of spawning site. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Vol. 121, pp. 177-192.

DeMartini E.E. (1991). Spawning success of the male plainfin midshipman. II. Substratum as a limiting spatial resource. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Vol 146, pp. 235-251.

Fine M. L., Thorson R. F. (2008) Use of passive acoustics for assessing behavioral interactions in individual toadfish. *Transactions of the American Fish Society* 137, 627—637.

Kvarnemo, C. (1995). Size-assortative nest choice in the absence of competition in males of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. *Environmental Biology of Fishes* 43, 233-239.

Marks E. J., Rodrigo A. G., Brunton D. H. (2009). Ecstatic display calls of the Adélie penguin honestly predict male condition and breeding success. *Behaviour* 147, 165-184.

Lindstrom K. (1992). Female spawning patterns and male mating success in the sand goby *Pomatoschistus minutus*. *Marine Biology* 113, 475-480.

Marconato A., Bisazza A., Marin G. (1989). Correlates of male reproductive success in *Padogobius martensi* (Gobiidae). *Journal of Fish Biology*. 34, 889-899.

Modesto, T. & Canário, A. V. M. (2003). Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *General and Comparative Endocrinology* 131, 220–231.

Myrberg A.A., Lugli M (2006). Reproductive Behavior and Acoustical Interactions. *Communication in Fishes*.

Palazón-Fernández J. L., Arias A. M., Sarasquete C. (2001). Aspects of the reproductive biology of the toadfish, *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Pisces: Batrachoididae). *Scientia Marina* 65, 131–138.

Pollock M. S., Fisher S. E., Squires A. J., Pollock R. J., Chivers D. P., Dubé M. G. (2008). Relative Body Size Influences Breeding Propensity in Fathead Minnows:

Implications for Ecotoxicology Testing Procedure. *Water Quality Research Journal of Canada* Volume 43, No. 4, 257-264.

Roux, C. (1986). Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean, vol. 3. Batrachoididae. In: Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J., Tortonese E. (Eds.). UNESCO, Paris, pp. 1360–1361.

Sisneros J. A., Alderks P. W., Leon K. Sniffen B. (2009). Morphometric changes associated with the reproductive cycle and behaviour of the intertidal-nesting, male plainfin midshipman *Porichthys notatus*. *Journal of Fish Biology* 74, 18–36.

Takahashi D., Kohda M., Yanagisawa Y. (2001). Male–male competition for large nests as a determinant of male mating success in a Japanese stream goby, *Rhinogobius* sp. *DA. Ichthyological Research* 48, 91–95.

Zahavi, A. (1975). Mate selection: a selection for a handicap. *Journal Theoretical Biology* 53, 205-214.

Considerações Finais

Este estudo veio complementar a informação existente na área da comunicação acústica em peixes, mostrando a importância deste meio de comunicação na actividade reprodutora desta espécie. A actividade vocal revelou ser um parâmetro determinante no sucesso reprodutor de *H. didactylus*, explicando 77% da variabilidade do número de ovos obtidos, tendo a influência do comportamento vocal no sucesso reprodutor sido demonstrada pela primeira vez em peixes. Foi também possível compreender o papel da condição física e níveis hormonais no desempenho da actividade vocal. Foi observada uma melhor condição física em machos sem ovos, que deverá revelar um maior dispêndio de energia na manutenção das posturas. Não se observou uma influência significativa dos níveis de androgénios no sucesso reprodutor. O efeito das hormonas em estudo poderá ter sido suprimido pelos níveis de cortisol circulante devido ao stress provocado pelo confinamento nos ninhos experimentais, ou ter ocorrido uma diminuição dos níveis de androgénios durante a fase parental. Por outro lado os níveis hormonais poderão não reflectir os níveis que os animais poderiam ter durante o período de actividade vocal, uma vez que os níveis de androgénios se alteram muito rapidamente. Este primeiro capítulo revelou assim a importância das vocalizações no sucesso reprodutor dos machos.

Factores como o tamanho dos machos e dimensão dos ninhos podem também ter um papel preponderante no sucesso reprodutor em peixes. No entanto, a gama de tamanhos de machos usados na primeira parte do estudo bem como o tamanho dos ninhos, que foram estandardizados, não permitiram retirar conclusões sobre a contribuição conjunta desses factores. A segunda parte deste estudo permitiu então abordar a influência do tamanho dos machos e da área do ninho no seu sucesso reprodutor, tendo demonstrado que a área do ninho contribui significativamente (cerca de 60%) para o número de ovos obtidos. No entanto explica uma percentagem inferior da variabilidade do número de ovos comparado com a actividade vocal (77%) que parece ser o factor com o efeito mais importante no sucesso reprodutor. Estas características deveram assim ter algum impacto na preferência por parte das fêmeas para o acasalamento.

O modelo de estudo utilizado neste trabalho, o xarroco Lusitano é de uma enorme relevância em estudos comportamentais, uma vez que exhibe um repertório acústico extremamente desenvolvido para peixes, é uma espécie muito robusta e de fácil

acesso nas marés baixas. Sendo uma espécie que não se encontra sob ameaça, permite uma manipulação eticamente responsável, de modo a realizar experiências pioneiras na área da bioacústica.

De modo a complementar o trabalho realizado, refere-se a necessidade de obter um número de amostras superior, prolongando o estudo efectuado por mais do que uma época reprodutiva, podendo ainda realizar uma análise detalhada das características dos sons produzidos, permitindo a compreensão da relação das características acústicas com a qualidade do macho e a influência de outros factores na reprodução desta espécie e no sucesso do desenvolvimento da descendência. Estudos futuros deverão também investigar se os níveis de androgénios afectam a actividade vocal e o sucesso reprodutor em animais não confinados. Sugere-se ainda a determinação do número de fêmeas atraídas, como outro tipo de indicador do sucesso reprodutor e um acompanhamento do desenvolvimento dos ovos até à fase de juvenis, podendo ser feita uma análise da mortalidade nas fases mais precoces. A determinação da paternidade poderá ser outro factor importante a avaliar, devido à possível presença de machos parasitas (tipo II), permitindo uma avaliação do sucesso de tácticas de reprodução alternativas.

Referências Bibliográficas

Alcock J. (2009). *Animal Behavior: An Evolutionary Approach*, Ninth Edition. Instructor's Resource Library. 546 pp.

Amorim M. C .P. (2006). Diversity of Sound Production in Fish. *Communication in Fishes*. In Ladich F., Collin S.P., Moller P. and Kapoor B.G. (Eds.) *Fish communication*. Enfield, NH: Science Publishers, pp. 71–105.

Amorim M. C. P., Vasconcelos R. O. (2008). Variability in the mating calls of the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*: cues for potential individual recognition. *Journal of Fish Biology* 73, 1267–1283.

Amorim M.C.P., Simões J.M., Fonseca P.J. (2008a). Acoustic communication in the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*: evidence for an unusual large vocal repertoire. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(5), 1069–1073.

Amorim M. C. P., Simões J. M., Fonseca P.J., Almada, V. C. (2010). Patterns of shelter usage and social aggregation by the vocal Lusitanian toadfish. *Marine Biology* 157, 495–503.

Andersson M. B. (1994). *Sexual Selection*. Princeton N. J.: Princeton University Press. 599 pp.

Barbosa M., Magurran, A. E. (2006). Female mating decisions: maximizing fitness? *Journal of Fish Biology*, 68, 1636–1661.

Bass A. H., McKibben J. R. (2003). Neural mechanisms and behaviors for acoustic communication in teleost fish. *Progress in Neurobiology* 69, 1–26.

Bradbury, J. W., Vehrencamp, S. L. (1998). *Principles of Animal Communication*. Sunderland: Sinauer Associates.

Brantley R.K., Wingfield J.C., Bass A.H. (1993). Hormonal bases for male teleost dimorphisms: sex steroid levels in *Porichthys notatus*, a fish with alternative reproductive tactics. *Hormones and Behaviour* 27, 332–347.

Costa J.L. (2004) The biology of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801), and its role in the structuring and functioning of the biological communities; special reference to the Mira estuary population. PhD Dissertation, University of Lisbon.

Dos Santos M.E., Modesto T., Matos R.J., Grober M.S., Oliveira R.F., Canário A. (2000). Sound production by the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *Bioacoustics The International Journal of Animal Sound and its Recordings*, Vol 11, pp. 309-321.

Fagundes T., Gonçalves D. M., Oliveira R.F. (2007). Female mate choice and mate search tactics in a sex role reversed population of the peacock blenny *Salaria pavo* (Risso, 1810). *Journal of Fish Biology* 71, 77–89.

Griggio M., Serra L., Licheri D., Monti A., Pilastro A. (2007). Armaments and ornaments in the rock sparrow: a possible dual utility of a carotenoid-based feather signal. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61, 423–433.

Gonçalves D. M., Oliveira R.F., Mcgregor P. K. (2008). Communication and the evolution of alternative reproductive tactics. *Alternative Reproductive Tactics*, Ed. Rui F. Oliveira, Michael Taborsky, and H. Jane Brockmann. Published by Cambridge University Press.

Gonçalves-de-Freitas E., Castro A.E.S., Carvalho T.B., Mendonça F.Z. (2009). Sexual Selection and Social Hierarchy in Fishes. *Oecologia Brasiliensis* 13(1), 80-88.

Hawkins A.D., Amorim C. (2000). Spawning sounds of the male haddock, *Melanogrammus aeglefinus*. *Environmental Biology of Fishes* 59, 29–41.

Hawkins A. D., Myrberg A. A. (1983). Hearing and Sound Communication Underwater. Bioacoustics, A Comparative Approach, Ed. by B. Lewis (Academic Press, London), pp. 347–405.

Ladich, F. (2004). Sound production and acoustic communication. In The Senses of Fish Adaptations for the Reception of Natural Stimuli (ed. G. von der Erude, J. Mogdans and B.G. Kapoor), pp. 210–230. New Delhi: Kluwer, Dordrecht and Narosa.

Kasumyan A. O. (2008). Sounds and Sound Production in Fishes. Journal of Ichthyology, Vol. 48, No. 11, pp. 981–1030.

Kasumyan A. O. (2009). Acoustic Signaling in Fish. Journal of Ichthyology, Vol. 49, No. 11, pp. 963–1020.

Knapp R. A., Kovach J. T. (1991). Courtship as an Honest Indicator of Male Parental Quality in the Bicolor Damselfish, *Segastes partitus*. Behavioral Ecology 2, 295–300.

Ladich F., Fine M. L. (2006). Sound-Generating Mechanisms in Fishes: A Unique Diversity in Vertebrates. Communication in Fishes. Section I: Acoustic and Chemical Communication.

Mann D. A., Lobel P. S. (1998). Acoustic Behavior of the Damselfish *Dascyllus albisella*: Behavioral and Geographic Variation. Environmental Biology of Fishes 51, 421–428.

Myrberg Jr A.A., Spanier E., Ha S.J. (1978). Temporal patterning in acoustic communication. In Reese E.S. and Lighter F.J. (Eds) Contrasts in behavior. New York: John Wiley & Sons, pp. 137–179.

Myrberg A. A., Mohler Jr. M., Catala J. C. (1986). Sound production by males of a coral reef fish (*Pomacentrus partitus*): its significance to females. Animal Behaviour 34, 923-933.

McKibben, J.R., Bass, A.H. (1998). Behavioral assessment of acoustic parameters relevant to signal recognition and preference in a vocal fish. *Journal of Acoustical Society of America* 104, 3520–3533.

Modesto, T., Canário, A.V.M., (2003). Hormonal control of swimbladder sonic muscle dimorphism in the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3467-3477.

Modesto, T. & Canário, A.V.M. (2003a). Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *General and Comparative Endocrinology* 131, 220–231.

Myrberg A.A. & Lugli M. (2006). Reproductive Behavior and Acoustical Interactions. *Communication in Fishes*.

Pitcher T.J. (1994). *Behaviour of Teleost Fishes, Second Edition (Fish and Fisheries 7. Series Edition.)*. T.J. Pitcher (Ed.) Chapman & Hall, London. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 126-139.

Remage-Healey L., Bass A. H. (2004). Rapid, Hierarchical Modulation of Vocal Patterning by Steroid Hormones. *The Journal of Neuroscience*, June 30, 24(26):5892–5900.

Remage-Healey L., Bass A.H. (2005) Rapid elevations in both steroid hormones and vocal signaling during playback challenge: a field experiment in Gulf toadfish. *Hormones and Behavior* 47, 297– 305.

Remage-Healey L., Bass A.H. (2006). A rapid neuromodulatory role for steroid hormones in the control of reproductive behavior. *Brain Research* 35778; No. of pages: 9; 4C: 5.

Rose A.F.H., Zeilstra I.,Oliveira R.F. (2003). Mate choice in the Galilee St. Peter’s fish, *Sarotherodon galilaeus*. *Behaviour* 140, 1173-1188.

Rose A.F.H., Fagundes T., Oliveira R. F. (2009). Adjustment of brood size and androgen levels in a teleost species with exclusive male parental care. *Animal Behaviour* 1-9.

Roux, C. (1986). Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean, vol. 3. Batrachoididae. In: Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J., Tortonese E. (Eds.). UNESCO, Paris, pp. 1360–1361.

Sisneros J. A., Forlano P. M., Knapp R., Bass A. H. (2004). Seasonal variation of steroid hormone levels in an intertidal-nesting fish, the vocal plainfin midshipman. *General and Comparative Endocrinology* 136, 101–116.

Oliveira R. F., Canário A.V.M., Grober M.S. (2001). Male Sexual Polymorphism, Alternative Reproductive Tactics, and Androgens in Combtooth Blennies (Pisces: Blenniidae). *Hormones and Behavior* 40, 266–275.

Oliveira R. F., Carneiro L.A., Canario A. V. M., Grober M. S. (2001a). Effects of Androgens on Social Behavior and Morphology of Alternative Reproductive Males of the Azorean Rock-Pool Blenny. *Hormones and Behavior* 39, 157–166.

Oliveira R. F. (2005). Hormones, social context and animal communication. *Animal Communication Networks*, ed. Peter K. McGregor. Published by Cambridge University Press.

Oliveira, R. F., Ros, A. F. H., Gonçalves, D. M. (2005). Intra-sexual variation in male reproduction in teleost fish: a comparative approach. *Hormones and Behavior* 48, 430–439.

Oliveira R.F., Canário A.V.M., Ros A.F.H. (2008). Hormones and alternative reproductive tactics in vertebrates. *Alternative Reproductive Tactics*, Ed. Rui F. Oliveira, Michael Taborsky, and H. Jane Brockmann. Published by Cambridge University Press.

Oliveira R.F. & Gonçalves D.M. (2008). Hormones and Social Behaviour of Teleost Fish. *Fish Behaviour*.

Taborsky M., Oliveira R. F., Brockmann H. J. (2008). *Alternative Reproductive Tactics. An Integrative Approach*. Cambridge.

Vasconcelos, R.O. (2006). Desenvolvimento da comunicação acústica e efeitos do ruído antropogénico no xarroco *Halobatrachus didactylus*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa.

Vasconcelos R. O., Simões J. M., Almada V, C., Fonseca P. J., Amorim M. C. P. (2010). Vocal Behavior During Territorial Intrusions in the Lusitanian Toadfish: Boatwhistles Also Function as Territorial ‘Keep-Out’ Signals. *Ethology* 116, 155–165.

Webb J. F., Fay R. R., Popper A. N. (2008). *Fish Bioacoustics*. Series Editors: Richard R. Fay, Arthur N. Popper. *Springer Handbook of Auditory Research*.

Wysocki L.E., Ladich F., (2005). Effects of noise exposure on click detection and the temporal resolution ability of the goldfish auditory system. *Hearing Research* 201, 27-36.

Wysocki L. E. (2006). Detection of Communication Sounds. *Communication in Fishes*. In Ladich F., Collin S.P., Moller P. and Kapoor B.G. (eds) *Fish communication*. Enfield, NH: Science Publishers, pp. 177–205.

ANEXO



Fig. A – Mapa da área de distribuição do xarroco lusitano, *Halobatrachus didactylus*.

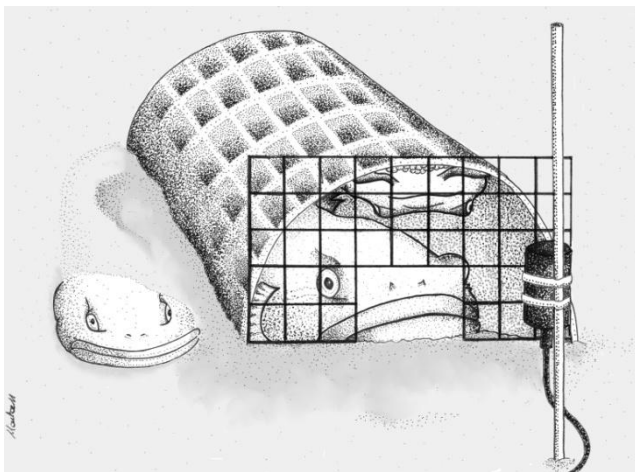


Fig. B – Ilustração do set-up experimental, mostrando um macho de xarroco tipo I dentro do ninho artificial, com uma fêmea depositando ovos e um macho tipo II fora do ninho, encontrado por vezes próximo da entrada. O hidrofone está instalado junto à entrada do ninho para registar a actividade vocal do macho. Ilustração por Marta Bolgan.



Fig C – Área de estudo, Base Aérea do Montijo.



Fig. D – Set-up dos ninhos no estuário.



Fig. E – Recolha de uma amostra de sangue da veia caudal.



Fig. F – Postura de xarroco num dos ninhos amostrados.

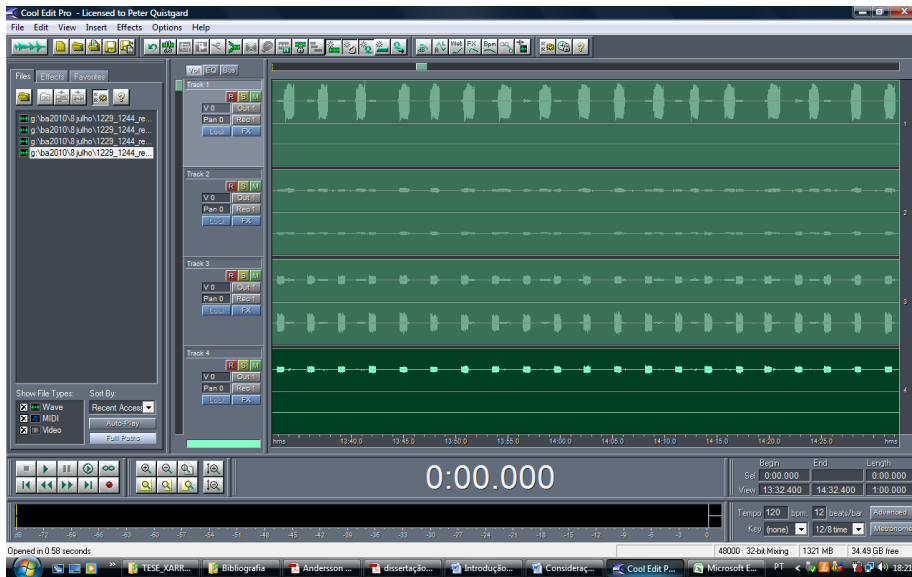


Fig. G - Programa de análise e quantificação dos sinais acústicos (Cool Edit Pro 2.0).



Fig. H – Ninho tamanho 1.



Fig. I – Ninho tamanho 2.

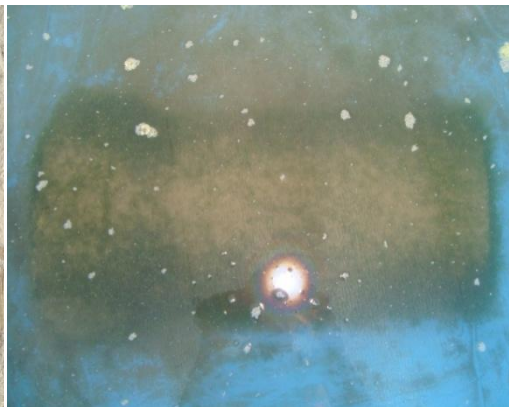


Fig. J – Ninho tamanho 3.

