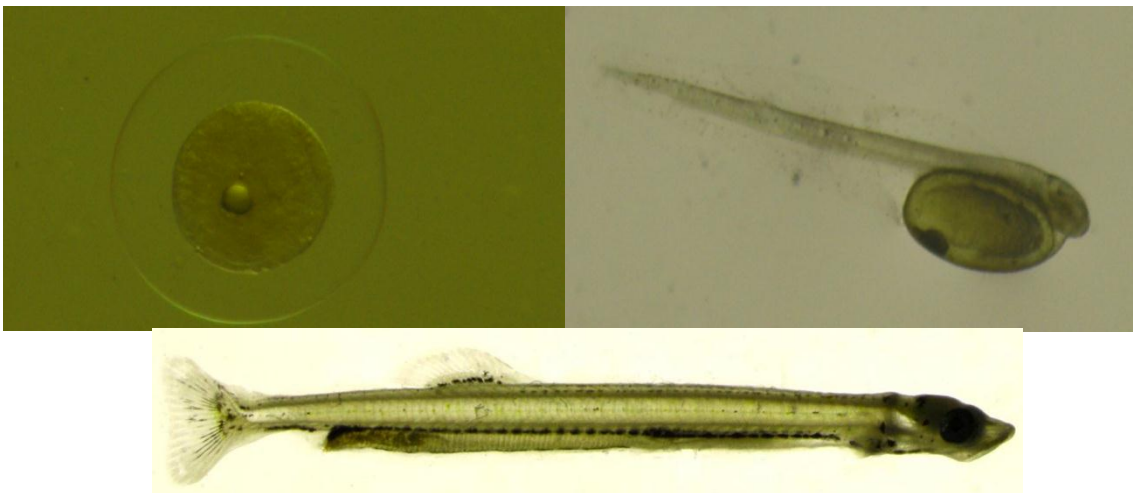




Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Ecologia do recrutamento de pequenos pelágicos:
capacidades natatórias e condição nutricional de larvas
de sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum 1792)**



Luis Miguel Ribeiro da Silva
Tese de Mestrado de Biologia Marinha
Especialização em Ecologia e Conservação
Faro, Setembro 2012



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Ecologia do recrutamento de pequenos pelágicos:
capacidades natatórias e condição nutricional de larvas
de sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum 1792)**

Luis Miguel Ribeiro da Silva

**Tese de Mestrado de Biologia Marinha
Especialização em Ecologia e Conservação**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Alexandra Chícharo, Investigadora

Doutora Susana Garrida, Investigadora Doutora Ana Faria

Faro, Setembro 2012

O conteúdo deste trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor

(Luis Miguel Ribeiro da Silva)

Faro
2012

Fotos da capa:

Ovos e larvas de sardinhas cultivados no Oceanário de Lisboa no âmbito do projeto VITAL.

Agradecimentos

Ao projeto VITAL PTDC/MAR/111304/2009, designado por Taxas vitais de larvas de peixes pelágicos (VITAL) financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia pela oportunidade de trabalhar nesta área de investigação.

Ao Oceanário de Lisboa um agradecimento especial pela cedência do espaço, do material necessário. À Núria pela permissão do uso das instalações, ao Hugo pela disponibilidade e ajuda prestada.

À Professora Doutora Alexandra Chícharo por ter aceitado orientar-me, e possibilitar a aprendizagem do método de estudo dos índices de condição nutricional.

À Doutora Susana Garrido por ter aceitado orientar-me. Pela disponibilidade, pelo apoio e incentivo sempre demonstrado, pela boa disposição e pela aposta no meu trabalho.

À Doutora Ana Faira por ter igualmente aceite orientar-me. Pela disponibilidade e ajuda prestada, pelo ensinamento dos métodos de estudo nesta área ainda pouco explorada que são as velocidades de natação.

Às meninas do projeto VITAL: Ana Rita e Carina Caldeira. Obrigada pela ajuda preciosa ao longo da minha estadia no Oceanário. Também pela boa disposição e transmissão de conhecimento.

À minha família e amigos pelo apoio incondicional. Um agradecimento especial aos meus pais e padrinhos por me ajudarem e incentivarem a trabalhar na área que realmente gosto.

Resumo

As capacidades de natação das larvas de pequenos pelágicos e a sua influência na sobrevivência e dispersão estão pouco estudadas. Pela primeira vez, descreveram-se as capacidades natatórias de larvas de *Sardina pilchardus* (Walbaum 1792), em condições controladas em laboratório desde a eclosão até ao 75º dia pós-eclosão (dpe). Comparou-se a capacidade natatória (velocidade crítica de natação (Ucrit) e comportamento) e a condição nutricional (índice RNA/DNA) de larvas cultivadas com 4 diferentes regimes alimentares. À eclosão, as larvas concentraram-se à superfície e após o 2º dpe começaram a dispersar pela coluna de água. As larvas recém-eclodidas passaram a maior parte do tempo inativas, tendo o tempo dispendido a nadar aumentado com a idade, estabilizando ao 30º dpe, sendo dispendido a totalidade do tempo a nadar. Ao 15º dpe as larvas começaram a resistir a correntes de $1,5 \text{ cm s}^{-1}$ por períodos curtos de tempo. A Ucrit aumentou significativamente ao longo da ontogenia, atingindo um máximo de $9,47 \text{ cm s}^{-1}$ numa larva com 19,1 mm de comprimento total e 55 dpe. Não foram detetadas diferenças significativas das capacidades natatórias entre larvas cultivadas nas diferentes dietas para as idades comuns a todas as dietas. O número de ataques a presas e sequências completas de predação (desde a fixação ao ataque) aumentaram com a idade; ao 25º dpe o número de ataques foi inferior a 2 ataques min^{-1} e ao 60º dpe observaram-se em média $4 (\pm 0,8)$ ataques min^{-1} . O crescimento larvar nas dietas de maior concentração ($0,327 \text{ mm d}^{-1}$) e concentração intermédia ($0,487 \text{ mm d}^{-1}$) não teve diferenças significativas e foi significativamente superior às dietas de menor concentração e plâncton natural que foram semelhantes entre si. A condição larvar foi pouco variável durante a ontogenia, sem diferenças significativas entre as diferentes dietas. Da mesma forma, a relação entre as capacidades natatórias e a condição nutricional das larvas não foi significativa. As conclusões deste trabalho sugerem que numa fase inicial do desenvolvimento as larvas não são capazes de evitar a predação e controlar a dispersão, uma vez que têm reduzidas capacidades natatórias. No entanto, a partir do 45º dpe, as larvas são capazes de resistir às velocidades médias das correntes naturais, o que deverá ter consequências importantes para a sua sobrevivência.

Palavras-chave: Ontogenia, Ucrit, *Sardina pilchardus*, índice RNA/DNA, comportamento alimentar.

Abstract

The swimming abilities of the larvae of small pelagic fishes are poorly studied and little is known of their potential to influence survival and dispersal. For the first time, we studied the swimming capacity of sardine larvae under laboratory conditions from hatching to 75 days post-hatching (dph), reared under 4 different feeding treatments. Recently hatched larvae typically assembled on the water surface and from 2 dph onwards larvae started to migrate through the water column. Recently hatched larvae (1 dph) spent most time inactive; the time spent swimming increased sharply with age until a plateau was reached at 30 dph, when larvae spent all the time swimming. At 15 dph, larvae started to resist currents of 1.5 cm s^{-1} for short periods. The critical swimming speed (U_{crit}) increased significantly during ontogeny, with a maximum U_{crit} of 9.47 cm s^{-1} at 19.1 mm TL and 55 dph. For common ages in all diets, U_{crit} values were not significantly different between diets. Larval attacks on prey and capture success increased with age; larval attacks were less than 2 attacks min^{-1} at 25 dph and an average of $4 (\pm 0.8)$ attacks min^{-1} at 60 dph. No significant differences were obtained in growth rates of higher concentrated diet (0.327 mm d^{-1}) and intermediate concentration (0.487 mm d^{-1}) and these growth rates were significantly different from growth rates of lower concentrated diet and wild plankton diet which were similar. The condition of the larvae was similar during the ontogeny and was not significantly different between diets. The relation between U_{crit} and nutritional condition was also not significant. Our results suggest that early stages of sardine larvae are not able to avoid predation and disperse but close to the metamorphosis, especially from 45 dph onwards, larvae are able to resist the average current velocities of their natural environment and this could have important consequences in larvae survivability.

Key-word: Ontogeny, U_{crit} , *Sardina pilchardus*, RNA/DNA ratio, foraging

Índice

1	Introdução	8
2	Materiais e Métodos	15
2.1	<i>Obtenção das sardinhas e indução da desova</i>	15
2.2	<i>Desenvolvimento larvar: dieta, cultivo</i>	16
2.3	<i>Desenvolvimento morfológico</i>	18
2.4	<i>Padrões de Comportamento (MAPs - Modal action patterns)</i>	19
2.5	<i>Câmara de natação</i>	20
2.6	<i>Velocidade crítica de natação (Ucrit)</i>	21
2.7	<i>Número de Reynolds</i>	22
2.8	<i>Índices de condição</i>	23
2.9	<i>Análise estatística</i>	24
3	Resultados	26
3.1	<i>Transformações morfológicas ao longo da ontogenia</i>	26
3.2	<i>Crescimento larvar</i>	31
3.3	<i>Padrões Comportamentais</i>	34
3.4	<i>Velocidade crítica de natação</i>	38
3.4.1	<i>Velocidades de natação em relação à idade</i>	38
3.4.2	<i>Velocidades de natação em relação ao comprimento larvar</i>	40
3.5	<i>Condição nutricional</i>	44
3.5.1	<i>Índice RNA/DNA e idade das larvas</i>	44
3.5.2	<i>Índice RNA/DNA e Ucrit</i>	47
4	Discussão	49
5	Conclusões	57
6	Referências	59

1 Introdução

Os primeiros estádios do desenvolvimento dos peixes têm sido uma das principais preocupações dos biólogos pesqueiros por serem considerados dos fatores responsáveis pelas flutuações das populações, isto é, são as fases críticas para o recrutamento das espécies (Hjort 1914, Miller et al. 1988). A fase embrionária e larvar são as primeiras fases do desenvolvimento dos peixes e são marcadas por um rápido desenvolvimento durante o qual podem ocorrer grandes mudanças a nível ecológico e comportamental (Fuiman & Higgs 1997). Houde (1989) estimou que apenas cerca de 1% das larvas de peixe chega ao estado juvenil, sugerindo que estas primeiras fases do desenvolvimento são caracterizadas por grandes taxas de mortalidade, tornando a ontogenia das larvas indispensável nos estudos de ictio-ecologia e das pescas. Os estudos pesqueiros dedicados à fase larvar foram um marco determinante no reconhecimento da variabilidade no recrutamento, bem como da dinâmica das espécies (Bailey & Houde 1989, Fogarty et al. 1991). Assim, estudar esta problemática tornou-se indispensável para a percepção das causas e consequências inerentes a esta variabilidade.

Hjort (1914) apresentou a *Hipótese do Período Crítico* na qual propunha que a incidência de inanição aquando do esgotamento do saco vitelino e consequente transição para a alimentação exógena seria o período crítico na ontogenia e apontou este como o principal fator de variabilidade de sucesso no recrutamento (Sinclair 1997). Décadas mais tarde, Cushing (1975) apresentou a *Hipótese da Sincronia*, a qual propunha que a variabilidade do recrutamento está inerente ao sincronismo entre a máxima produção de larvas e os “blooms” de plâncton, isto é, o sincronismo destes dois fatores permitiria uma maior sobrevivência e crescimento larvar, ao invés o não sincronismo representaria maiores taxas de mortalidade (Cushing 1990, Houde 2001). Estas duas teorias baseiam-se na mortalidade causada por inanição e na existência de fatores abióticos que controlam o recrutamento. Legget & Deblois (1994), após revisão dos trabalhos, concluíram não haver suporte para a teoria do *Período Crítico* de Hjort e que, apesar de haver evidência para a *Hipótese da Sincronia* de Cushing, a importância do sincronismo não seria tão grande como era assumido anteriormente.

A integração da mortalidade e crescimento larvar nos estudos levou ao aparecimento de novos modelos para explicar o recrutamento larvar. Nestes modelos, a predação foi ganhando um papel fulcral na mortalidade dos ovos e larvas (Dower et al 1997, Houde 2002). Neste contexto, Miller et al. (1988) destaca a *Hipótese de Quanto*

Maior Melhor em que a predação e inanição surgem interligadas como as principais causas responsáveis pelas reduzidas taxas de sobrevivência das larvas. Esta interação prende-se com a íntima ligação entre a sobrevivência das larvas e a sua capacidade de encontrar, capturar e ingerir o alimento de modo a melhorar a condição física, aumentar o crescimento e evitar a morte por inanição. Assim, as larvas maiores e bem alimentadas poderão conseguir evitar mais eficazmente a predação (Neilson et al. 1986, Miller et al. 1988, Morote et al. 2010). Por sua vez, Houde (1987) destaca a *Hipótese da Duração da Fase Larvar*, em que taxa de crescimento/duração da fase larvar são vistos como fatores chave do recrutamento devido ao facto das primeiras fases serem mais vulneráveis à predação (Hare et al. 1997). Estas duas teorias podem ser inseridas numa hipótese mais abrangente denominada *Hipótese da Predação*.

Outras teorias integram fatores físicos, como é o caso da *Hipótese da Retenção ou do Membro Errante* apresentada por Iles & Sinclair (1982). Neste modelo, em vez de fatores nutricionais são tidos em conta fatores físicos e de circulação, isto é, os locais de desova seriam adaptados a locais de características de hidrodinâmica estáveis e previsíveis de modo a possibilitar a retenção larvar (Iles & Sinclair 1982, Sinclair 1988). Outra teoria recente, apresentada por Bakun (1996), a *Hipótese da Tríade Fundamental* considera os mecanismos de enriquecimento em nutrientes da coluna de água (como o afloramento costeiro ou descargas de rios), a concentração de presas planctónicas e os processos de transporte e retenção das larvas de peixe como os fatores decisivos no sucesso do recrutamento.

Na realidade, verifica-se que todos os processos que ocorrem no decorrer da ontogenia (crescimento, sobrevivência, abundância) estão dependentes da interação de fatores bióticos e abióticos de modo a possibilitar um recrutamento com sucesso. Neste contexto, determinar as causas naturais das flutuações na fase larvar e as suas consequências no recrutamento tornou-se uma área de investigação crucial em Ecologia Marinha. Associada a esta temática, surge uma questão igualmente desafiante e importante para os biólogos: a dispersão larvar e correspondente conectividade entre populações (Warner & Cowen 2002).

Durante muitos anos a fase larvar dos peixes foi considerada como um constituinte passivo do plâncton (revisão em Leis 2006). Nesta perspetiva, o recrutamento de peixes para uma população seria “alimentado” por larvas provenientes de outros locais, num sistema de populações abertas, ligadas pela fase larvar passiva. Esta perspetiva, denominada de *Hipótese Simplista*, assumia que as larvas eram

consideradas partículas passivas e o seu movimento estaria associado às correntes; a única variável biológica que interferia na dispersão seria a duração do período larvar; o comportamento larvar seria igual para todas as espécies independentemente da localização e, por conseguinte, as larvas dispersariam com as correntes até um estado avançado do desenvolvimento (Leis 2006).

Nos últimos anos alguns estudos demonstraram habilidades comportamentais que vieram refutar a teoria simplista acima descrita. Sponaugle et al. (2002) afirmam que o simples movimento vertical das larvas permite aumentar a sua sobrevivência. O comportamento e o posicionamento vertical das larvas na coluna de água começaram a ser vistos como fatores decisivos na dispersão, devido às diferenças existentes nas velocidades nas correntes entre profundidades. Assim, as larvas poderão aproveitar-se destas diferenças e posicionar-se verticalmente de modo a movimentar-se em diferentes direções e velocidades (Sponaugle et al. 2002). Outra revolução neste campo foram os resultados obtidos em estudos com peixes demersais de recife, principalmente larvas de perciformes, que demonstraram capacidades de natação notáveis, quer em termos de velocidade quer em *endurance* (Stobutzki & Bellwood 1994, 1997, Leis & Carson-Ewart, 1997).

As capacidades natatórias são importantes para a sobrevivência larvar na medida em que estas influenciam a capacidade das larvas de evitar a predação e capturar presas (Reidy et al. 2000), controlar padrões de dispersão (Stobutzki & Bellwood 1997), e até mesmo os níveis de autorrecrutamento de algumas populações marinhas (Sponaugle et al. 2002). Para serem consideradas “nadadoras eficientes” as larvas têm que ser capazes de nadar mais rápido que a velocidade da corrente no local (Leis & Stobutzki 1999). Se não forem capazes de nadar mais rápido do que a corrente, as larvas poderão não conseguir influenciar a sua dispersão, a menos que possuam outros mecanismos, como sejam as migrações verticais (Leis 2006).

Existem diversos métodos de estudo das capacidades natatórias das larvas. Entre os mais usados destacam-se a velocidade de rotina, velocidade *in situ*, a velocidade crítica (Ucrit) e a velocidade de *endurance*. De forma a medir a capacidade aeróbia das larvas, os métodos que têm sido mais utilizados são a velocidade crítica de natação (Brett 1964) seguida da *endurance* (Beamish 1978). Estes métodos consistem em expôr as larvas a uma determinada corrente numa câmara de natação construída para o efeito. A velocidade crítica (Ucrit) é um método relativamente fácil e pouco dispendioso que permite medir o desempenho natatório através de incrementos de velocidade até à

exaustão (Plaut 2001). Esta técnica permite assim medir a capacidade aeróbia máxima mantida em pequenos períodos e tem sido usada para verificar a velocidade das larvas em relação a uma panóplia de fatores ecológicos, biológicos e ambientais (Green & Fisher 2004) e também nos potenciais efeitos da natação na dispersão (Stobutzki & Bellwood 1994). Este tipo de medição é importante visto que permite avaliar a capacidade das larvas se moverem entre locais, especialmente em pequenas escalas, ou movimentar-se verticalmente na procura de diferentes correntes ou zonas de alimento (Fisher et al. 2005). Contudo, e apesar de várias espécies terem valores de Ucrit superiores às correntes médias ambientais (Fisher 2005), é improvável que as larvas aguentem o tempo necessário para afetar significativamente o padrão de dispersão. Apesar de não ser diretamente aplicável em situações de campo e os valores de Ucrit serem, segundo Leis (2006), certamente superiores às velocidades no campo, a Ucrit é uma importante ferramenta na comparação entre taxas ou estados de desenvolvimento larvar. Os peixes, ectotermicos, pelo que as suas células musculares funcionam melhor a temperaturas mais altas (Hunt von Herbing 2002). Contudo a temperatura da água não influencia apenas o funcionamento muscular do peixe, mas influencia igualmente a viscosidade da água, isto é a viscosidade da água aumenta com a diminuição da temperatura (Leis 2006). Segundo Webb and Weihs (1986), os peixes conseguem nadar mais eficientemente em meios inertes do que viscosos em termos da hidronamismo tendo as larvas que ter maiores comprimentos ou maiores velocidades para atingir meios inertes. Assim, ao longo da ontogenia, as diferenças no comprimento larvar influenciam as velocidades de natação através da exposição da larva a diferentes regimes de hidrodinamismo. O método de medição do índice das forças de viscosidade ou inertes às quais as larvas estão sujeitas é o número de Reynolds (Re). Este método é vastamente utilizado para caracterizar as diferentes condições de hidrodinamismo (Leis 2006).

A descrição e quantificação do comportamento alimentar é igualmente um passo importante para compreender como as larvas serão capazes de alimentar-se com sucesso (Chesney 2008) e assim evitar a inanição. Helfman (1994) dividiu este comportamento alimentar em cinco atividades diferentes: procura, encontro, perseguição, ataque e captura. Consoante o tipo de procura, os predadores podem ser classificados em predadores ativos ou de emboscada ou uma alternância dos dois perante a densidade de alimento ou do comprimento larvar (Helfman 1994). Estes tipos de predadores diferem perante a opção de um movimento constante pelo ambiente e conseqüente procura (predadores ativos) ou por longos períodos parados à espera que a presa entre no seu

campo de visão (predadores de emboscada) (Hunt von Herbing & Gallager 2000). Esta procura também pode estar associada a um comportamento de pausa-viagem, durante a qual os predadores param durante um determinado tempo com o intuito de procurar presas; se a procura não for bem-sucedida, a larva movimenta-se e volta a parar para procurar (O'Brien et al. 1989). Após o avistamento da presa, a larva direciona a cabeça para a presa e contrai o corpo em forma de "S", mantendo sempre a presa fixa e alinhada com a cabeça. As barbatanas peitorais ajudam a larva a corrigir pequenas variações da posição da presa e de modo a possibilitar o ataque que levará a sua ingestão (Hunter, 1972).

A condição nutricional das larvas de peixes varia em relação a fatores bióticos e abióticos e influencia diretamente a sobrevivência larvar (Chícharo et al. 1998). No contexto das capacidades natatórias das larvas surge uma questão importante: será a condição nutricional importante no desempenho natatório? A condição nutricional pode ser estimada por uma variedade de índices que podem ser morfométricos, bioquímicos, histológicos ou de crescimento estimado através da análise de otólitos. O Índice RNA/DNA é um dos índices bioquímicos mais utilizados em estudo nutricionais e de crescimento larvar (Chícharo 1998, Chícharo & Chícharo 2008). Este método baseia-se no pressuposto de que a quantidade de DNA por célula é estável enquanto o RNA varia consoante a idade e as condições ambientais (Chícharo 1998). Este índice é suscetível a mudanças ambientais que afetam fisiologicamente o organismo, como a baixa disponibilidade de alimento (Chícharo & Chícharo 1995, Chícharo & Chícharo 2008).

Alguns estudos indicam que uma boa condição larvar está relacionada com maior crescimento e aumento de recrutamento e sobrevivência juvenil (Sponaugle et al. 2006) tendo sido verificado que em algumas espécies (arenque, pescada, bacalhau, linguado, biqueirão) as larvas em inanição são mais suscetíveis à predação (Bailey 1984; Neilson et al. 1986). Mesmo sendo um dos principais comportamentos larvares, são poucos os estudos que têm tentado relacionar a condição larvar com a natação. Nos estudos que ambicionaram este objetivo verificou-se que larvas em boas condições nutricionais possuem melhores capacidades natatórias e conseguem evitar melhor os predadores que as larvas em pior condição (Chick & Van den Avyle 2000, Faria et al 2011a)

Os pequenos pelágicos, como a sardinha, são peixes de extrema importância nas capturas pesqueiras, principalmente nos sistemas costeiros sujeitos a fenómenos de afloramento (Chícharo, 1998) bem como nas teias alimentares, sendo a presa principal de outros peixes, mamíferos e aves (Anonymous (1997) in Bellier et al 2007). A desova

nos peixes pelágicos geralmente é feita em áreas em que existem concentrações de alimento favoráveis às larvas e junto à costa, de modo a permitir a retenção e minimizar o transporte para longe da costa (Parrish et al. 1981 in Ramzi et al. 2006). Contudo, o recrutamento dos *stocks* dos pequenos pelágicos apresenta uma variabilidade enorme, tendo efeitos nas capturas pesqueiras (Lluch-Belda et al. 1989), pelo que o estudo da fase larvar tornou-se indispensável.

A sardinha (*Sardina pilchardus*; Walbaum, 1792) apresenta uma ampla distribuição, podendo ser encontrada na plataforma do Atlântico Nordeste desde a Mauritânia até ao Canal Inglês (Parrish et al. 1989). A desova da sardinha em Portugal atinge o pico entre novembro e abril em zonas de afloramento costeiro (Figueiredo & Santos 1989; Ré et al. 1990; Santos et al. 2004) ocorrendo ao longo da plataforma continental e a temperaturas entre os 12 e os 17 °C (Bernal et al., 2007). No que diz respeito à alimentação, as larvas de sardinha são predadoras visuais. A sua principal fonte de alimento é zooplâncton (Morote et al. 2010), tendo sido descrito para algumas espécies uma alimentação unicamente baseada em copépodes, sendo ingeridas as diferentes fases dos mesmos (ovo, náuplio, copépodito e adulto) ao longo do crescimento larvar (Morote et al. 2010). Se numa fase inicial a alimentação é baseada em ciliados e náuplios de copépodes, nas fases larvares mais avançadas há preferência por náuplios e copépoditos de copépodes (Morote et al. 2010). Santos et al (2006) apontam a íntima ligação entre a sobrevivência larvar e os processos oceanográficos (condicionantes do transporte e da dispersão) como um fator preponderante para a variabilidade do recrutamento. Os mesmos autores, através do estudo das capacidades de migração vertical das larvas das sardinhas ao largo de Aveiro, verificaram que as maiores concentrações de larvas ocorreram entre os 10-25 metros durante o dia, enquanto à noite tendem a ocupar camadas superiores (5-10 m). Santos et al. (2006) referem ainda que a capacidade das larvas fazerem migrações verticais é um dos principais fatores que influencia o recrutamento e respetiva retenção/dispersão larvar desta espécie. Contudo, e apesar da ligação às hipóteses de recrutamento (período crítico, sincronia) anteriormente referidas, pouco se sabe sobre os comportamentos natatórios das larvas desta espécie, pelo que a retenção ou a dispersão larvar têm sido relacionadas com o vento e as correntes (Santos et al. 2004). Os estudos comportamentais das larvas de clupeídeos, ao contrário do que tem sido feito para os perciformes, envolvem essencialmente o estudo do comportamento alimentar, daí a necessidade emergente de estudar as capacidades natatórias.

A realização deste trabalho visa melhorar o conhecimento sobre os processos que determinam a sobrevivência e dispersão das fases iniciais de pequenos pelágicos ao longo da ontogenia. Para tal foram analisadas as capacidades natatórias de larvas de sardinha mantidas no Oceanário de Lisboa durante o processo de desenvolvimento larvar, bem como o sucesso alimentar e condição nutricional através do índice RNA/DNA. O objetivo principal desta trabalho prende-se com a necessidade de compreender se as larvas de sardinha, para além de serem capazes de realizar migrações verticais tal como descrito anteriormente, conseguem ter capacidades natatórias passíveis de contrariar as correntes bem como evitar mais eficazmente a predação e capturar presas. Em particular, os objetivos específicos são: caracterizar as transformações morfológicas ao longo da ontogenia, em particular as relacionadas com as capacidades natatórias, como o aparecimento das barbatanas e flexão da notocorda; determinar a velocidade de natação crítica (U_{crit}) das larvas ao longo da sua ontogenia; caracterizar qualitativamente o comportamento das larvas ao longo do desenvolvimento, tal como o seu posicionamento na coluna de água e comportamento predatório; relacionar as capacidades natatórias de larvas sujeitas a diferentes dietas alimentares com a sua condição nutricional, estimada pelo índice RNA/DNA.

O presente trabalho integrou-se no projeto VITAL - Taxas vitais de larvas de peixes pelágicos, PTDC/MAR/111304/2009, que tem como objetivo obter taxas vitais das larvas de *Sardina pilchardus* e de *Engraulis encrasicolus* em função da variação de fatores físicos e biológicos responsáveis pelo crescimento e sobrevivência. Deste modo, será possível esclarecer a incerteza quanto às capacidades natatórias e assim permitir melhorar o conhecimento sobre o recrutamento bem como fornecer dados comportamentais relevantes para os modelos de dispersão/retenção das larvas de sardinha.

2 Materiais e Métodos

2.1 Obtenção das sardinhas e indução da desova

As larvas estudadas neste trabalho foram obtidas através da reprodução de sardinhas adultas em cativeiro. As sardinhas adultas foram capturadas recorrendo à pesca do cerco em duas saídas de mar (junho de 2009 e julho de 2010) que ocorreram ao largo de Peniche. Foram capturadas 289 sardinhas no total, as quais foram devidamente aclimatizadas num tanque cilíndrico de volume 15000 L no Oceanário de Lisboa (ODL). O abastecimento deste tanque é feito por água salgada produzida no ODL, sendo um sistema fechado. O tanque tem filtração mecânica, química e biológica. A filtração mecânica é efetuada através do uso de um filtro de areia, a filtração química através de um acumulador de proteínas com injeção de ozono de 6m³ e a filtração biológica feita com o auxílio de biobolas. O tanque possui também dois “skimmers” em lados opostos e uma sucção de fundo para retirar a sujidade da superfície e do fundo, respetivamente, bem como duas entradas de água (superfície e fundo) e ainda arejamento na zona central.

Para obter larvas induziu-se a desova das sardinhas, aproximando as condições do tanque às condições em meio natural da desova (baixando a temperatura e aumentando a quantidade de alimento). As sardinhas adultas foram alimentadas diariamente, exceto ao domingo, recorrendo a ração e a uma mistura picada (camarão, mexilhão, berbigão e camarinha). Diariamente verificaram-se os coletores de ovos e retiraram-se do tanque de modo a permitir a recolha dos ovos, sempre que presentes. As recolhas foram feitas para um copo de 5L com o auxílio de uma mangueira com água salgada e seguidamente deixado a repousar para que possíveis impurezas se depositassem no fundo. Depois de 10 a 15 minutos de repouso, a água superficial do copo foi crivada com um crivo de 500 µm. Após observação do crivo, os ovos eram retirados do crivo com água salgada filtrada para uma câmara de contagem ou para um goblet (no caso da amostra ser grande, ±2000, procedia-se à contagem de uma subamostra). Em amostras com contagens de ovos superiores a 1000, iniciava-se uma experiência de crescimento larvar, colocando os ovos a incubar a 15°C, com arejamento, e com um fotoperíodo idêntico ao das sardinhas adultas (7:30 - 16:00). O volume onde foram incubados dependeu do número de ovos: quando o número de ovos foi inferior a 2000 ovos, foram postos a incubar num tanque de 30 litros; quando superior, foram colocados em tanques de 50

litros, para tentar obter uma concentração de ovos semelhantes para todas as experiências. De cada postura foram guardados 10 ovos em formaldeído e cerca de 100 ovos em azoto líquido para posterior análise morfométrica e bioquímica.

2.2 Desenvolvimento larvar: dieta, cultivo

De forma a testar a influência da condição nutricional nas capacidades natatórias das larvas foram mantidos 8 tanques larvares diferentes, correspondentes a 2 réplicas de 4 dietas alimentares diferentes à temperatura de 15°C (Fig.1).

Os grupos A, B e C apresentaram uma dieta composta pelas mesmas presas, diferindo apenas na concentração de alimento no tanque, de modo a comparar os respetivos crescimentos e desempenho natatório. O grupo D, por sua vez, foi alimentado com plâncton natural, tendo este sido recolhido em redor do ODL e em Sesimbra com a ajuda de uma rede WP2 de 55 µm.

Em ambos os grupos foi introduzido o dinoflagelado *Gymnodinium* sp. no L0 (dia da eclosão) de modo a estar disponível mal as larvas abrissem a boca, visto que este dinoflagelado é de reduzida dimensão, adequando-se assim ao tamanho da boca das larvas recém-eclodidas. Foi igualmente seguido o método da “água verde”, em que se adicionou diariamente a microalga *Nanochloropsis* spp. aos tanques, de forma a alimentar e melhorar a qualidade nutricional das presas (rotíferos e náuplios) das larvas de sardinha.

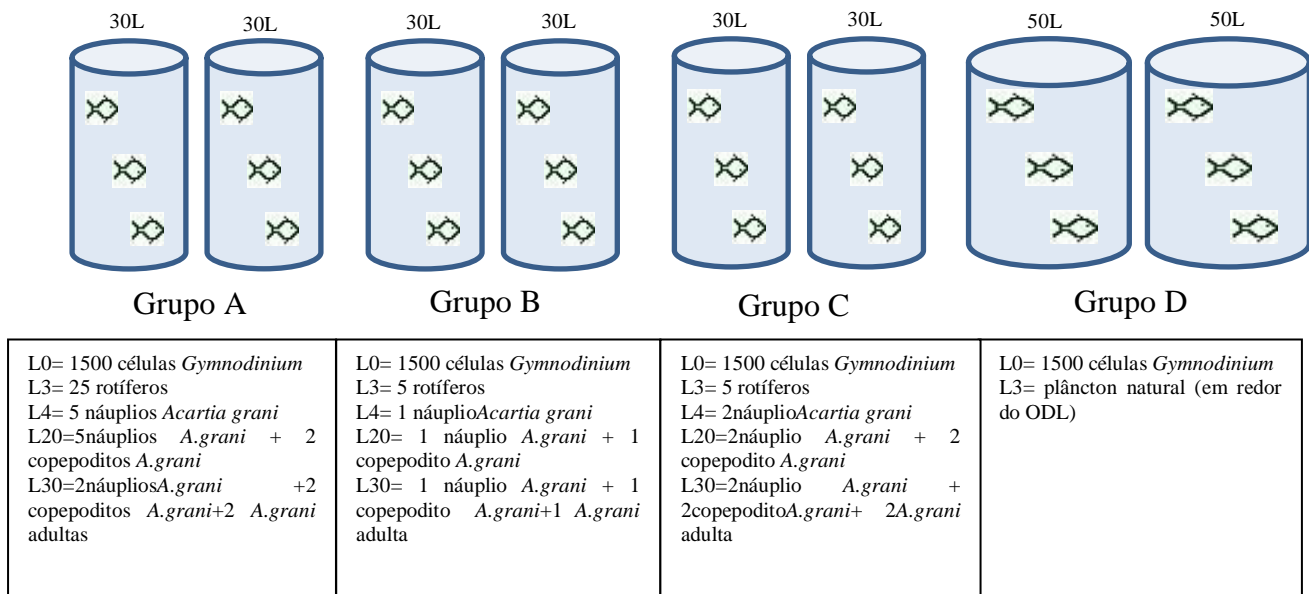


Figura 1 – Esquema dos tanques de crescimento larvar e respetivo regime alimentar (em nº presas ml⁻¹). L0, L3... refere-se à idade das larvas em dias pós-eclosão.

As amostragens para medições de comprimento, natação e rna/dna das larvas, dos grupos A, B e C e do grupo D foram feitas de acordo com as figuras 2 e 3, respetivamente.

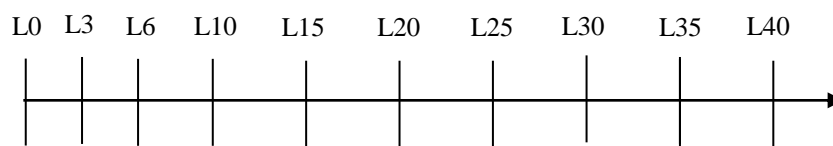


Figura 2. Esquema das amostragens realizadas às larvas dos grupos A, B e C. L0, L3... refere-se à idade das larvas em dias pós-eclosão.

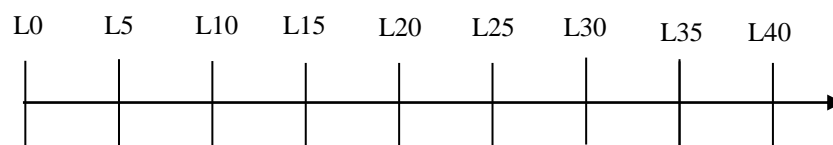


Figura 3 - Esquema das amostragens a realizar para as larvas do grupo D. L0, L3... refere-se à idade das larvas em dias pós-eclosão.

2.3 Desenvolvimento morfológico

Os ovos e larvas de todas as experiências e previamente armazenadas em formaldeído foram observados e fotografados num microscópio estereoscópico (Leica S8 APO com zoom 8:1) com o auxílio de uma máquina fotográfica (Canon EOS SLR 550). Seguidamente, as fotografias foram analisadas usando o programa informático (Image J software) para melhor identificar alterações morfológicas nas larvas bem como permitir uma análise morfométrica das larvas. As medições incidiram em algumas características essenciais desta fase do ciclo de vida dos peixes, como sejam: comprimento total, comprimento e área do saco vitelino (quando presente), área da gota lipídica, diâmetro do olho (se pigmentado), espessura da zona final da cabeça e da zona final da anal (Fig. 4 e 5). As alterações morfológicas identificadas foram inseridas numa tabela de cronologia e comparadas com as velocidades de natação das larvas para esse determinado dia.

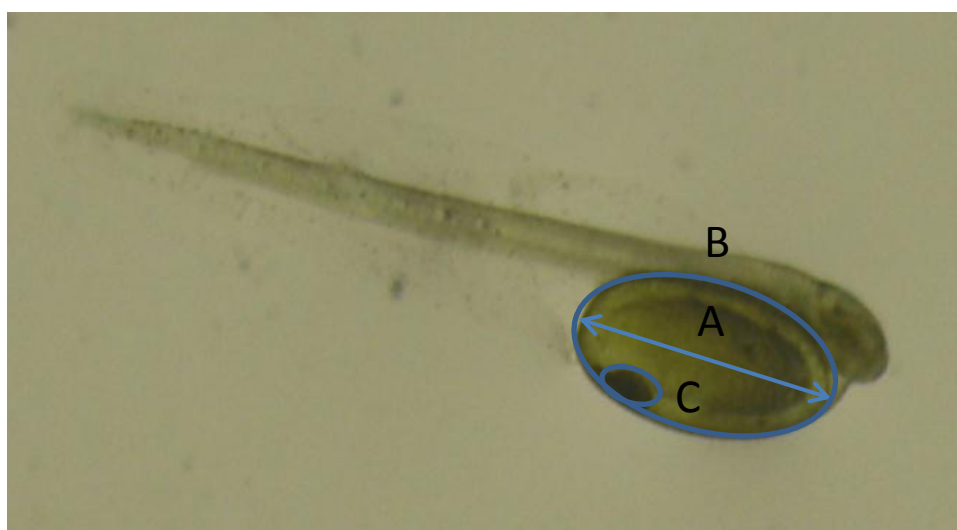


Figura 4. Larva de sardinha recém-eclodida. A- Comprimento do saco vitelino, B- Área do saco vitelino, C- Área da gota lipídica

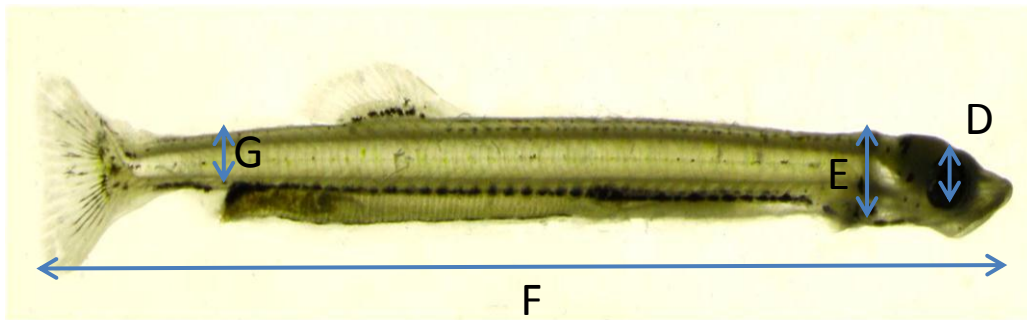


Figura 5. Larva de sardinha com 54 dias pós-eclosão. D- Diâmetro do olho; E- Espessura da zona final da cabeça, F-Comprimento total da larva; G- Espessura da zona final da anal;

2.4 Padrões de Comportamento (MAPs - Modal action patterns)

Os padrões comportamentais de locomoção e alimentação das larvas foram observados e registados ao longo da ontogenia. Os comportamentos registados, foram adaptados de Barlow (1968) e descritos na Tabela 1. O método envolve observações diárias de uma larva selecionada aleatoriamente e o registo do tempo (locomoção e pausa) e/ou a frequência de determinado comportamento durante 1 minuto. O procedimento foi repetido em cada dia experimental para um máximo de 5 larvas e um mínimo de 2 larvas desde a eclosão até ao dia 75 pós eclosão. Entre as idades 44 e 56 não se registou o comportamento das larvas por motivos logísticos. Foram apenas registado os comportamentos para as dietas de maior concentração alimentar (grupo A e C) devido a apresentarem valores de crescimento próximos da natureza.

Tabela 1 - Padrões Compartamentais (adaptado de Barlow 1968)

	<i>Definição</i>
Locomoção	
• Nadar	Movimento da larva pela coluna de água
• Pausa-viagem	Movimentos curtos à procura de presa
Não-direcionado	
• Pausa	Larva sem movimento e estável na coluna de água
• Afunda	Larva sem movimento e a descer na coluna de água
Alimentação	
• Orientação	Larva direcionada para a presa
• Fixação	Larva imóvel e corpo em “S”
• Investida	Movimento em direção da presa

2.5 Câmara de natação

Para medir a velocidade crítica de natação das larvas de sardinha ao longo da ontogenia foi utilizada uma câmara de natação semelhante à descrita em Stobutzki & Bellwood (1994, 1997) e Faria *et al.* (2009). A câmara é feita de acrílico com uma tampa amovível de modo a permitir a colocação de larvas nas 6 pistas existentes. Cada pista mede 30 mm de largura, 50 mm de altura e 180 mm de comprimento. Em ambas as extremidades das pistas foi colocada uma rede de malhagem 0.5 mm para permitir a retenção das larvas na pista, tendo sido igualmente colocada na extremidade superior uma secção de palhinhas de 40 mm de comprimento de modo a minimizar a turbulência em cada pista e assegurar um fluxo laminar.

O fluxo de água foi assegurado por um sistema fechado, no qual se usou uma bomba submersível colocada num tanque de abastecimento com cerca de 50L de água. Este tanque foi instalado 70 cm abaixo da camara de natação, que apoiada numa superfície plana permitia o retorno da água ao tanque de abastecimento. De modo a controlar a velocidade da água na câmara, existe uma válvula posicionada entre a bomba e extremidade anterior da câmara. Na válvula está inserido um parafuso, bem

como uma placa de acrílico, para que a cada ângulo de abertura corresponda um determinado fluxo da água nas pistas da câmara (Fig.6). A calibração foi efetuada calculando o tempo que o fluxo de saída de água da câmara demorou a encher um balde de 5 L, dividido pela área da secção transversal e o número de pistas. A média de 3 calibrações para cada ângulo foi usada como a velocidade da corrente de água para esse mesmo ângulo. A câmara permitiu atingir fluxos de água até 20 cm s^{-1} .

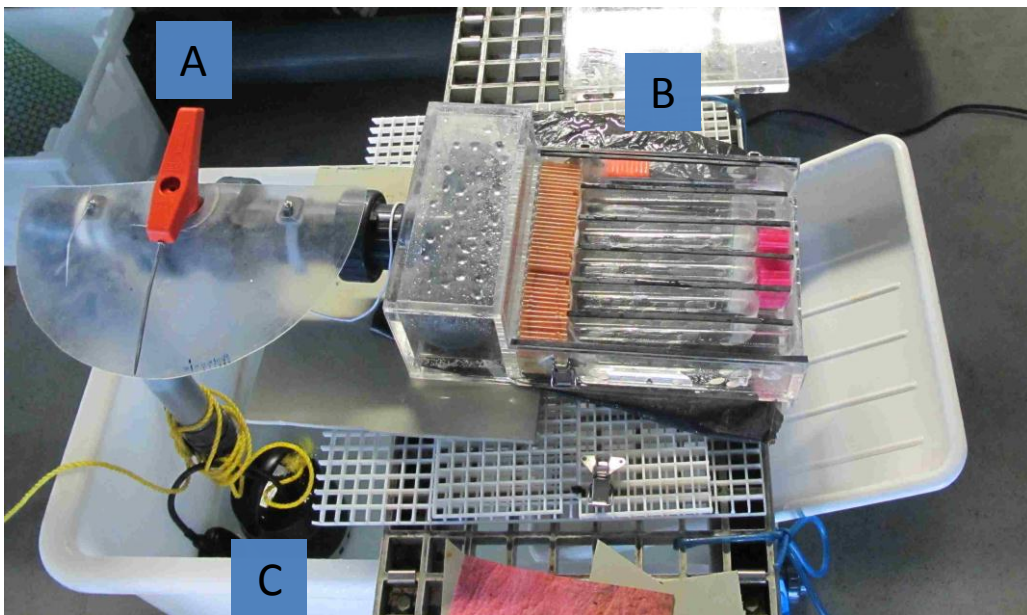


Figura 6. Câmara de natação e respetivo sistema de circulação de água. A- Válvula com calibração do fluxo; B- Câmara de natação; C- Bomba de circulação de água submersível.

2.6 Velocidade crítica de natação (U_{crit})

Ao longo da ontogenia das larvas de sardinha estimou-se a velocidade crítica de natação das larvas, ou seja, a corrente máxima que eram capazes de resistir a nadar. Em cada dia de experiências de medição da velocidade crítica (Fig. 2 e 3), foram utilizadas 3 a 5 larvas para testar na câmara de natação.

Imediatamente antes do início das experiências, o tanque de abastecimento foi cheio com água proveniente do tanque das sardinhas, de forma a que a temperatura (15°C) e salinidade (35) durante o teste correspondesse às condições de cultivo. Como

as experiências são relativamente rápidas, a temperatura não sofreu alterações significativas no decurso das mesmas.

As larvas foram retiradas do tanque de crescimento com a ajuda de um tubo e vareta por sucção, e deixadas a repousar num *goblet* durante poucos minutos. As larvas foram testadas individualmente, para não correr o risco de perder as larvas de vista, principalmente nos primeiros dias de vida em que não têm pigmentação e são praticamente transparentes. Cada larva foi sujeita a um período de aclimatização de 5 minutos a uma velocidade mínima de 1.5 cm s^{-1} , tendo sido substituída por outra larva sempre que apresentasse algum sinal de *stress* (comportamentos natatórios errónios, como por exemplo a larva nadar de lado, ou encostar-se às redes da pista).

Após o período de aclimatização e de modo a medir a U_{crit} , a velocidade do fluxo foi aumentada aproximadamente 1 cm s^{-1} ($\pm 0,2$) a cada 2 min até a larva não conseguir resistir à corrente. A U_{crit} foi calculada através da fórmula de Bret (1964):

$$U_{crit} = U + (t/t_i \cdot U_i),$$

em que U , representa a velocidade do penúltimo incremento; U_i , corresponde ao incremento de velocidade (1 cm s^{-1}); t , o tempo nadado no último incremento de velocidade; t_i , o tempo de intervalo entre cada incremento de velocidade (2 min). Por fim, após os testes de natação, mediu-se o comprimento total das larvas em vivo e em seguida foram colocadas em azoto líquido para futuras análises de condição nutricional.

2.7 Número de Reynolds

O número de Reynolds (Re) (Webb & Weihs 1986) permite determinar o tipo de ambiente hidrodinâmico em que as larvas nadam: se em ambiente viscoso ($Re < 300$) ou inerte ($Re > 1000$) (Leis 2006). O Re foi calculado para todas as larvas utilizando a seguinte fórmula:

$$Re = U \times TL/v,$$

em que o U , representa a velocidade crítica; v , a viscosidade da água do mar (viscosidade da água do mar a 15°C); TL , o comprimento da larva (Webb & Weihs 1986).

2.8 Índices de condição

Nos dias de amostragem (Figs. 2 e 3) foram preservadas larvas em azoto líquido de forma a determinar posteriormente a sua condição nutricional através do índice RNA/DNA. Todas as larvas testadas na câmara de natação foram preservadas individualmente para este fim. A análise dos ácidos nucleicos baseou-se no método descrito em Caldarone et al. (2001). Os protocolos para determinação e quantificação dos ácidos nucleicos basearam-se na utilização de corantes fluorescentes que se ligam seletivamente ao DNA e ao RNA (Caldarone et al. 2006).

Os ácidos nucleicos foram analisados em “pools” para idades até 15dpe e individualmente após os 15 dpe. Para tal, as larvas foram colocados num eppendorf ao qual se adicionaram 100 µl de solução tampão Sarcosina-Tris (STB) a (0.5%). De modo a homogeneizar as amostras usou-se um sonicador com pulsos de 40 A durante 30 segundos. Seguidamente as amostras foram colocadas no vórtex durante 30 minutos e depois centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos.

Ao mesmo tempo que as amostras foram centrifugadas, os poços da microplaca foram preenchidos com as amostras padrão para determinar as retas de calibração de RNA e DNA, onde foram usados os volumes de 0, 5, 7.5, 10 e 20 µl de solução stock destes ácidos nucleicos. Após a centrifugação, adicionaram-se 25 µl de sobrenadante de cada amostra e 45 µl de Tris-EDTA aos respetivos poços da microplaca. Posteriormente, 15 µl de Gel Red (fluoróforo) foram adicionados a cada poço, incluindo os das retas de calibração, e ainda 15 µl de RNase aos poços da reta de calibração do DNA.

A leitura da fluorescência foi feita pela excitação a 365nm e emissão a 590nm no leitor Synergy HT de microplacas. Seguidamente, adicionaram-se 15µl de RNase a todos os poços com amostra e as microplacas foram colocados numa estufa durante 30 minutos a 37°C. Após o arrefecimento à temperatura ambiente, foi lida novamente a fluorescência das amostras. Finalmente, foram adicionados 7.5µl de DNase em cada poço com amostra e após agitação a amostra foi novamente colocada na estufa durante 1 hora e feita nova leitura da microplaca, para verificar a presença ou não de mais alguma substância que provocasse fluorescência.

Para estandardizar os resultados foi usada a variabilidade do declive das retas padrão DNA e RNA, a média desta reta foi de 2.84 ($\pm 0,20$) que pode ser usado para

comparar os resultados da razão RNA/DNA (declive 2,40) determinados por outros protocolos (Caldarone et al., 2006).

O número de larvas cuja condição nutricional foi analisada em termos do índice RNA/DNA dependeu da sobrevivência larvar nas diferentes dietas bem como da variância entre replicados, os valores dos replicados das concentrações de RNA e DNA usados correponderam aqueles cujo coeficiente de variação não ultrapassou os 30%.

De forma a calcular o limite mínimo para o qual as larvas são tidas como em má condição nutricional foi usada a forma proposta por Buckley (2008) :

$$sRD \text{ crit} = 0,078 / (0,0145 + 0,0044 T),$$

em que o T é a temperatura a que as larvas são cultivadas (15°C)

2.9 Análise estatística

De forma a investigar o efeito da dieta no crescimento larvar, foi realizada uma regressão múltipla do logaritmo do comprimento total das larvas em função da idade (variável contínua) e da dieta (variável fatorial, com quatro fatores correspondentes às dietas A, B, C, D descritas acima). Como a sobrevivência larvar foi diferente nas experiências correspondentes às diferentes dietas, esta análise foi feita apenas para o período comum a todas as dietas (<26dpe).

Foram realizadas regressões lineares simples para averiguar a influência da idade e comprimento total na capacidade natatória das larvas cultivadas com as diferentes dietas. Para analisar se as diferentes dietas influenciaram as velocidades de natação, realizou-se uma regressão múltipla da velocidade de natação em função da idade e da dieta. De igual modo esta análise foi feita para o período comum a todas as dietas (<26dpe).

De forma a investigar o efeito da dieta na condição nutricional, foi realizada uma regressão múltipla da condição nutricional das larvas em função da idade (variável contínua) e da dieta (variável fatorial, com quatro fatores correspondentes às dietas A, B, C, D descritas acima). Como a sobrevivência larvar foi diferente nas experiências correspondentes às diferentes dietas, esta comparação foi feita apenas para o período comum a todas as dietas (<26dpe).

Para investigar o efeito da condição nutricional nas capacidades natatórias das larvas, foi realizada uma regressão múltipla da Ucrit em função da idade e da condição nutricional, e também, noutra regressão, em função do comprimento e da condição nutricional. A comparação restringiu-se também ao período comum a todas as dietas (<26dpe).

No tratamento dos dados foi usado o programa estatístico “R” e o Excel.

3 Resultados

3.1 Transformações morfológicas ao longo da ontogenia

Com o fim da fase ovular que durou até 73 horas na temperatura selecionada para todas as experiências (15°C), as larvas eclodiram com um saco vitelino de modo a permitir uma alimentação endógena durante os primeiros dias, nos quais a larva ainda não tinha a boca aberta, nem os olhos pigmentados, nem o sistema digestivo totalmente formado. No dia da eclosão, o comprimento médio das larvas foi de 4,05 ($\pm 0,3731$) mm. Nesta idade foi observado um saco vitelino de grandes dimensões, com uma área média de 0,49 ($\pm 0,0615$) mm² (Fig.7).

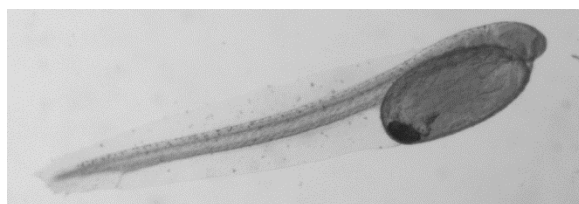


Figura 7 - Larva no dia da eclosão, não pigmentada, com saco vitelino e gota lipídica bem visíveis.

Na seguinte idade analisada, 3 dias pós-eclosão (dpe), era já visível a abertura da boca das larvas bem como a pigmentação do olho e ainda, apesar de pequeno, o saco vitelino. Nesta idade o comprimento médio das larvas foi de 5,40 ($\pm 0,1732$) mm e o saco vitelino com uma área de 0,08 ($\pm 0,021285$) mm² (Fig.8).

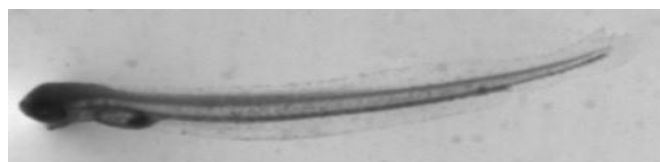


Figura 8 - Larva com 3 dpe: com pigmentação no olho e com a boca já aberta. Visível ainda o saco vitelino e a gota lipídica.

Ao 10º dia pós-eclosão, a média de comprimento foi de 6,00 ($\pm 0,44$) mm e nesta idade foi possível observar as barbatanas peitorais e o início da barbatana caudal (Fig.9).



Figura 9 - Larva com 10 dpe: com barbatanas peitorais e início da formação da barbatana caudal.

Ao 15º dia pós-eclosão, a barbatana caudal já era bem visível, bem como a flexão da notocorda. Para esta idade (15dpe) as larvas apresentaram um comprimento médio de 7,53 ($\pm 1,22$) mm (Fig.10).

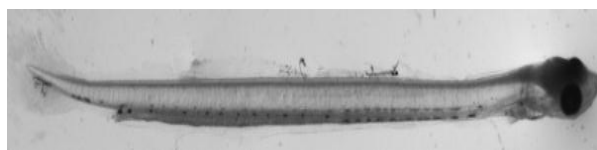


Figura 10 - Larva com 15 dpe: com barbatanas peitorais e início da formação da barbatana caudal.

No dia 20 pós-eclosão, as larvas apresentaram um comprimento médio de 10,28 ($\pm 1,34$) mm. Nesta idade a barbatana caudal já é mais visível, sendo já possível ver os raios da barbatana já diferenciados, bem como a flexão da notocorda. É igualmente nesta idade que a barbatana dorsal começa a ser observada (fig.11).

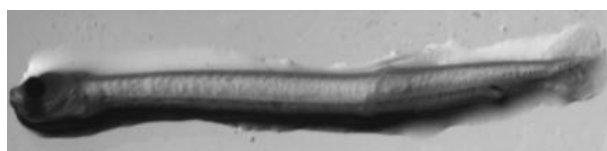


Figura 11 - Larva com 20 dpe: barbatana caudal mais desenvolvida e barbatana dorsal a formar-se.

Ao dia 25 pós-eclosão a barbatana dorsal já é bastante visível e as larvas apresentaram uma média de 12,00 ($\pm 2,01$) mm de comprimento. A barbatana dorsal aparece totalmente visível ao 30º dia pós-eclosão, idade em que a média de comprimento larvar foi de 13,47($\pm 1,55$) mm. O desenvolvimento da barbatana caudal encontra-se quase completo, (Fig.12).

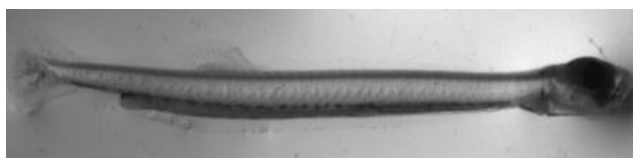


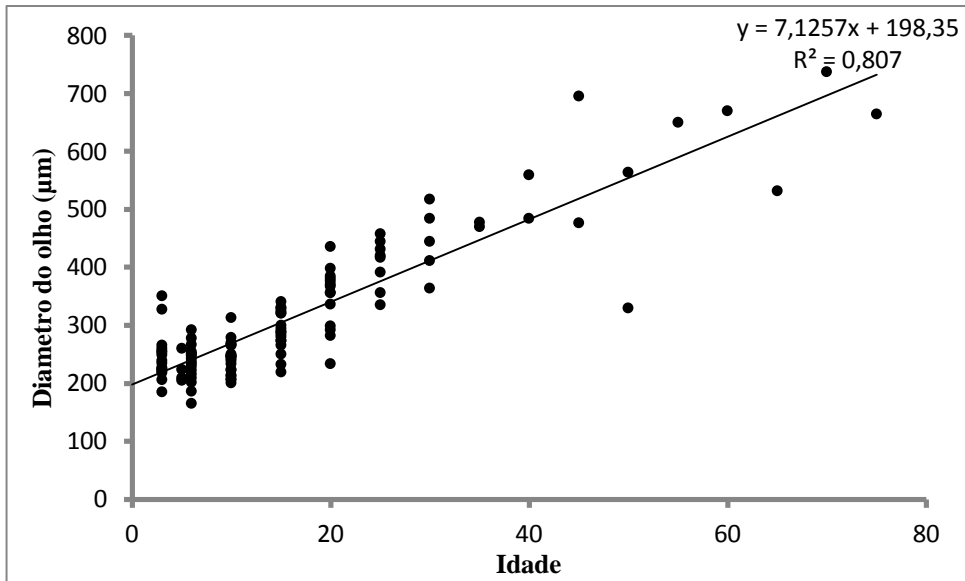
Figura 12 - Larva com 30 dpe: barbatana dorsal totalmente formada.

Ao 35º dia pós-eclosão as larvas apresentaram um comprimento médio de 14,43 ($\pm 3,14$) mm e foi visualizada pela primeira vez a barbatana anal, sendo totalmente visível 5 dias depois (40º dia pós-eclosão) (Fig.13). Nesta idade a barbatana caudal encontra-se totalmente formada.



Figura 13 - Larva com 40 dpe: com barbatana anal

O diâmetro médio do olho aquando da sua pigmentação (3 dpe) foi de 246,73 ($\pm 43,45$) μm . Durante a ontogenia o diâmetro do olho aumentou a uma taxa 7,13 $\mu\text{m dia}^{-1}$ e foi verificado um máximo de 737,5 μm na larva de 70 dias pós-eclosão (Fig.14).



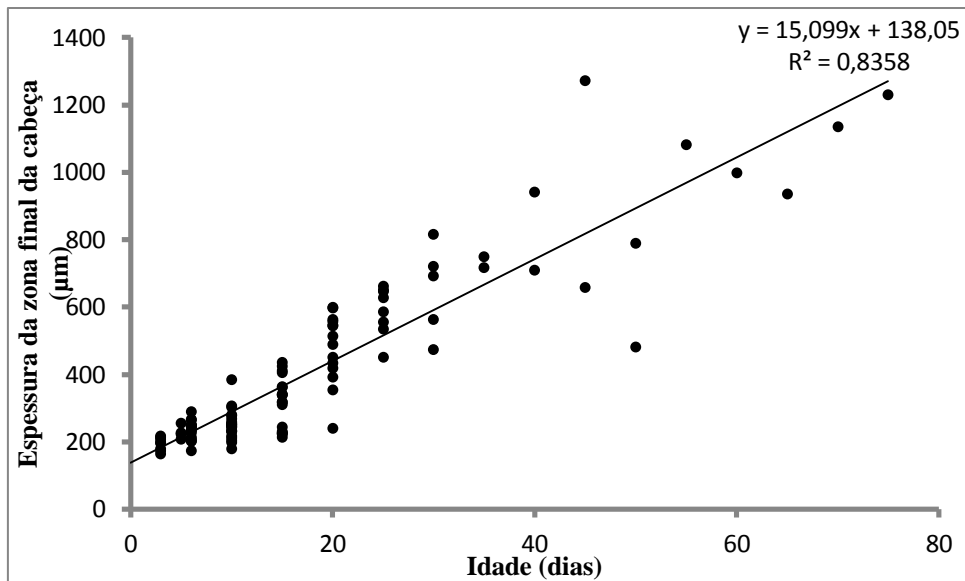


Figura 16 – Espessura da zona final da cabeça ao longo da ontogenia

As dimensões da zona final da cabeça aumentaram com o aumento do comprimento larvar. Numa fase inicial, o aumento da zona final da cabeça foi de 0,04 mm a cada mm de comprimento crescido pela larva. Este crescimento da zona final sofreu um aumento para 0,06 mm a cada mm de comprimento total coincidindo com o início e aumento da capacidade natatória da larva (comprimento total <8 mm).

A zona final da anal também aumentou com o aumento do comprimento larvar. Nesta medição o aumento no período em que as larvas não resistiram a correntes foi de 0,38 mm por mm de comprimento larvar. No período após o início da resistência aumentou para uma taxa de 0,59 mm a cada mm que a larva cresce em comprimento (fig.17).

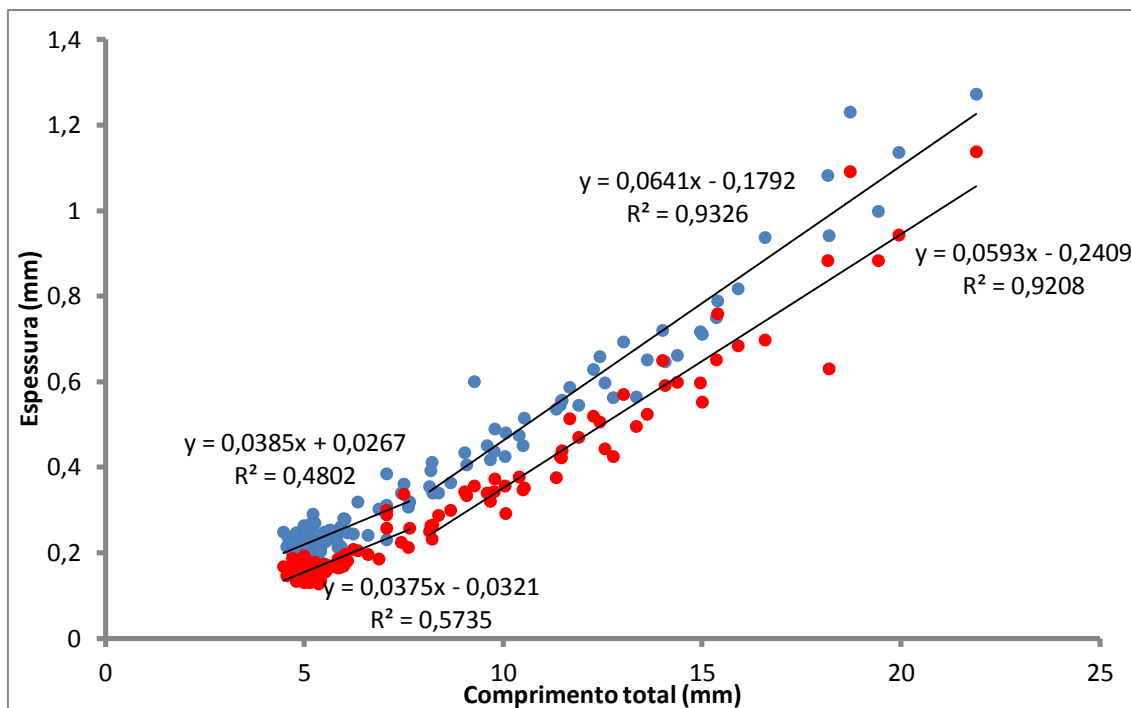


Figura 17 – Espessura da zona final da cabeça ao longo da ontogenia (vermelho) e espessura da zona final da anal (azul) em função do crescimento larvar.

3.2 Crescimento larvar

O comprimento larvar aumentou ao longo da ontogenia. Na dieta de maior concentração (grupo A) a taxa de crescimento foi de $0,327 \text{ mm d}^{-1}$. Nesta dieta foi atingido um máximo de comprimento de 23,4 mm ao dia 65 pós-eclosão. Para o grupo C, dieta de concentração intermédia, a taxa de crescimento foi de $0,487 \text{ mm d}^{-1}$ tendo a larva maior atingido 22,2 mm de comprimento ao 45 dpe. Nas dietas de menor concentração (grupo B) e de plâncton natural (grupo D) as larvas de sardinha obtiveram uma taxa de crescimento de $0,287$ e $0,240 \text{ mm d}^{-1}$ para um comprimento máximo de 13,90 (30 dpe) e 13,20 (25 dpe) mm respetivamente (fig.18).

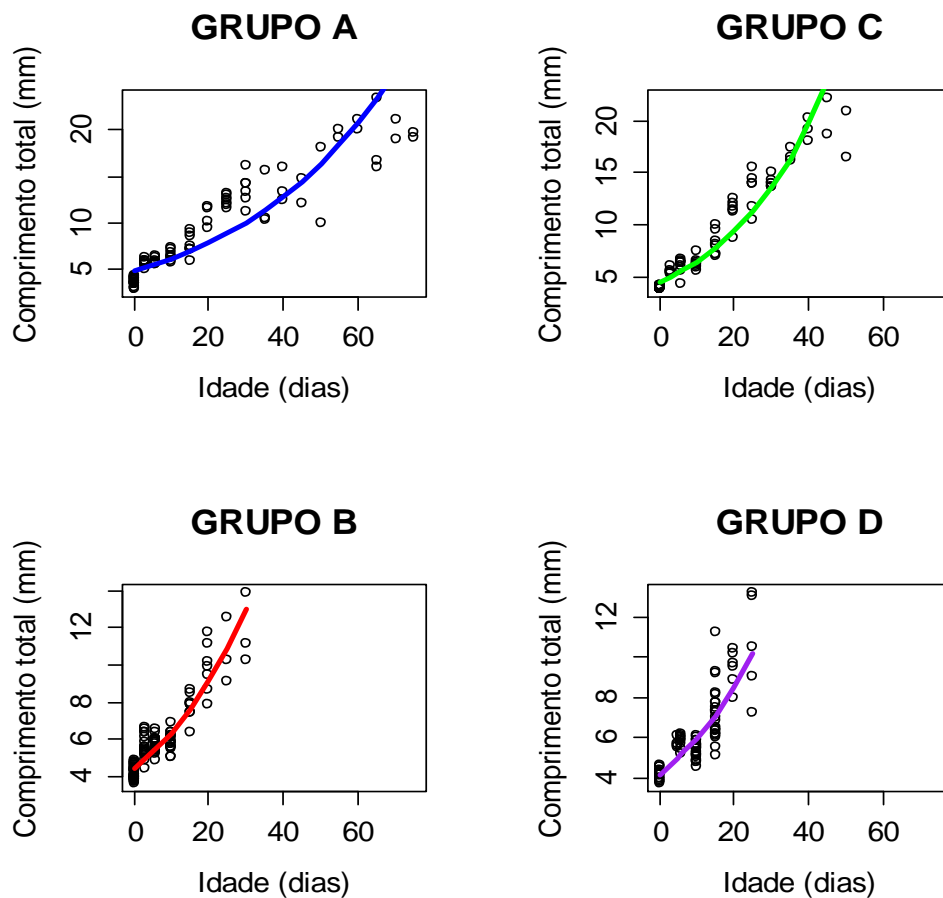


Figura 18 - Comprimento larvar ao longo da ontogenia para as diferentes dietas.

Foi igualmente verificado que as larvas que cresceram com maior concentração de alimento conseguiram sobreviver durante mais tempo que as dos restantes tratamentos. Neste tratamento (grupo A) as larvas sobreviveram até aos 75 dias pós-eclosão, enquanto nos restantes tratamentos com concentração intermédia, pequena e plâncton natural apenas sobreviveram até aos dias 50, 30 e 25, respetivamente (fig.18).

Foram analisadas as taxas de crescimento das larvas de sardinha correspondentes às idades comuns a todos as experiências. Para o período entre a eclosão e o 25dpe a taxa de crescimento para a dieta de maior concentração (grupo A) foi de $0,350 \text{ mm d}^{-1}$; para a dieta de concentração intermédia de $0,378 \text{ mm d}^{-1}$; para a dieta de menor concentração $0,266 \text{ mm d}^{-1}$, e para a dieta de plâncton natural $0,240 \text{ mm d}^{-1}$. Foi verificada que a dieta de menor concentração (grupo B) foi significativamente diferente da dieta de maior concentração (grupo A) e da dieta de concentração intermédia, mas

não diferiu da dieta de plâncton natural (grupo D). Não foram verificadas diferenças entre as dietas de maior concentração (grupo A e C) (fig.19 e tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros da regressão múltipla do logaritmo do comprimento total em função da dieta e a idade larvar.

	Estimativa	Des.padrão	t	P (> t)
Grupo A	-0,0073185	0.0204763	-0,357	0,721
Grupo B	0,0415209	0.0009727	42,687	2e-16
Grupo C	0,0168479	0.0210525	0,800	0,424
Grupo D	-0,0864234	0.0190339	-4,541	7,87e-06

$R^2 = 0,8496$

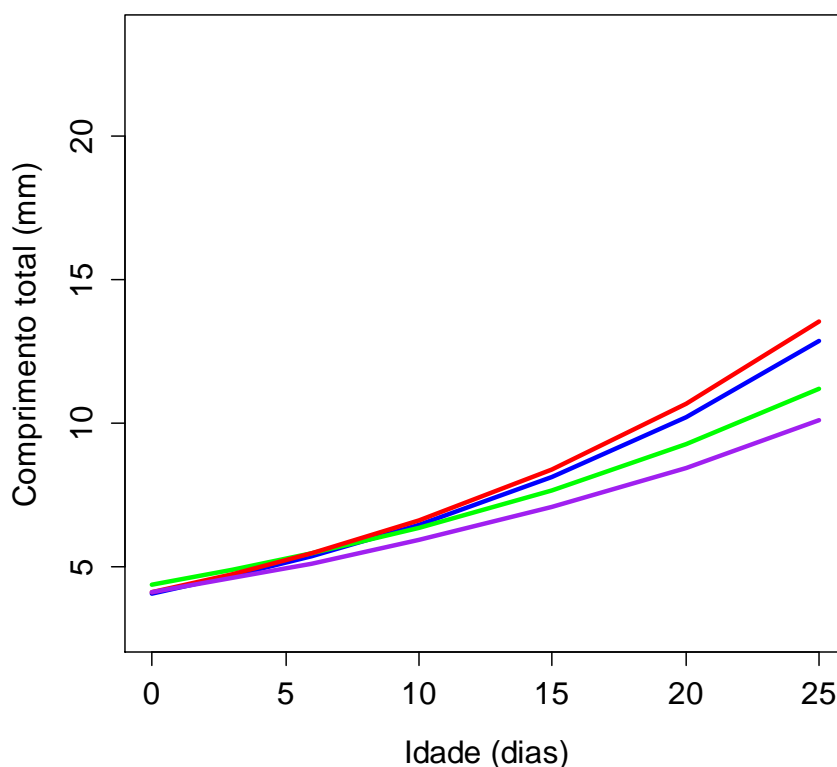


Figura 19 - Comprimento larvar nas idades comuns a todas as dietas (0-25 dias). Cor azul corresponde à dieta de maior concentração (grupo A); a cor vermelha à dieta de concentração intermédia (grupo C); a cor verde à dieta de menor concentração (grupo B); a cor roxa à dieta de plâncton natural.

3.3 Padrões Comportamentais

O comportamento larvar sofreu alterações significativas durante a ontogenia. No dia da eclosão verificou-se que as larvas se encontravam todas à superfície e aí permaneciam até ao dia seguinte (1 dpe). Após este dia as larvas começam a afundar e a distribuir-se em toda a coluna de água. No 4º dia pós-eclosão as larvas encontravam-se distribuídas por toda a coluna de água à procura de alimento. Este comportamento de migrações foi observado durante toda a ontogenia.

Nos primeiros dias de vida, até ao dia 15 pós-eclosão, as larvas passaram a maioria do tempo (em média 60%) em pausa, sendo este tempo cada vez menor durante a ontogenia (Fig. 18). Após os primeiros 15 dias de vida, as larvas começaram a estar mais tempo em movimento do que em pausa, até que ao dia 26 as larvas nadaram, pela primeira vez, durante todo o tempo em que foram observadas. A partir deste dia as larvas passaram a estar constantemente a nadar durante o minuto de observação. Até ao 26º dia, as larvas aumentaram o tempo dispendido a nadar em 1,696 segundos por minuto em cada dia (Fig.20).

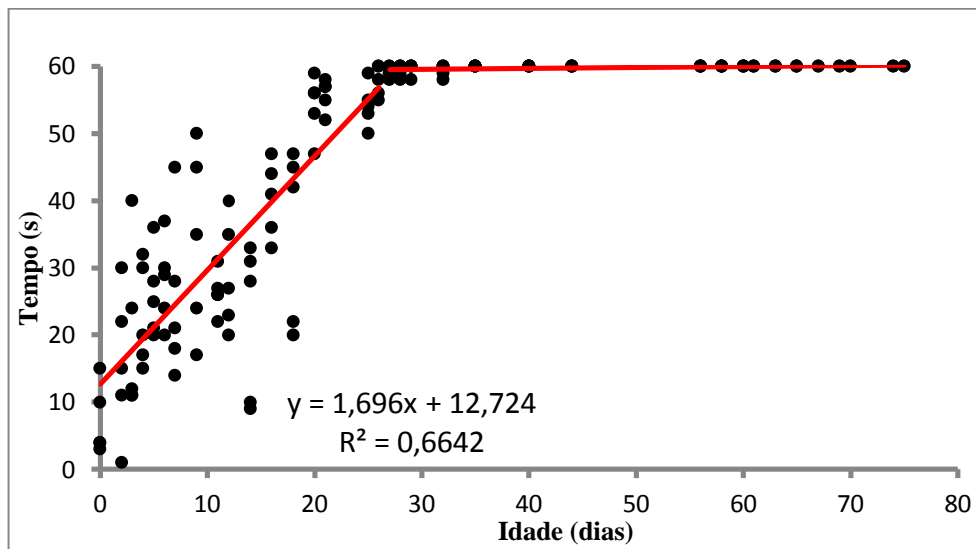


Figura 20 - Tempo (s) que as larvas nadam ao longo da ontogenia durante o minuto de observação. A equação da reta é representativa ao período <27 dpe. A reta horizontal surge como forma de demonstrar que a partir daquela idade as larvas nadam durante todo o tempo de observação

Foram igualmente observadas no total 58 pausas que foram passadas em posição vertical, durante as quais a larva era quase imperceptível. A larva mais velha a efetuar este tipo de pausa tinha 25 dpe. A frequência de pausas verticais foi mais elevada aos 2 e 3 dpe, em que se registaram 11 e 9 pausas verticais, respetivamente.

O ato de predação foi sempre antecedido por uma fixação ou orientação à presa, com as larvas a colocarem o seu corpo em forma de “S” e orientar o corpo para a presa. Nem sempre as larvas conseguiram atacar as presas que haviam fixado, sendo a frequência de ataques inferior à frequência de fixações de presas (Fig.21).

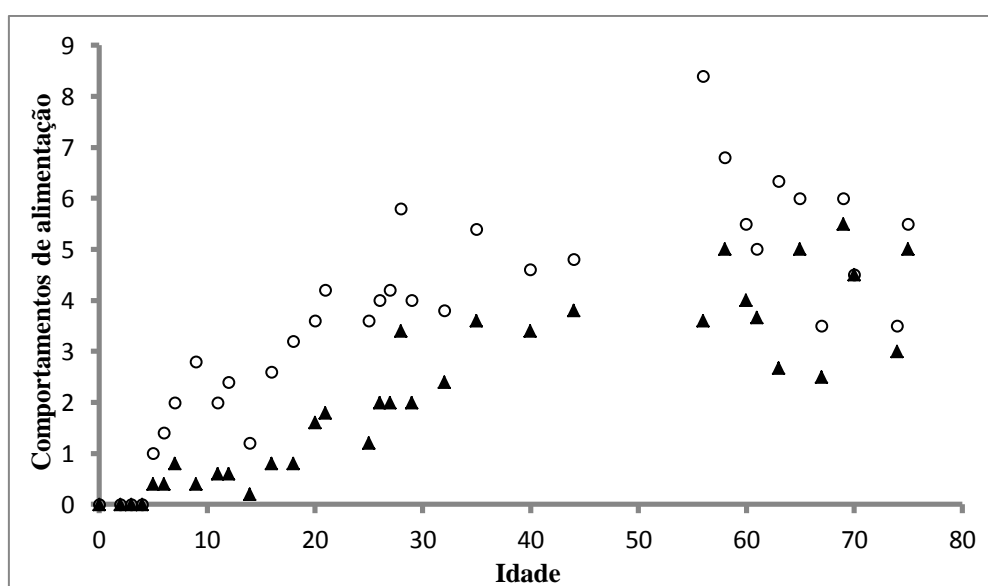


Figura 21 – Valores médios das fixações (círculos) e dos ataques (triângulos) ao longo da ontogenia das larvas de sardinha.

A média dos ataques do 5º dpe até ao 26º dpe foi de $0,89 \pm 0,98$ por minuto enquanto a média de fixações foi de $2,62 \pm 1,70$ por minuto. Assim, cerca de 34% das sequências predatórias foi completa até ao 26º dpe. Nas idades seguintes (27 dpe – 75 dpe), nas quais se verificou que as larvas dispenderam mais tempo a nadar, a média de ataques foi de $3,49 \pm 1,69$ e a média de fixações foi de $5,32 \pm 2,16$, numa percentagem de 65% de sequências completas. Esta percentagem de sequências completas aumentou com a idade sendo cerca de 100% nos dias 70 e 75 pós-flexão (Fig.22).

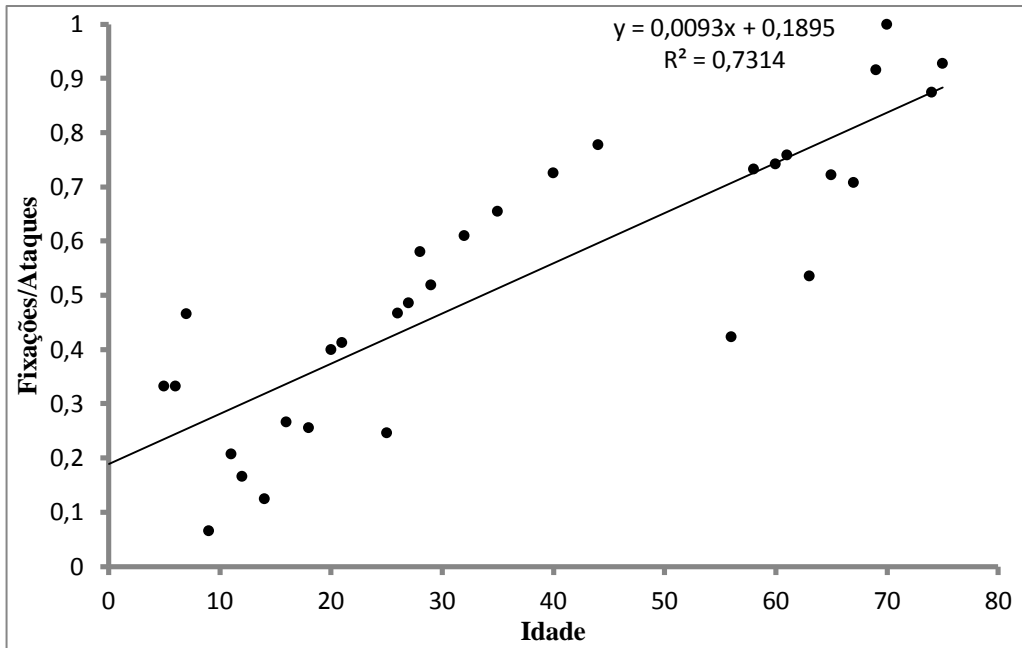


Figura 22 – Média da percentagem de seqüências predatórias durante a ontogenia.

O número de fixações foi aumentando com a idade a uma taxa de 0,08 fixações por minuto em cada dia, atingindo um valor máximo de 10 fixações por minuto nos dias 28, 56, 58 pós-eclosão (Fig.23).

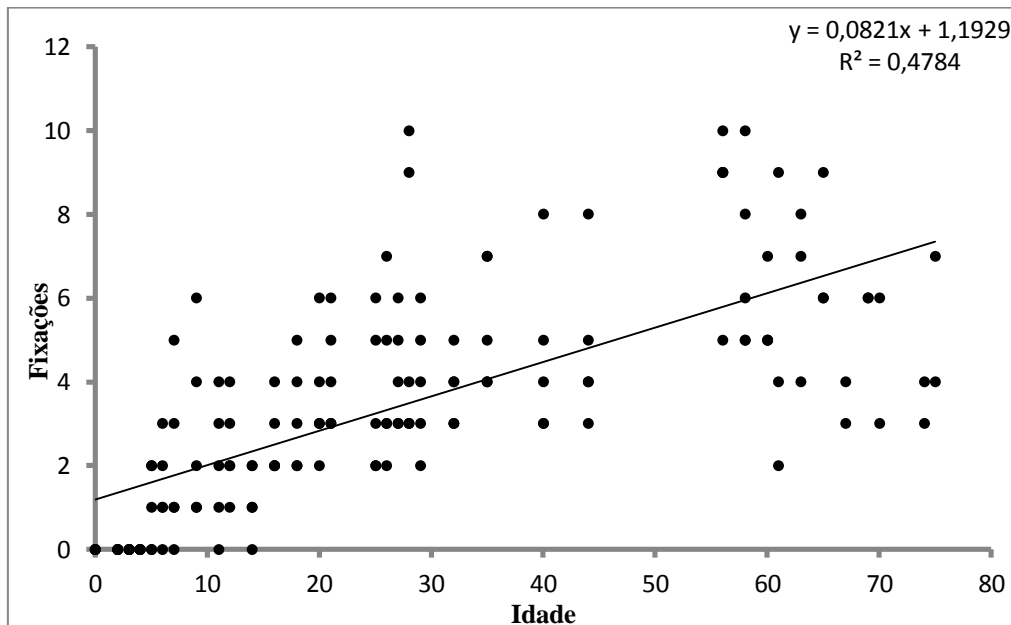


Figura 23 – Frequência de fixações por larva durante a ontogenia

Nos primeiros 4 dias de vida, durante a alimentação endógena, não se verificou qualquer tipo de comportamento predatório por parte das larvas. A frequência de ataques a presas por parte das larvas de sardinha aumentou com a idade. Este aumento foi de 0,07 ataques por minuto, para um valor máximo de 9 ataques num minuto para o dia 58 pós-eclosão (Fig.24).

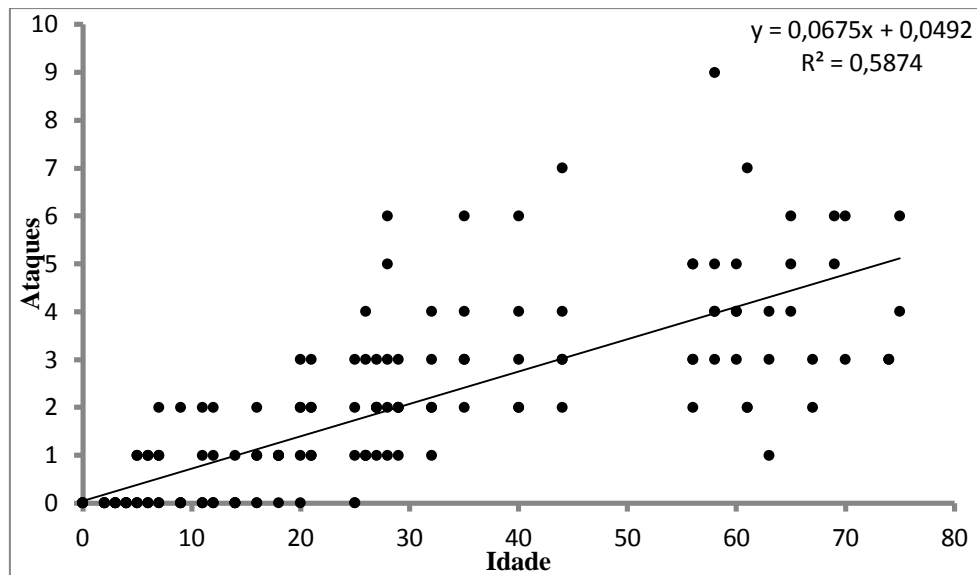


Figura 24 – Frequência de ataques por larva durante a ontogenia

Verificou-se no dia 75 pós-eclosão um ataque de uma larva a outra larva e consequente fuga/perseguição.

3.4 Velocidade crítica de natação

3.4.1 Velocidades de natação em relação à idade

No total das experiências de natação foram analisadas 372 larvas, das quais 94 eram provenientes do tanque com a dieta de concentração superior de náuplios (grupo A), 120 da concentração inferior (grupo B), 68 da concentração intermédia (grupo C) e 90 de plâncton natural (grupo D). No total das 372 larvas apenas foi possível calcular velocidades para 86 larvas, pois o cálculo das velocidades críticas apenas é possível quando as larvas aguentam a corrente de aclimatização. Verificou-se que nas primeiras fases larvares testadas (L6, L10) as larvas ao serem colocadas na câmara de natação deixavam-se ir com a corrente, não sendo capazes de nadar à velocidade de $1,5 \text{ cm s}^{-1}$. Na idade 15 dias pós-eclosão as larvas dos diferentes grupos não conseguiram resistir à corrente durante o período de adaptação (>3 minutos). Contudo, verificou-se que as larvas das dietas com concentração de alimento maior (grupo A) e intermédia (grupo C) nesta idade já reagiam à corrente durante curtos períodos de tempo quando tocavam na rede colocada a jusante, ao invés das larvas dos grupos B e D (menor concentração de alimento e plâncton natural) que quando se encostavam à rede já não conseguiam voltar a posicionar-se na coluna. O dia 20 pós-eclosão foi um ponto de viragem no que respeita às capacidades natatórias. A partir deste dia as larvas começaram a conseguir resistir ao período de aclimatização e a vencer velocidades de correntes cada vez mais elevadas. Nesta idade (20 dpe), a dieta que teve a média de velocidades mais alta foi a dieta com plâncton natural com $3,43 \text{ cm s}^{-1}$ em que foram testadas 6 larvas. No que diz respeito às outras dietas, foram testadas 4 larvas na dieta com maior concentração de alimento que nadaram a uma média de $3,08 \text{ cm s}^{-1}$, na de menor concentração 7 larvas nadaram a uma média de $2,62 \text{ cm s}^{-1}$ e 6 larvas nadaram a uma média de $2,86 \text{ cm s}^{-1}$ na dieta de concentração intermédia. As larvas do grupo A (maior concentração de alimento) apresentaram uma melhoria das suas capacidades natatórias em $0,12 \text{ cm s}^{-1}$ por dia até ao dia 75 pós-eclosão, variando a velocidade das larvas de $2,21 \text{ cm s}^{-1}$ no dia 20 até um máximo de $9,47 \text{ cm s}^{-1}$ ao dia 55 pós eclosão. Para as larvas do grupo C (concentração intermédia), as larvas sobreviveram até ao dia 50 e apresentaram igualmente uma melhoria nas suas capacidades natatórias ($0,17 \text{ cm s}^{-1}$) tendo a velocidade variado de $1,58 \text{ cm s}^{-1}$ ao dia 20 até $9,14 \text{ cm s}^{-1}$ ao dia 45 pós-eclosão. Nos restantes tratamentos, menor concentração e plâncton natural (grupos B e D), a

mortalidade não permitiu um estudo tão abrangente como nas dietas anteriores devido à baixa sobrevivência larvar (30 e 25 dias pós-eclosão respetivamente). Para estas experiências as larvas também melhoram as capacidades natatórias em 0,11 e 0,10 cm s^{-1} por dia, em média, respetivamente. Nestas dietas as velocidades variaram de 2,00 a 4,80 cm s^{-1} (20 dpe – 30 dpe) na dieta de menor concentração e de 2,25 a 4,87 cm s^{-1} (20 dpe – 25 dpe) na dieta de plâncton natural (Fig.25; tabela 3).

Para as idades em que foram testadas velocidades de natação e que são comuns a todas as dietas (20dpe e 25dpe) não foram verificadas diferenças significativas das capacidades natatórias entre larvas cultivas com os diferentes regimes alimentares ($p = 0,318$).

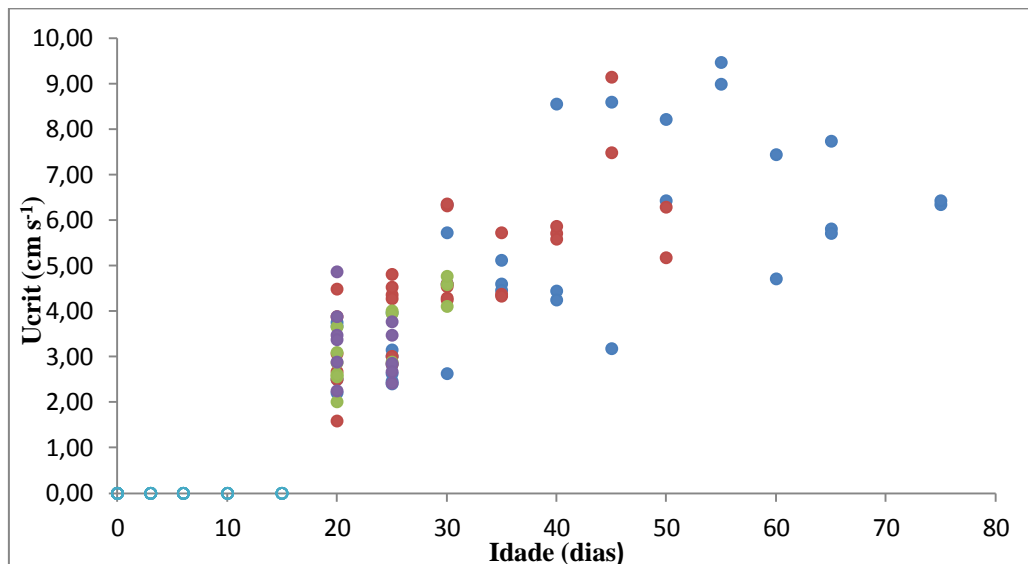


Figura 25 – Velocidades de natação das larvas de cada dieta em função do comprimento total. A cor azul corresponde às larvas da maior concentração de alimento (grupo A); a cor vermelha às larvas da concentração intermédia (grupo C); cor verde às larvas da concentração inferior (grupo B); a roxa às larvas da dieta com plâncton natural (grupo D), os circulos azuis claros abertos correspondem a larvas que não resistiram ao período de aclimatização.

Tabela 3 – Relação entre Ucrit e a idade larvar das diferentes dietas. Pn = plâncton natural

Ucrit vs idade	Dieta	Reta de regressão	R ²	p
	5n/ml	0,1216x - 0,3951	0,78	p<0,001
	2n/ml	0,1659x - 0,8274	0,83	p<0,001
	1n/ml	0,1147x - 0,3812	0,64	p<0,001
	Pn	0,0963x - 0,5531	0,39	p<0,001

3.4.2 Velocidades de natação em relação ao comprimento larvar

Verificou-se um aumento da velocidade crítica com o aumento do comprimento total das larvas. Nas 4 dietas em estudo, apenas 13 larvas menores que 10 mm de comprimento conseguiram resistir a nadar durante o tempo de aclimatização (natação a 1.5 cm s⁻¹). Na dieta com maior concentração de alimento (grupo A), as larvas foram melhorando as suas capacidades natatórias em 0,49 cm s⁻¹ a cada mm de crescimento. Neste grupo (dieta A), a larva que atingiu a maior velocidade (9,47 cm s⁻¹) tinha 19.1 mm de comprimento enquanto a larva mais pequena a conseguir nadar tinha 9,4 mm e nadou a 2,5 cm s⁻¹. A velocidade relativa nesta idade variou dos 1,90 "body length" (bl) s⁻¹ aos 6,89 bl s⁻¹. Na dieta de concentração intermédia (grupo C), as larvas tiveram um desenvolvimento da capacidade natatória de 0,47 cm s⁻¹ a cada milímetro de aumento no comprimento. No que diz respeito à larva mais pequena a nadar, neste grupo houve uma larva com 8,8 mm a atingir uma velocidade de 2 cm s⁻¹. A velocidade máxima neste grupo C foi atingida com um comprimento de 22,2 mm (9,14 cm s⁻¹). Para esta dieta a velocidade variou dos 1,80 bl s⁻¹ aos 4.64 bl s⁻¹. Na dieta de menor concentração (grupo B) e de plâncton natural (grupo D), as larvas apresentaram igualmente um incremento da velocidade de natação de 0,45 e 0,38 cm s⁻¹ a cada mm, respetivamente. No caso da dieta de menor concentração, a larva mais pequena a ser capaz de nadar tinha 7,90 mm e

nadou a uma velocidade de $2,00 \text{ cm s}^{-1}$ e na dieta de plâncton natural tinha $7,2 \text{ mm}$ e nadou a $2,41 \text{ cm s}^{-1}$. A velocidade de natação relativa para estas dietas variou entre $2,53 - 4,13 \text{ bl s}^{-1}$ para a dieta de menor concentração e $2,02 - 4,77 \text{ bl s}^{-1}$ na dieta de plâncton natural (Fig.26; Tabela 4).

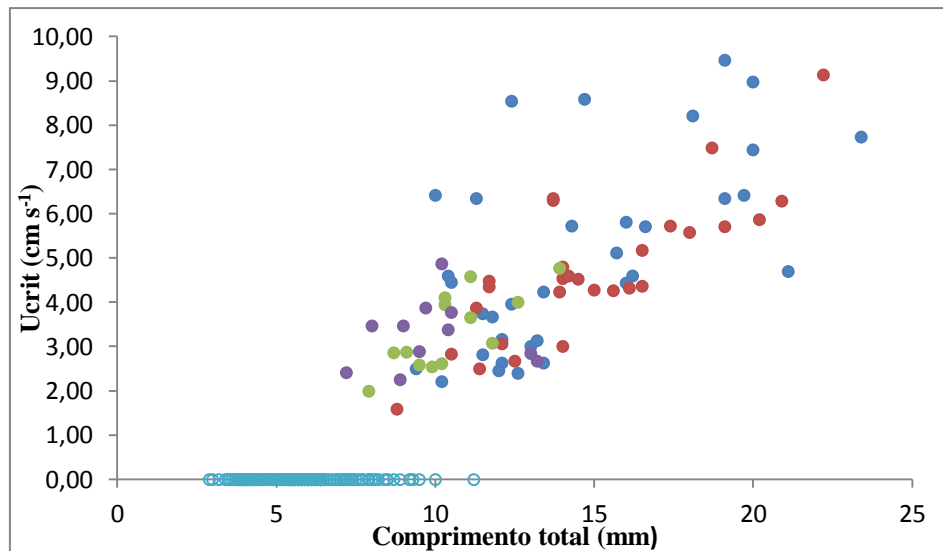


Figura 26 – Velocidades de natação das larvas de cada dieta em função do comprimento total. A cor azul corresponde às larvas da maior concentração de alimento (grupo A); a cor vermelha às larvas da concentração intermédia (grupo C); cor verde às larvas da concentração inferior (grupo B); a roxa às larvas da dieta com plâncton natural (grupo D), os círculos azuis claros abertos correspondem a larvas que não resistiram ao período de aclimatização de todas as experiências.

Tabela 4 – Relação entre Ucrit e o comprimento total das larvas de sardinha cultivadas com as diferentes dietas. Pn =plâncton natural

Ucrit vs comprimento	Dieta	Reta de regressão	R ²	P
	5n/ml	0,4888x - 2,4154	0,80	p<0,001
	2n/ml	0,4711x - 2,6002	0,88	p<0,001
	1n/ml	0,4499x - 2,263	0,70	p<0,001
	Pn	0,3765x - 1,9301	0,47	p<0,001
	Modelo geral	0,459x-2.343	0.79	p<0,001

Quando as velocidades críticas foram transformadas em velocidades relativas (bl s^{-1}) foi verificada uma correlação positiva entre as velocidades relativas e a Ucrit. (Fig.27). Foi verificado um máximo de $6,89 \text{ bl s}^{-1}$ na experiência de maior concentração alimentar.

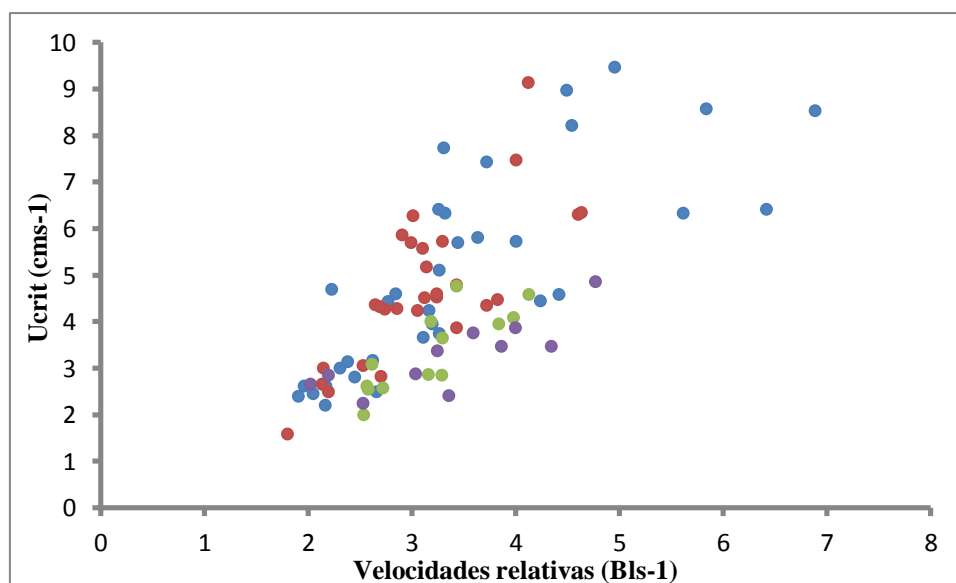


Figura 27 – Velocidades críticas baseadas nas velocidades relativas de cada larva para cada dieta em função do comprimento. Cor azul corresponde às larvas da maior concentração de alimento (grupo A); a cor vermelha às larvas da concentração intermédia (grupo C); cor verde às larvas da concentração inferior (grupo B); e a roxa às larvas da dieta com plâncton natural (grupo D).

O número de Reynolds (Re) aumentou com o desenvolvimento larvar, ou seja, com o aumento das capacidades natatórias (Fig.28), variando entre 20,89 e 746,81. A maioria das larvas (70 em 86) nadou em ambiente hidrodinâmico viscoso ($Re < 300$) e as restantes 16 larvas nadaram em ambiente intermédio ($300 < Re < 10000$). A larva mais pequena a nadar neste ambiente intermédio tinha 11,3 mm.

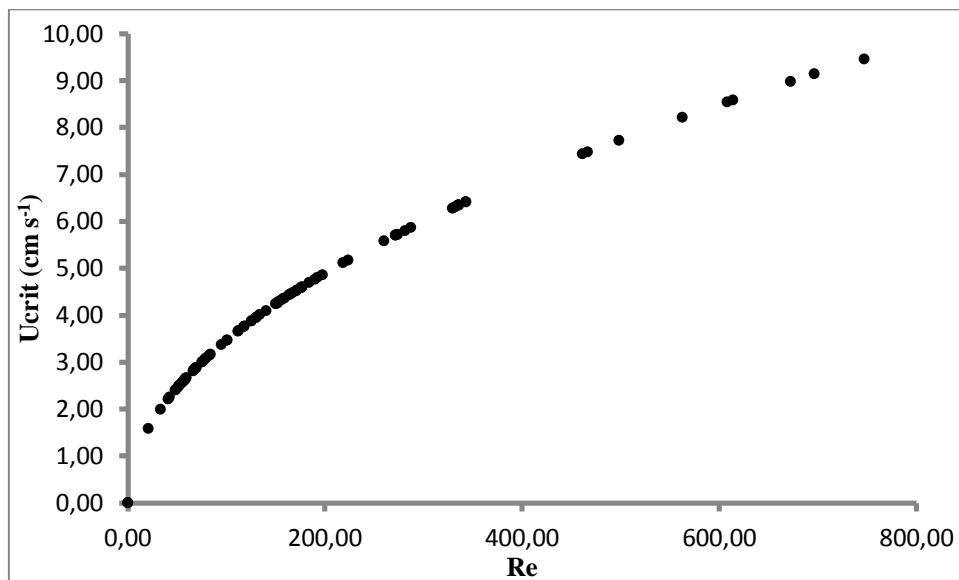


Figura 28 – Número de Reynolds (Re) para as larvas de sardinha

3.5 *Condição nutricional*

3.5.1 *Índice RNA/DNA e idade das larvas*

Foram obtidos 34 medições da condição nutricional das larvas de sardinha através do índice RNA/DNA na dieta com maior concentração de alimento, 33 na concentração intermédia, 17 na dieta de menor concentração, e 12 na dieta de plâncton natural. Apesar da variabilidade registada entre as larvas analisadas, relativamente ao índice RNA/DNA, registou-se uma tendência para uma maior dispersão no período próximo da eclosão e reduziu progressivamente com o desenvolvimento. Perante a fórmula de Buckley (2008), o valor mínimo de boa condição nutricional para a temperatura de 15°C foi de 0,97. No total das larvas analisadas apenas 3 larvas estavam em boa condição nutricional. A média da condição nutricional (sRD) foi de $0,378 \pm 0,271$

Para a dieta de maior concentração (grupo A), após a eclosão a condição nutricional sofreu um pequeno decréscimo com a idade, mas apresentou uma tendência de recuperação após 30 dpe. Foi verificado um índice máximo de 0,82 ao dia 55 pós-eclosão. Na dieta de concentração intermédia (grupo C), o índice também decresceu ao longo da ontogenia e foi verificado um valor máximo de 1,27 para uma larva de 20 dias. A dieta com a menor concentração (grupo B) de alimento apresentou igualmente um decréscimo da condição nutricional das larvas ao longo da ontogenia. Nesta dieta foi obtido um índice máximo de 1,31 para uma larva de 20 dias. A dieta de plâncton natural (grupo D), ao contrário das restantes dietas, apresentou um aumento de condição nutricional larvar com o aumento da idade das larvas, contudo os valores absolutos inferiores às restantes dietas. Nesta dieta o máximo atingido foi de 0,43 numa larva ao dia 25 pós-eclosão (fig.29).

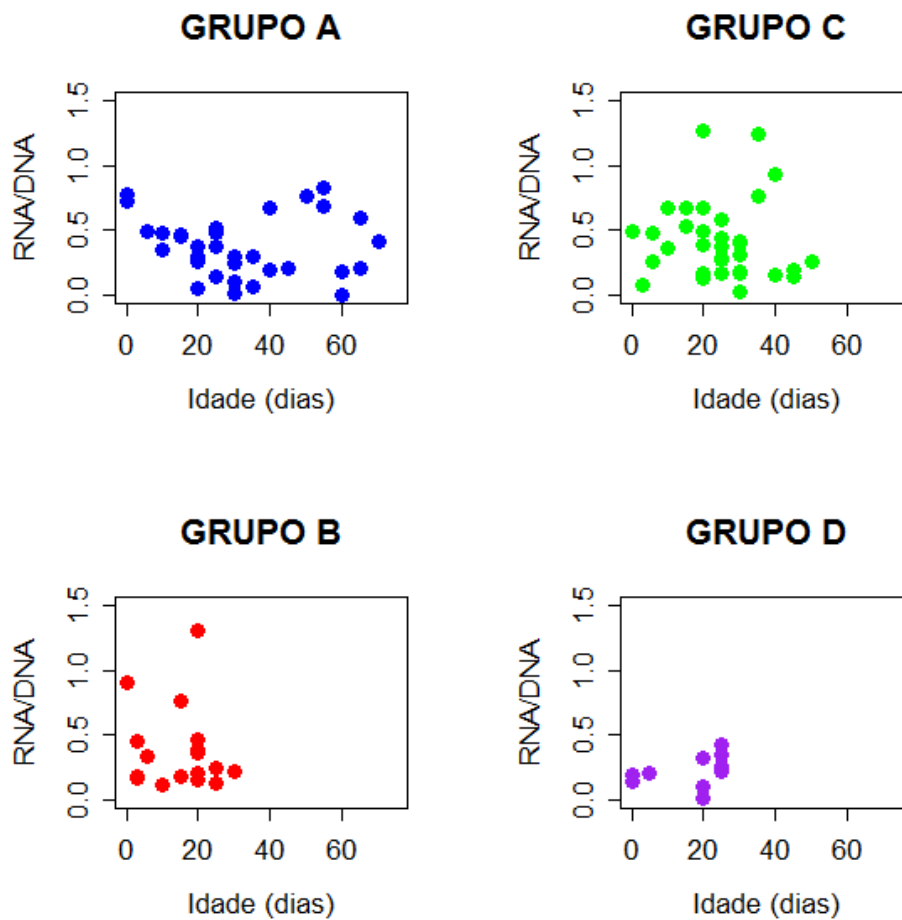


Figura 29 – Condição nutricional ao longo da ontogenia para as diferentes dietas

Perante a sobrevivência larvas, foram analisados os índices de condição das larvas de sardinha correspondentes às idades comuns a todos as experiências. Não foram verificadas diferenças na condição nutricional entre as larvas cultivadas com as diferentes dietas (fig.30, tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros da regressão múltipla da condição nutricional em função da dieta e a idade larvar.

	Estimativa	Des.padrão	t	P (> t)
Grupo A	0.019721	0.090741	0.217	0.8287
Grupo B	-0.001749	0.003585	-0.488	0.6275
Grupo C	0.029012	0.082906	0.350	0.7276
Grupo D	-0.168428	0.099343	-1.695	0.0953

$$R^2 = 0,08553$$

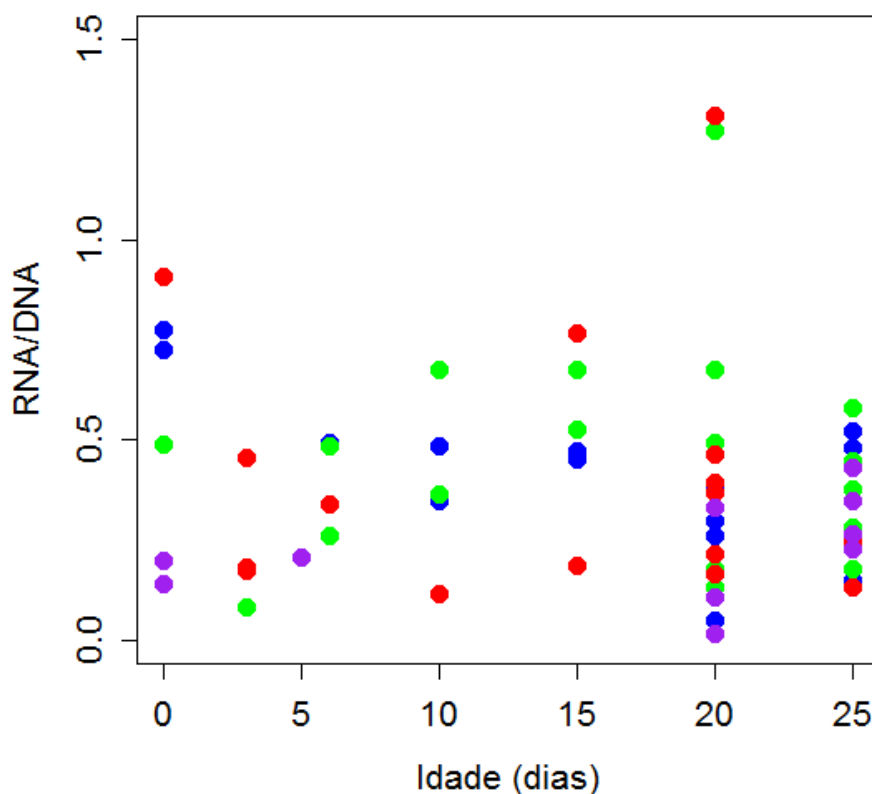


Figura 30 – Condição nutricional das larvas de sardinha nas idades comuns a todas as dietas (0-25 dias). Cor azul corresponde à dieta de maior concentração (grupo A); a cor vermelha à dieta de concentração intermédia (grupo C); a cor verde à dieta de menor concentração (grupo B); a cor roxa à dieta de plâncton natural (grupo D)

Na tabela 6 podemos verificar as médias para a duração total de cada experiência. Apesar das diferenças nas médias, estes valores não têm em conta a sobrevivência larvar, não estando ponderada a idade larvar.

Tabela 6 - Resumo do conteúdo de ácidos nucleicos (média e desvio) das larvas utilizadas nas experiências de Ucrit para as diferentes dietas. Pn= plâncton natural; N= número de larvas; Ct= comprimento total das larvas.

Dieta	N	Ct	RNA/mg	DNA/mg	sRD
5n/ml	34	14,74 ± 3,72	9,51 ± 18,83	7,17 ± 8,80	0,38 ± 0,24
2n/ml	33	14,94 ± 3,31	4,98 ± 7,28	10,12 ± 12,14	0,42 ± 0,30
1n/ml	17	10,49 ± 1,63	8,59 ± 17,56	15,68 ± 18,49	0,39 ± 0,31
Pn	12	9,96 ± 1,85	3,12 ± 6,42	17,88 ± 29,05	0,22 ± 0,12

3.5.2 Índice RNA/DNA e Ucrit

Não foi verificada uma relação significativa entre a condição larvar estimada através do índice RNA/DNA e a Ucrit para as larvas de sardinha, tendo em conta a idade larvar e o comprimento larvar (tabela 7, 8, Fig.29).

Tabela 7 - Parâmetro da regressão múltipla da Ucrit em função da condição nutricional e a idade larvar.

	Estimativa	Des.padrão	t	P (> t)
RNA/DNA	-0.315690	-0.315690	-0.639	0.524
Idade	0.150397	0.008722	17.244	<2e-16

$$R^2 = 0,7687$$

Tabela 8 - Parâmetro da regressão múltipla da Ucrit em função da condição nutricional e o comprimento larvar.

	Estimativa	Des.padrão	t	P (> t)
RNA/DNA	-0.66133	0.52320	-1.264	0.209
Comprimento	0.46871	0.02939	15.949	< 2e-16

R² = 0,7399

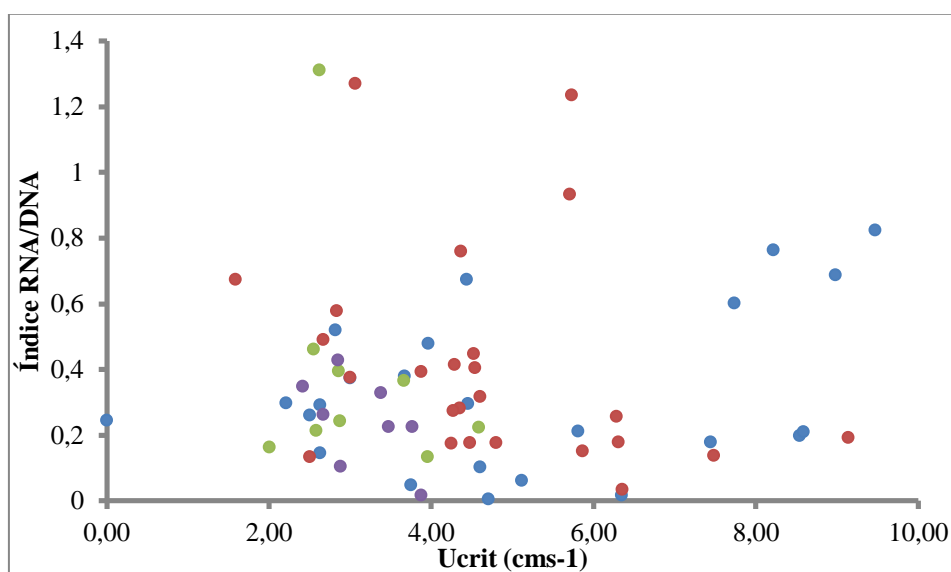


Figura 31 – Relação entre o índice RNA/DNA e a Ucrit para as diferentes dietas. Cor azul corresponde às larvas da maior concentração de alimento; a cor vermelha às larvas da concentração intermédia; cor verde às larvas da concentração inferior; e a roxa às larvas da dieta com plâncton natural.

4 Discussão

No presente estudo observou-se que as larvas de sardinha (*Sardina pilchardus*) eclodem sem pigmentação e medindo em média 4,05 mm. Este comprimento é semelhante ao verificado para a mesma espécie e superior ao comprimento do biqueirão em condições naturais ao largo da costa continental Portuguesa (Santos et al. 2007). As taxas de crescimento diárias obtidas com as diferentes dietas (0,240 – 0,487 mm d⁻¹) são consistentes com as taxas obtidas em laboratório (0,23 mm d⁻¹) (Blaxter 1969) e no campo (0,41 - 0,57 mm d⁻¹) (Ré 1983) e (0,29 – 0,42 mm d⁻¹) (Chícharo et al. 2012), mas ficam aquém de algumas taxas de crescimento verificadas igualmente no campo (0,70 mm d⁻¹) (Diaz et al. 2011). As dietas de maior concentração (grupo A e C) obtiveram melhores taxas de crescimento (0,327 e 0,487 mm d⁻¹) e são aquelas que mais se aproximam dos valores de crescimento obtidos na natureza (0,41 – 0,57 mm d⁻¹ Ré, 1983). As taxas para as dietas de menor concentração e planctôn natural foram significativamente inferiores, sugerindo que os valores das taxas de crescimento obtidas nas dietas de concentração intermédia e de maior concentração para além de uma maior sobrevivência, obtêm um melhor crescimento e que as sardinhas em meio natural necessitam de se alimentar de elevadas densidades de plâncton para sobreviver.

Eclodindo a uma temperatura de 15 °C, as larvas de sardinha até ao dia 3 pós-eclosão (dpe) têm uma alimentação endógena, podendo ver observado o saco vitelino. Ao 4 dpe, tal como no estudo de Hunter (1972) com o biqueirão (*Engraulis mordax*) e com a sardinha em meio natural (Santos et al., 2007), o saco vitelino já não é visível. Esta total absorção do saco vitelino e o desenvolvimento das capacidades visuais bem como a abertura da boca (3 dpe) permitem às larvas passarem de uma alimentação meramente endógena para exógena. Estes dois eventos são essenciais para a alimentação larvar devido ao facto de as larvas serem predadores visuais (Munk & Kiorboe, 1985). A restante pigmentação larvar surge ao 5º dia (5 mm). Estes resultados coincidem com os resultados para as larvas de sardinha da natureza (Santos et al. 2007).

No que diz respeito à flexão da notocorda, esta ocorreu numa fase de desenvolvimento semelhante à observada em larvas de sardinha recolhidas em meio natural (Santos et al. 2007) apesar da diferença de comprimentos entre as larvas: 15 dpe e 7,5 mm e 14 dpe e 11 mm, respetivamente. Estes autores evidenciam o início da formação da barbatana dorsal ao dia 9 e a sua conclusão ao dia 40 pós-eclosão (26 mm), contudo no presente estudo a barbatana dorsal começa a ser visível apenas ao 20º dpe e

está completa ao dia 35 em larvas com 13,47 mm. Por sua vez, a barbatana anal surge ao dia 40 para larvas de 16,52 mm diferindo dos 28 mm destacados por Santos et al. (2007). Estas semelhanças verificadas no desenvolvimento morfológico podem ser explicadas pelas taxas de desenvolvimento obtidas nas experiências serem similares das obtidas em larvas de natureza. Assim, apesar das condições artificiais do cultivo, os resultados não se afastaram muito dos descritos em meio natural e permitem uma maior confiança na extrapolação de outras características larvares para o meio natural.

Durante o processo de desenvolvimento que é a fase larvar, uma das mais importantes ações é a procura e consequente ingestão de alimento (O'Brien et al. 1990). São vários os autores que têm focado os seus estudos nos comportamentos de alimentação e na natação de rotina dos pequenos pelágicos como o biqueirão (Hunter 1972, 1976) ou o arenque (Munck & Kiorboe 1985) de forma a perceber os principais componentes da resposta funcional, como o número de ataques. Nos primeiros dois dias de vida (0-1 dpe) as larvas de sardinha passaram 88% do tempo inativas, interrompendo esta pausa com curtos (1-3s) movimentos que se julga terem uma função respiratória (Hunter, 1972). Estes valores são um pouco inferiores aos das larvas de biqueirão norte-americano (95%) no estudo de Hunter (1972). No 5º dpe, as larvas apenas passaram em média 57% do tempo paradas, que difere significativamente dos valores obtidos para o biqueirão (Hunter, 1972), o qual observou que o tempo em pausa era praticamente 0 para esta idade. Estas diferenças nos níveis de atividade natatória, sugerem uma maior vulnerabilidade das larvas de sardinha durante os primeiros dias de vida em comparação com o biqueirão do Atlântico oeste. O aumento do tempo a nadar que se verifica no 5º dia pós-eclosão coincide com o aparecimento do comportamento alimentar, tendo sido pela primeira vez observado o ato predatório neste dia. Até ao 15º dpe, em que o comportamento de pausa representava ainda 33% do tempo observado, a natação foi essencialmente caracterizada por ser em pausa-viagem, que está provavelmente associado com a fixação de presas durante o tempo de pausa (Browman & O'Brien 1992a, b). Associado ao aumento da idade está o desenvolvimento larvar e estes dois fatores permitem um aumento do tempo de natação por parte das larvas. Foi essencialmente a partir da flexão da notocorda (15 dpe) que as larvas de sardinha começaram a dispender mais tempo a nadar, até que ao dia 26 pós-eclosão as larvas passaram todo o tempo observado em natação. Nesta idade as larvas já têm a barbatana caudal (20 dpe) desenvolvida e já é visível a barbatana dorsal (25 dpe). Outra importante transformação verificada neste período foi o desenvolvimento da bexiga

natatória que permite uma flutuabilidade neutra e conseqüentemente um melhoramento do desempenho natatório (Georgalas et al., 2007). Esta transformação, segundo Santos et al. (2007), ocorre nas larvas recolhidas em meio natural por volta dos 10 mm de comprimento total, o que neste trabalho corresponde a larvas de 20 dpe. O decréscimo ao longo da ontogenia do tempo em pausa, foi mais acentuado noutras espécies como o biqueirão (Hunter, 1972), robalo (Georgals et al. 2007), bacalhau (Munk 1995) e arenque (Utne-Palm & Stiansen 2002). O aumento das capacidades natatórias associado ao desenvolvimento morfológico bem como o aumento do tempo a nadar durante a ontogenia permitem um maior número de encontros com as presas e aumento do sucesso alimentar (Miller et al., 1993). Esta passagem para uma constante movimentação permite uma procura contínua de alimento durante a natação (Munk & Kiørboe, 1985) sendo este comportamento observado noutras espécies (Hunter 1972, Munk & Kiorbe 1985, Georgalas et al. 2007). Foi igualmente verificado uma mudança no comportamento predatório, de “saltatory” para uma constante procura noutras espécies durante a ontogenia (Georgalas et al. 2007, Tojeira et al. 2011).

A predação segue uma cronologia de eventos que se inicia com o avistamento de uma presa. Após visualizar a presa, a larva contrai o corpo em forma de “S”, e mantém a presa fixa e alinhada com a ponta da cabeça com a ajuda das barbatanas peitorais para possibilitar o ataque e posterior ingestão da presa (Hunter 1972). A percentagem de ataques obtida no período do 5º dpe ate ao 26º dpe (34%) foi inferior à obtida por Hunter (1972) para o biqueirão (*Engraulis mordax*). Contudo, foi verificado um aumento da percentagem de sequências completas com o aumento da idade, facto que não foi verificado para as larvas de biqueirão (Hunter 1972), mas sim para o arenque (Utne-Palm & Stiansen 2002). Para a temperatura de 15 °C as larvas de biqueirão ao 10º dpe realizaram $3,3 \pm 0,6$ ataques por minuto e $4,1 \pm 0,7$ ao dia 12 pós-flexão (Hunter 1976), numeros superiores aos verificados nas larvas de sardinha em que apenas se verificaram $0,6 \pm 0,89$.

O início do desenvolvimento das capacidades natatórias assume uma grande importância para a sobrevivência, mas também para a dispersão/transporte larvar (Leis 2007). Contudo a inexistência de estudos anteriores das velocidades críticas de natação (U_{crit}) nos pequenos pelágicos torna difícil uma possível comparação com espécies similares que partilhem o mesmo ambiente. De facto, para além da capacidade de realizar migrações verticais (Santos et al. 2006), o desenvolvimento das capacidades

natatórias das larvas de sardinhas era desconhecido, sendo tidas como partículas passivas, pelo que a retenção ou a dispersão larvar têm sido relacionadas com o vento e as correntes (Santos et al. 2004). Este tipo de estudo das capacidades natatórias durante a ontogenia foi apenas estudado para 15 famílias referidas por Leis (2010) às quais foi acrescentada outra família (Leis et al. 2012), sendo que a maioria dos estudos foram feitos em espécies tropicais (Leis 2010).

Nas larvas de sardinha foi verificada uma relação entre o desenvolvimento morfológico e as capacidades natatórias das larvas. As larvas começaram a resistir ao período de aclimatização (5 min a $1,5 \text{ cm s}^{-1}$) a partir do dia 20 pós-eclosão. A média do comprimento larvar da larva mais pequena de cada dieta a nadar foi de $8,33 (\pm 0,97)$ mm. Nesta idade as larvas já apresentavam a flexão da notocorda e a barbatana caudal já era visível, acrescentando ao facto de já possuírem bexiga natatória (Santos et al. 2007). Assim, o desenvolvimento destas características morfológicas pode ser considerado como o ponto de viragem nas capacidades natatórias das larvas. É possível verificar um aumento claro por volta do dia 45 pós-eclosão, altura em que as larvas já apresentavam um desenvolvimento morfológico muito avançado com a totalidade das barbatanas formadas. O desenvolvimento das capacidades natatórias das larvas de sardinha observado foi semelhante aos das espécies já estudadas (Clark et al. 2005; Guan et al. 2008; Leis et al. 2007, 2009a, b, 2012; Leis 2010; Faria et al. 2009, 2011a; Patrick & Stydom 2009), observando-se uma melhoria das velocidades críticas de natação com o aumento da idade e comprimento larvar. No entanto, tal como observado nos mesmos estudos, a variabilidade para cada idade/tamanho foi grande. Foi igualmente verificado um incremento das taxas de crescimento da zona final da cabeça e da anal a partir do momento em que as larvas começaram a nadar. Este resultado sugere que este aumento da taxa de crescimento da zona final da cabeça e da anal, contribuiu claramente para o aumento da capacidade natatória das larvas. Não obstante, o desenvolvimento da capacidade natatória das larvas de sardinha ocorreu em tamanhos maiores quando comparado com larvas de espécies de águas frias temperadas (Guan et al. 2008), tropicais (Leis 2010) e temperadas (Clark et al. 2005). No que diz respeito às velocidades relativas de natação, as larvas de sardinha apresentaram valores inferiores ($1,80 - 6,89 \text{ bl s}^{-1}$) aos valores descritos para peixes de recifes tropicais (perciformes, $10 - 20 \text{ bl s}^{-1}$, Leis 2010) e algumas espécies temperadas estudadas (perciformes, $12 - 20 \text{ bl s}^{-1}$, Clark et al. 2005). Estes valores de velocidades críticas relativas são por sua vez semelhantes aos valores descritos para espécies de águas frias (gadiformes,

scorpaeniformes, Guan et al. 2008). Fisher et al. (2005), nos seus resultados em zonas tropicais (28-30 °C), verificaram que a família em estudo, clupeiformes, foi das famílias que apresentou velocidades inferiores. No estudo de Fisher et al.(2005) foram registadas Ucrits médias de 32 cm s⁻¹ para a espécie Jenkinsia spp. e de 12,7 cm s⁻¹ para a espécie Spratelloides. Estas velocidades foram obtidas para um comprimento médio das larvas de 37,7 mm e 30,8 mm, respetivamente, contrastando com os 4,36 cm s⁻¹ e 13,46 mm das larvas de sardinha do presente estudo.

O estudo natatório das larvas de clupeiformes tem sido essencialmente baseado em estudos de velocidades de rotina. Este tipo de registo da velocidade é feito num tanque sem qualquer intervenção do investigador (Leis 2010). Hunter (1972) evidenciou velocidades médias de natação para as larvas de biqueirão (*Engraulis mordax*) de 11-12 cm s⁻¹ para larvas de aproximadamente 40 mm. Estes valores foram calculados através da frequência e a amplitude do movimento da barbatana em momentos que natação de aceleração (“burst speed”). Este autor determinou igualmente velocidades de rotina de 0,31 cm s⁻¹ para larvas de 41 mm com o mesmo método. von Westernhagen & Rosenthal (1979) nos seus estudos na natureza verificaram velocidades entre 0,5 a 3 cm s⁻¹ em larvas de arenque sem qualquer tipo de perturbação e velocidades de 4,3 a 13,5 cm s⁻¹ quando perturbadas com luz. Segundo Leis (2006), os valores de Ucrit são muito superiores aos valores das velocidades de rotina, em cerca de 5 a 10 vezes. Perante isto, e assumindo estas aproximações, é possível supor que o valor máximo de velocidade de rotina da sardinha será por volta dos 0,9-1,9 cms⁻¹ para uma larva de 19 mm, o que indica uma velocidade superior às encontradas para o biqueirão - *Engraulis mordax* (Hunter 1972) e similares ao arenque - *Clupea harengus* (von Westernhagen & Rosenthal 1979).

Apesar das diferenças no crescimento larvar entre as dietas, não foram verificadas diferenças nas velocidades nas idades comuns às dietas (20/25 dpe). Esta ausência de diferenças pode ser explicada pela sobrevivência larvar. Isto é, os resultados são influenciados pela “size selective mortality” em que apenas as larvas melhor adaptadas conseguem sobreviver mais tempo e assim influenciar as velocidades nestas idades que correspondem à sobrevivência máxima para a dieta de menor concentração e plâncton natural.

Leis (2010) destaca a filogenia e o ambiente como principais influências para as velocidades de natação larvar. O facto das larvas de sardinha se desenvolverem

preferencialmente em águas temperadas frias (15°C) pode ser uma explicação para as velocidades inferiores quando comparadas com as espécies de recife bem como o facto de pertencerem a uma família diferente, clupeiformes, que como já foi referido são das famílias com velocidades mais baixas (Fisher et al. 2005). Estas velocidades inferiores podem ser resultado do facto dos clupeídeos não terem tanta necessidade de encontrar um local específico para assentar, apenas precisam de se manter numa zona qualquer da plataforma com altas concentrações de alimento. Outro fator a ter em conta é o hidrodinamismo. As larvas nadam melhor em ambientes inertes do que em ambientes viscosos, sendo energeticamente ineficiente nadar em meios viscosos, isto é, quando o número de Reynolds (Re) é inferior a 300 (Leis 2006, Leis et al. 2012). A temperatura para além de influenciar a eficiência muscular (Hunt von Herbing 2002), vai igualmente ter um papel importante no hidrodinamismo. Assim, a viscosidade da água aumenta com a diminuição da temperatura sendo necessárias velocidades ou comprimentos maiores para atingir um determinado Re (Leis 2006). A grande maioria das larvas (81%) nadou em meio viscoso. As larvas que nadaram em meio intermédio (19%) foram essencialmente as larvas maiores, em que a larva maior a nadar neste tipo de ambiente tinha 12,4 mm e correspondem a larvas acima dos 40 dpe, altura em que as larvas já apresentaram um desenvolvimento morfológico muito avançado. O facto de a maioria das larvas nadar em meio viscoso pode ser uma explicação para as velocidades inferiores quando comparadas com as outras espécies.

A desova da sardinha em Portugal atinge o pico entre novembro e abril em zonas de afloramento costeiro (Figueiredo & Santos 1989; Ré et al. 1990; Santos et al. 2004) ocorrendo ao longo da plataforma continental e a temperaturas entre 12 e 17 °C (Bernal et al., 2007). Segundo Santos et al. (2006) as larvas de sardinha estão distribuídas na coluna de água essencialmente acima dos 20-25 metros de profundidade. As correntes nestas zonas apresentam valores médios de 9-10 cm s⁻¹ (Vitorino & Coelho 1998; dos Santos et al., 2008), o que corresponde aos valores máximos das velocidades obtidas para as sardinhas (9,47 cm s⁻¹) mas é um valor superior à velocidade média das larvas de sardinha (4,36 cm s⁻¹). A capacidade das larvas realizarem migrações verticais (Santos et al. 2006) pode ser um complemento às capacidades natatórias como forma de controlar a dispersão e/ou evitar a advecção.

Perante as análises do índice RNA/DNA, verificou-se que só 3 das larvas se encontram acima do limite mínimo de 0,97, considerado para uma boa condição

nutricional das larvas. A média obtida (0.378) foi igualmente muito inferior à média verificada em larvas de natureza na Ria Formosa para a mesma temperatura em que foi obtido um valor médio de 1,36 (Chicharo et al. 2012). Este resultado sugere que as larvas cultivadas com as diferentes dietas em laboratório se encontram com uma condição nutricional significativamente pior do que as do meio natural, sugerindo que estas larvas não são encontradas na natureza, devido ao facto de estas serem mais facilmente predadas, predação que não existe em laboratório. O índice RNA/DNA das larvas cultivadas com a dieta de maior concentração de alimento, mesmo não sendo significativo, apresentou um pequeno efeito positivo nas velocidades críticas, pelo que as larvas com melhor condição foram capazes de atingir velocidades mais altas. No entanto, a condição nutricional não explica por si só este aumento das capacidades. Por sua vez, nas restantes dietas não foi verificável tal relação. Tal leva a supor que as larvas mesmo apresentando condições nutricionais não ideais são capazes de melhorar as suas capacidades de natação e ter desempenhos natatórios razoáveis. Este resultado condiz com o resultado obtidos para a *Solea senegalensis* (Faria et al. 2011b) em que também não se verificou qualquer relação, contudo contrasta com os resultados da dourada (*Sparus aurata*) em que foi observada uma correlação positiva entre o índice de RNA/DNA e a Ucrit (Faria et al. 2011a). É de esperar que na natureza não existam igualmente diferenças nestas medidas de desempenho de curto-prazo como aconteceu em laboratório devido ao facto de na natureza a variação da condição nutricional ser inferior e as larvas em piores condições não sobreviverem.

Apesar de mais de 100 anos de investigação, o processo de recrutamento das espécies marinhas ainda é uma incógnita e uma importante área de estudo. Para tal, é importante perceber que fatores influenciam a sobrevivência larvar (Anderson, 1988). Caracterizada por uma dinâmica de desenvolvimento de novas capacidades e rápidos melhoramentos das mesmas, a fase larvar é um período de constantes desafios ecológicos como a obtenção de alimento, evitar a predação ou localizar/permanecer num habitat adequado (Houde, 1987; Fuiman, 2002). Mais estudos dos modos de natação são necessários na tentativa de relacionar e melhor extrapolar para a natureza as capacidades natatórias das larvas de sardinha. No futuro será necessário estudar as capacidades de *endurance* das larvas de sardinha. Esta ferramenta (*endurance*), tal como a Ucrit, é uma medição do potencial de natação da larva embora durante um longo período de tempo, isto é, o tempo que uma larva consegue nadar a uma velocidade de

corrente constante, tendo conseqüentemente mais interesse para a capacidade dispersiva da larva.

5 Conclusões

Este trabalho representa o primeiro estudo das capacidades natatórias de larvas de sardinha realizado em condições controladas. A sobrevivência das larvas de sardinha foi significativamente diferente entre as várias dietas utilizadas. Na realidade, tanto a concentração de alimento quanto o tipo de alimentação tiveram um papel importante na sobrevivência larvar, visto que as dietas de menor concentração alimentar e a de plâncton natural tiveram sobrevivências muito baixas relativamente às sobrevivências observadas nas dietas com maior concentração de alimento, sugerindo que as larvas de sardinha necessitam de abundância de alimento para conseguir sobreviver. As taxas de crescimento foram igualmente influenciadas pela dieta usada. Nas dietas onde a sobrevivência larvar foi superior foram igualmente obtidas taxas de crescimento superiores, valores estes que foram similares aos descritos para larvas da natureza, sugerindo que estas dietas (maior concentração e concentração intermédia) são as mais indicadas para o cultivo em laboratório para obter dados que sejam mais aproximados dos que ocorrem na natureza.

O desenvolvimento larvar, que foi similar ao observado em larvas recolhidas anteriormente a este trabalho na natureza, teve grande importância no início da atividade natatória. A flexão da notocorda, bem como a formação da barbatana caudal foram transformações morfológicas chave para que as larvas começassem a ser capazes de resistir às correntes a que eram expostas. Estas transformações também permitiram que as larvas melhorassem o seu desempenho predatório com um aumento das sequências alimentares completas (de 2 para 4 no intervalo do dia 25 ao dia 60 pós-eclosão), isto é, após a fixação da presa era executado o ataque com sucesso. O comportamento alimentar variou igualmente com o desenvolvimento das capacidades natatórias: se no início da ontogenia as larvas adotaram um comportamento de pausa-viagem para procurar as presas, este comportamento foi evoluindo para uma constante procura de alimento associada ao crescente período de movimento natatório.

A condição nutricional (índice RNA/DNA), não foi preponderante para a melhoria das capacidades de natação, sugerindo que mesmo com uma condição pior, as larvas são capazes de aumentar as velocidades de natação, podendo desta forma evitar a predação, alimentar-se e até movimentar-se de forma a escolher as correntes mais adequadas.

As larvas de sardinha, apesar de não possuírem as capacidades natatórias apresentadas pela grande maioria das espécies já estudadas, essencialmente perciformes de águas quentes (tropicais), estão longe de serem partículas inertes. Com este trabalho foi possível verificar que as larvas de sardinha são capazes de atingir velocidades (9,47 cm s⁻¹) similares às quais estão sujeitas na natureza (9-10 cm s⁻¹). Estas velocidades alcançadas pelas larvas de sardinha são semelhantes às velocidades obtidas por espécies de águas temperadas e frias das famílias Gadidae, Cotidae and Pleuronectidae. Assim, as capacidades natatórias aliadas ao facto de realizarem migrações verticais permite às larvas de sardinha evitar a advecção e o transporte para zona menos favoráveis para a sobrevivência larvar. As velocidades de natação foram significativamente influenciadas pelo comprimento/idade da larva. Estes resultados sugerem assim uma maior vulnerabilidade nas fases iniciais, dando força à *Hipótese do Período Crítico*.

6 Referências

- Anderson, J.T., (1988). A review of size dependent survival during prerrecruit stages of fishes in relation to recruitment. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*. **8**:55–56
- Bakun, A., (1996). *Patterns in the ocean: Ocean processes and marine population dynamics*. California Sea Grant College System, NOAA, 322pp.
- Bailey, K.M., Houde, E.D., (1989). Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. *Advances in Marine Biology* **25**:1-83
- Barlow, G.W., (1968). Ethological units of behavior. In: Ingle DJ (ed) *The central nervous system and fish behavior*. University of Chicago Press, Chicago, pp 217–232
- Beamish, F.W.H., (1978). Swimming capacity. In: *Fish physiology*. WS Hoar and DJ Randall (Eds.), Academic Press, New York. Vol. **7**:101–187
- Bellier, E., Planque, B., Petitgas, P., (2007). Historical fluctuations in spawning location of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) in the Bay of Biscay during 1967–73 and 2000–2004. *Fish. Oceanogr.* **16**:1–15
- Bernal, M., Stratoudakis, Y., Coombs, S., Angelico, M.M., Lago de Lanzo's, A., Porteiro, C., Sagarminaga, Y., Santos, M., Uriarte, A., Cunha, E., Valde's, L., Borchers, D., (2007). Sardine spawning off the European Atlantic coast: spawning areas and temporal variability. *Progress in Oceanography* 74(2-3):210-227
- Blaxter, J.H.S. (1969) Experimental rearing of Pilchard larvae, *Sardina pilchardus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **49**: 557-575
- Browman, H.I., O'Brien, W.J., (1992a). The ontogeny of search behavior in the white crappie *Pomoxis annularis*. *Environmental Biology of Fishes*. **34**:181–195. doi:10.1007/BF00002393
- Browman, H.I., O'Brien, W.J., (1992b). Foraging and prey-search behaviour of golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**:813–819. doi:10.1139/ f92-092

- Brett, J.R., (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of Fishery Research Board Can* **21**:1183–1226.
- Caldarone E.M., Wagner M., St Onge-Burns J., Buckley L.J., (2001) Protocol and guide for estimating nucleic acids in larval fish using a fluorescence microplate reader. *Northeast Fisheries Science Center Ref Doc 01–11*:11–22
- Caldarone, E.M., Clemmesen, C.M., Berdalet, E., Miller, T.J., Folkvord, A., Holt, G.J., Olivar, M.P., Suthers, I.M., (2006). Intercalibration of four spectrofluorometric protocols for measuring RNA/DNA ratios in larval and juvenile fish. *Limnology and Oceanography: Methods*, 4 pp. 153–163
- Chesney, E. J. (2008). Foraging behavior of bay anchovy larvae, *Anchoa mitchilli*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **362**:117–124.
- Chícharo, M.A., (1998) Nutritional condition and starvation in *Sardina pilchardus* (L.) larvae off southern Portugal compared with some environmental factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **225**:123–137
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., (2008). RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *International Journal of Molecular Sciences*, **9**:1453-147
- Chícharo, M.A., Amaral, A., Faria, A., Morais, P., Mendes, C., Piló, D., Ben-Hamadou, R., Chícharo, L., (2012). Are tidal lagoons ecologically relevant to larval recruitment of small pelagic fish? An approach using nutritional condition and growth rate, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2012.07.033>
- Chick, J.H., Van Den Avyle, M.J., (2000). Effects of feeding ration on larval swimming speed and responsiveness to predator attacks: implications for cohort survival. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**:106–115
- Clark, D.L., Leis, JM, Hay AC, Trnski T (2005) Swimming ontogeny of larvae of four temperate marine fishes. *Marine Ecology Progress Series* **292**:287–300

- Cushing, D.H., (1990). Plankton production and year class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Advances in Marine Biology* **26**:249-293
- Diaz, E., Txurruka, J.M., Villate, F. (2011). Growth maximization in early sardine larvae: a metabolic approach. *Marine Biology*. **158**:1135–1148
- dos Santos A., Santos, A.M.P., Conway, D.V.P., Bartilotti, C., Lourenco, P., Queiroga, H., (2008). Diel vertical migration of decapod larvae in the Portuguese coastal upwelling ecosystem: implications for offshore transport. *Marine Ecology Progress Series* **359**:171–183
- Dower, J.F., Miller, T.J. and Leggett, W.C. (1997) The role of microscale turbulence in the feeding ecology of larval fish. *Advances in Marine Biology* **31**:69±220
- Faria, A., Ojanguren, A., Fuiman, L., Gonçalves, E., (2009). Ontogeny of Critical Swimming speed of wild-caught and laboratory-reared larvae of Red Drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Ecology Progress Series*. **384**:221-230
- Faria, A.M., Chícharo, M.A., Gonçalves, E.J., (2011a). Effects of starvation on swimming performance and body condition of presettlement *Sparus aurata* larvae. *Aquatic Biology*. **12**:281-289
- Faria, A.M., Muha, T., Morote, E., Chícharo, M.A., (2011b). Influence of starvation on the critical swimming behavior of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its relationship with RNA/DNA ratios during ontogeny. *Scientia Marina*. **75**:87–94.
- Ferron, A., Leggett, W.C., (1994). An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Advances in Marine Biology*. **30**:217–286
- Figueiredo, I.M., Santos, A.M.P., (1989). Reproductive biology of *Sardina pilchardus* (Walb.): seasonal maturity evolution (1986 to 1988). *ICES CM 1989/H:40*, 4pp.
- Fisher, R., Wilson, S.K., (2004). Maximum sustainable swimming speeds of late-stage larvae of nine species of reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **312**:171- 186.

- Fisher, R., (2005). Swimming speeds of larval coral reef fishes: impacts on self-recruitment and dispersal. *Marine Ecology Progress Series* **285**:223-232.
- Fisher, R., Leis, J.M., Clark, D.L. and Wilson, S.K. (2005). Critical swimming speeds of latestage coral reef fish larvae: variation within species, among species and between locations. *Marine Biology* **147**:1201-1212.
- Fogarty, M.J., Sissenwine, M.P., Cohen, E.B., (1991). Recruitment variability and the dynamics of exploited marine populations. *Trends in Ecology and Evolution* **6**:241-246.
- Fuiman, L.A., Higgs, D.M., (1997). Ontogeny, growth and the recruitment process. In *Early Life History and Recruitment in Fish Populations* (ed. R. C. Chambers and E. A. Trippel), pp. 225–249. London: Chapman & Hall
- Fuiman, L.A., (2002). Special considerations of Fish Eggs and Larvae. In *Fishery Science –The unique contributions of early life stages*. LA Fuiman and RG Werner (Eds). Blackwell Science Ltd, 1-32
- Green, B.S., Fisher, R., (2004). Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **299**(1):115-132.
- Guan, L., Snelgrove, P.V.R., Gamperl, A.K., (2008). Ontogenetic changes in the critical swimming speed of *Gadus morhua* (Atlantic cod) and *Myoxocephalus scorpius* (shorthorn sculpin) larvae and the role of temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **360**:31-38
- Hare, J.A., Cowen, R.K., (1997). Size, growth, development and survival of the planktonic larvae of *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae). *Ecology*. **78**:2415–2431
- Helfman, G.S., (1994). Adaptive variability and mode choice in foraging fishes. In: Stouder DJ, Fresh KL, Feller RJ (eds) *Theory and application in fish feeding ecology*. University of South Carolina Press, Columbia, South Carolina, 3-17

- Hjort, J., (1914). Fluctuations in the great fisheries of the northern Europe reviewed in the light of biological research. *Rapports et Process.-verbeaux des Reunions, Conseil International pour l'Exploration de la Mer.* **20**:1-228.
- Houde, E.D., (1987). Fish early life dynamics and recruitment variability. *American Fisheries Society Symposium.* **2**:17–29.
- Houde, E.D., (1989). Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: Temperature and implied latitudinal effects. *Fishery Bulletin.* **87**:471-495.
- Houde, E.D., (2001). Fish Larvae. In: *Encyclopedia of Ocean Sciences.* JH Steele, S Thorpe and K Turekian (Eds.), Academic Press, London. 928-938.
- Houde, E.D., (2002). Mortality. In *Fishery Science – The unique contributions of early life stages.* LA Fuiman and RG Werner (Eds). Blackwell Science Ltd, 64-87.
- Hunt von Herbing, I. (2002). Effects of temperature on larval fish swimming performance: the importance of physics to physiology. *Journal of Fish Biology.* **61**:865-876
- Hunt von Herbing, I. & Gallager, .S.M., (2000). Foraging behavior in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) feeding on a protozoan (*Balanion* sp.) and a copepod nauplius (*Pseudodiaptomus* sp.). *Marine Biology* **136**:591–602.
- Hunter, J.R., (1972). Swimming and feeding behaviour of larval anchovy *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin U.S.* **70**:821-838
- Hunter, J. R. (1976). Culture and growth of northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae. *Fishery Bulletin U.S.* 7431-88.
- Iles, T.D., Sinclair, M., (1982). Atlantic herring: stock discreteness and abundance. *Science* **215**:627-633
- Jenkins G.P., Keough M.J., Hamer, P.A., (1998). The contributions of habitat structure and larval supply to broad-scale recruitment variability in a temperate zone, seagrass-associated fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **226**:259–278

- Leggett, W.C., Deblois, E., (1994). Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages? *Netherlands Journal of Sea Research*. **32**:119–134.
- Leis, J.M., Carson-Ewart, B.M., (1997). In situ swimming speeds of the late pelagic larvae of some Indo-Pacific coral-reef fishes. *Marine Ecology Progress Series* **159**:165-174.
- Leis, J.M., Stobutzki, I.C., (1999). Swimming performance of late pelagic larvae of coral-reef fishes: in situ and laboratory-based measurements. In "Proceedings of the 5th Indo-Pacific Fish Conference, Noumea, 1997" (B. Seret & J.-Y. Sire, eds.), pp. 575-583.
- Leis, J.M., Fisher, R., (2006). Swimming speed of settlement-stage reef-fish larvae measured in the laboratory and in the field: A comparison of critical speed and in situ speed. *Proceedings of the 10th International Coral Reef Symposium, Okinawa*, 438-445.
- Leis, J.M., (2006). Are larvae of demersal fishes plankton or nekton?. *Advances in Marine Biology* **51**:57-141
- Leis, J.M., Hay, A.C., Lockett, M.M., Chen, J.P., Fang, L.S., (2007). Ontogeny of swimming speed in larvae of pelagic-spawning, tropical, marine fishes. *Marine Ecology Progress Series* **349**:255-267
- Leis, J.M., Hay, A.C., Howarth, G.J., (2009a). Ontogeny of in situ behaviours relevant to dispersal and population connectivity in larvae of coral-reef fishes. *Marine Ecology Progress Series* **379**:163–179.
- Leis, J.M., Piola, R.F., Hay, A.C., Wen, C., Kan, K.P., (2009b). Ontogeny of behaviour relevant to dispersal and connectivity in the larvae of two non-reef demersal, tropical fish species. *Mar. Fresh. Res.*, **60**: 211–223.
- Leis, J.M. (2010). Ontogeny of behaviour in larvae of marine demersal fishes. *Ichthyology Research*. **57**: 325-342.

- Leis, J.M., Bullock, S., Duday, A., Guion, C., Galzin, R. (2012) Development of morphology and swimming in larvae of a coral-reef fish, the royal gramma, *Gramma loreto* (Grammatidae: Teleostei). *SCI. MAR.*, **76**(2):281-288. ISSN 0214-8358 doi: 10.3989/scimar.03409.03A
- Litvak, M.K., Leggett, W.C., (1992). Age and size-selective predation on larval fishes: the bigger-is-better hypothesis revisited. *Marine Ecology Progress Series* **81**:13–24
- Lluch-Belda, D., Crawford, R.J.M., Kawasaki, T., MacCall, A.D., Parrish, R.H., Schwartzlose, R.A., Smith, P.E., (1989). World-wide fluctuations of sardine and anchovy stocks: the regime problem. *South African Journal of Marine Science*. **8**:195-205.
- Miller, T., Crowder, L.B., Rice, J.A., Marschall, E.A., (1988). Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **45**:1657–1670
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A., (1993) Ontogenetic changes in behavioural and histological measures of visual acuity in three species of fish. *Environmental Biology of Fishes* **37**:1–8
- Morote, E., Olivar, M.P., Villate, F., Uriarte, I., (2010). A comparison of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) larvae feeding in the Northwest Mediterranean: influence of prey availability and ontogeny. *ICES Journal of Marine Science* **67**: 897–908
- Munk, P., Kiørboe, T. (1985) Feeding behaviour and swimming activity of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to density of copepod nauplii. *Marine Ecology Progress Series* **24**:15–21. doi:10.3354/meps024015
- Munk, P., (1995). Foraging behaviour of larval cod (*Gadus morhua*) influenced by prey density and hunger. *Marine Biology* **122**:205–212

- Neilson, J.D., Perry, R.I., Valerio, P., Waiwood, K. G., (1986). Condition of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae after the transition to exogenous feeding: morphometrics, buoyancy and predator avoidance. *Marine Ecology Progress Series* **32**:229-35.
- O'Brien, W.J., Evans, B.I., Browman, H.I., (1989). Flexible search tactics and efficient foraging in saltatory searching animals. *Oecologia* **80**:100±110
- O'Brien, W.J., Browman, H.I., Evans, B.I., (1990). Search strategies in foraging animals. *American Scientist* **78**:152±160
- Patrick, P., Strydom, N.A., (2009). Swimming abilities of wild-caught, late-stage larvae of *Diplodus capensis* and *Sarpa salpa* (Pisces: Sparidae) from temperate South Africa. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **85**:547–554
- Parrish, R.H., Serra, R., Grant, W.S., (1989). The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**:2019–2036.
- Plaut, I., (2001). Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **131**:41-50
- Ramzi, A., Hbid, M. L., and Ettahiri, O. (2006). Larval dynamics and recruitment modelling of the Moroccan Atlantic coast sardine (*Sardina pilchardus*). *Ecological Modelling*. **197**:296–302.
- Ré, P. (1983). Growth of pilchard larvae, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) in relation to some environmental factors. *Investigación Pesquera*, **47** (2): 277-283. (IF-0,635)
- Ré, P., Silva, R.C., Cunha, E., Farinha, A., Meneses, I., Moita, T., (1990). Sardine spawning off Portugal. *Boletim do Instituto Nacional de Investigação das Pescas* No. **15**:31–44.

- Santos, A.M.P., Peliz, A., Dubert, J., Oliveira, P.B., Angelico, M.M., Re, P., (2004). Impact of a winter upwelling event on the distribution and transport of sardine eggs and larvae off western Iberia: a retention mechanism. *Continental Shelf Research* **24**(2):149–165.
- Santos, A.M.P., Chicharo, A., Santos, A.D., Moita, T., Oliveira, P.B., Peliz, A., Re, P., (2007). Physical–biological interactions in the life history of small pelagic fish in the Western Iberia upwelling ecosystem. *Progress in Oceanography* **74**:192– 209.
- Sinclair, M., (1997). Prologue. Recruitment in fish populations: the paradigm shift generated by ICES Committee A. p.1-27, in: R.C. Chambers and Trippel E.A. Early life history and recruitment in fish populations. London: Chapman & Hall.
- Sinclair, M., (1988). *Marine Populations: an Essay on Population Regulation and Speciation*. Washington Sea Grant Program; Seattle, Washington
- Sponaugle, S., Cowen, R.K., Shanks, A., Morgan, S.G, Leis, J.M., et al. (2002). Predicting self-recruitment in marine populations: biophysical correlates and mechanisms. *Bulletin of Marine Science* **70**(Suppl.1):341–75
- Sponaugle S., Grorud-Colvert K., Pinkard D., (2006). Temperature-mediated variation in early life history traits and recruitment success of the coral reef fish *Thalassoma bifasciatum* in the Florida Keys. *Marine Ecology Progress Series* **308**:1–15
- Stobutzki, I.C., Bellwood, D.R., (1994). An analysis of the sustained swimming abilities of pre- and post-settlement coral reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **175**:275–286
- Stobutzki, I.C., Bellwood, D.R., (1997). Sustained swimming abilities of the late pelagic stages of coral reef fishes. *Marine Ecology Progress Series* **149**:35–41
- Suthers, I.M., (1998). Bigger? Fatter? Or is faster growth better? Considerations on condition in larval and juvenile coral-reef fish. *Australian Journal of Ecology* **23**:265–273

- Tojeira, I., Faria, A.M., Henriques, S., Faria, C., Gonçalves E.J., (2011). Early development and larval behaviour of two clingfishes, *Lepadogaster purpurea* and *Lepadogaster lepadogaster* (Pisces: Gobiesocidae). *Environmental Biology of Fishes* **93**, 449-459. DOI 10.1007/s10641-011-9935-7
- Utne-Palm, A.C., Stiansen, J.E., (2002). Effect of larval ontogeny, turbulence and light on prey attack rate and swimming activity in herring larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **268**:147 – 170.
- Vitorino, J., Coelho, E., (1998) Dynamics of the northern Portuguese shelf and related sediment transport processes, *Marinha - Instituto Hidrográfico*
- von Westernhagen, H., Rosenthal, H. (1979). Laboratory and in-situ studies on larval development and swimming performance of Pacific herring *Clupea harengus pallasii*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* **32**:539-549
- Warner, R.R., Cowen, R.K. (2002). Local retention of production in marine populations: evidence, mechanisms and consequences. *Bulletin of Marine Science* **70**:245-249.
- Webb, P.W., Weihs, D., (1986). Functional locomotor morphology of early life history stages of fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* **115**:115-127.