



**Manutenção e reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, *Gobiusculus flavescens*. Recurso para a aquariofilia ornamental**

**Vera Mónica Amaral Teles**

2014





**Manutenção e reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, *Gobiusculus flavescens*. Recurso para a aquariofilia ornamental**

**Vera Mónica Amaral Teles**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria para a obtenção do grau de Mestre em Aquacultura, realizada sob a orientação científica do Doutor Paulo Jorge de Sousa Maranhão, Professor na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria

2014



Título: Manutenção e reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, *Gobiusculus flavescens*. Recurso para a aquariofilia ornamental

*Copyright* © Vera Mónica Amaral Teles

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

---

Como me é impossível agradecer a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui o meu muito obrigado:

Ao meu orientador, Doutor Paulo Jorge de Sousa Maranhão, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e pela ajuda durante todo o trabalho desenvolvido.

À ESTM-IPL pelas instalações facultadas, que facilitaram o desenvolvimento desta tese.

Aos meus colegas e aos técnicos pela partilha de conhecimentos e pela ajuda durante as diferentes etapas deste trabalho.

Ao Hugo Morais e aos seus companheiros de mergulho pelos peixinhos que capturaram.

À Tata e à Lili por todo o apoio, ajuda, disponibilidade, paciência e amizade que sempre tiveram ao longo de todo o tempo.

À Ana Augusto por cuidar dos meus peixinhos sempre que foi necessário.

Ao Fábio pela ajuda, disponibilidade e paciência para me acompanhar à maré sempre que foi preciso.

À minha família e amigos por me apoiarem e acreditarem em mim.

À “Nina” a minha maninha do coração, por todo o apoio, ajuda, companheirismo e amizade durante toda a vida.

Ao meu pai e ao meu irmão por me aturarem e me apoiarem.

E um obrigado especial à minha mãe por me apoiar incondicionalmente e nunca me deixar desistir.



## Resumo

Desde que os ambientes aquáticos começaram a ser estudados, houve um aumento no interesse pelos animais que neles habitam. Nas últimas décadas, a procura por espécies com características ornamentais tem vindo a crescer. Com o aumento da procura ocorreu maior desenvolvimento das técnicas de cultivo, o que causou o aumento da produção pela aquacultura ornamental. A aquacultura ornamental desempenha por isso, um papel cada vez mais importante tanto a nível ambiental como comercial. Sendo cada vez mais importante o cultivo dessas espécies em cativeiro.

Devido às suas características a espécie *Gobiusculus flavescens* tem interesse para a aquariofilia, como tal, este trabalho teve como principais objetivos a manutenção e reprodução em cativeiro deste pequeno peixe marinho presente na costa portuguesa.

O trabalho laboratorial desenvolveu-se durante duas épocas reprodutivas desta espécie, de Março a Julho de 2013 e de Abril a Julho de 2014. O rácio utilizado nas experiências de reprodução foi de 2 machos para 4 fêmeas, em 12 aquários de 18L e 30L (6 aquários de cada), a uma temperatura de 18/19°C e 16°C, respetivamente.

No final da primeira época reprodutiva foram obtidas 9 posturas, das quais apenas 3 obtiveram sucesso. O tempo de incubação variou de 3 a 8 dias, quando os ovos estavam maduros as larvas eclodiam num recipiente separado dos reprodutores. As larvas obtidas nesta época reprodutiva apresentaram uma sobrevivência larvar até 21 dias. Na segunda época reprodutiva, foram obtidas 18 posturas das quais 12 tiveram sucesso tendo as larvas sobrevivido no máximo 18 dias.

Os resultados obtidos durante este trabalho mostraram que as larvas do caboz-de-duas-pintas (*Gobiusculus flavescens*) são muito sensíveis a fatores externos, o que demonstra que são necessários mais estudos para melhorar a metodologia de cultivo deste pequeno peixe marinho com uma distribuição tão alargada.

Palavras-chave: Reprodução, *Gobiusculus flavescens*, desova, larvas, sobrevivência.



## Abstract

Since aquatic environments began to be studied, there was an increased interest in the animals that inhabit in them. In the last decades, the demand for species with ornamental features have been growing. With the increase in demand occurred further development of cultivation techniques, which caused an increase in production by the ornamental aquaculture. The ornamental aquaculture plays therefore, increasingly important both environmentally and commercial paper. Being increasingly important to the cultivation of these species in captivity.

The *Gobiusculus flavescens* is a species of interest to the aquarium hobby, as such, this work had as main objective the maintenance and breeding in captivity of this small marine fish present in the Portuguese coast.

The laboratory work was developed over two reproductive seasons of this species, from March to July 2013 and from April to July 2014. The ratio used on the breeding experiments was 2 males to 4 females, on 12 tanks 18L and 30L (6 aquariums each) at a temperature of 18/19 ° C and 16 ° C, respectively.

At the end of the first breeding season was obtained nine spawning of which only three were successful. The incubation time varied from 3 to 8 days, when the eggs were mature larvae hatched from reproducers in a separate container. Larvae obtained from this breeding season had a larval survival to 21 days. In the second breeding season, we obtained 18 spawning of which 12 were successful with the larvae survived 18 days at most.

The results obtained during this work showed that the larvae of two-spotted goby (*Gobiusculus flavescens*) are very sensitive to external factors, which demonstrates that more studies are needed to improve the methodology of fish farming of small marine fish with a distribution as wide.

Keywords: Reproduction, *Gobiusculus flavescens*, survival, spawning, larvae.



## Índice de matérias

---

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	7
3 Material e Métodos.....	9
Parte 1 – Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2013	
3.1 Local de captura e recolha.....	9
3.2 Aclimatização e manutenção.....	10
3.3 Desenho experimental e experiência laboratorial.....	11
3.4 Características físico-químicas do sistema.....	12
3.5 Manutenção das larvas de <i>G. flavescens</i> .....	12
Parte 2 – Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2014	
3.6 Local de captura e recolha.....	14
3.7 Aclimatização e manutenção.....	15
3.8 Desenho experimental e experiência laboratorial.....	15
3.9 Características físico-químicas do sistema.....	16
3.10 Manutenção das larvas de <i>G. flavescens</i> .....	17
4 Resultados.....	19
4.1 Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2013.....	19
4.2 Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2014.....	23
4.3 Comportamento agnóstico, corte e desova.....	26
5 Discussão e Conclusão.....	27
6 Perspetivas Futuras.....	33
7 Referências Bibliográficas.....	35
Anexo I.....	39



## Índice de figuras

---

Figura 1 – <i>Gobiusculus flavescens</i> , fêmea em cima e macho em baixo .....	3
Figura 2 – Mapa de distribuição de <i>Gobiusculus flavescens</i> .....	4
Figura 3 – Local de recolha, praia do Porto da Areia Norte (Peniche).....	9
Figura 4 – Sistema de aclimatização.....	10
Figura 5 – Desenho experimental (esquerda), fotografia do sistema reprodutivo 2013 (direita).....	12
Figura 6 – Larvas recém-eclodidas de <i>Gobiusculus flavescens</i> .....	13
Figura 7 – Local de recolha, Porto da Areia Sul (A) e saída do porto de pesca de Peniche (B).....	14
Figura 8 – Desenho experimental (em baixo), sistema para a experiência reprodutiva 2014 (em cima).....	16
Figura 9 – Garrafa para eclosão das larvas.....	18
Figura 10 – Sobrevivência larvar das posturas da época reprodutiva 2013.....	20
Figura 11 – Larva de <i>Gobiusculus flavescens</i> com malformações.....	21
Figura 12 – Larva de <i>Gobiusculus flavescens</i> com pigmentação na cabeça e zona dorsal.....	24
Figura 13 – Sobrevivência larvar das posturas da época reprodutiva 2014.....	25
Figura 14 – Fêmea a depositar os ovos (esquerda) e macho a guardar o ninho (direita).....	26



## Índice de tabelas

---

Tabela I – Posturas ocorridas durante a experiência reprodutiva de 2013.....	19
Tabela II – Posturas ocorridas durante a experiência com resguardo.....	21
Tabela III – Posturas ocorridas durante a experiência reprodutiva de 2014.....	23
Tabela IV – Taxa de eclosão e de ovos mortos/não viáveis das posturas com sucesso.....	25

## **1. Introdução**

Os primeiros peixes como hoje conhecemos pertencem a uma linhagem com mais de 400 milhões de anos. A maioria destes peixes são vertebrados e possuem vertebras que protegem a medula espinal, vive na água, respiram principalmente através de branquias em vez de pulmões, têm barbatanas para locomoção, são incapazes de regular a temperatura interna e escamas que cobrem o corpo para proteção (Wiley e Johnson, 2010). O grupo mais diversificado dos vertebrados são os peixes (cerca de 42%) e estes habitam os mais diversos ambientes aquáticos que há no mundo, pois possuem muitos e variadas modificações a nível morfológico, fisiológico e até a nível comportamental (Bone e Moore, 2008). Porém, somente há aproximadamente 60 anos, é que os ambientes aquáticos foram objeto de estudo científico intenso. Com o avanço de novas tecnologias e a invenção de equipamento de mergulho com garrafa de ar comprimido, surgiram novas oportunidades que permitiram aos cientistas e investigadores uma observação mais próxima do comportamento natural de muitas espécies. Registos arqueológicos provam que desde os tempos pré-históricos, os peixes são utilizados como fonte de alimentação de tribos costeiras e das povoações mais próximas de lagos e rios. Contudo, só a partir dos tempos egípcios se teve conhecimento de que os peixes eram mantidos e criados em cativeiro não só para alimentação humana mas também para decoração devido às suas características ornamentais e à sua beleza (Scott, 1996).

Nas últimas duas décadas, tem vindo a aumentar a procura de espécies ornamentais pela aquariofilia, o que levou a um maior desenvolvimento das técnicas de cultivo e ao aumento da produção pela aquacultura ornamental (Scott, 1996). É importante fazer a distinção entre aquariofilia e aquacultura ornamental, sendo a primeira um hobby algo complexo que necessita de conhecimentos básicos de biologia, física e química e até matemática. A aquacultura ornamental tem como função a produção em cativeiro de peixes e outros organismos aquáticos, desde plantas, corais e outros invertebrados, que passa pela reprodução, larvicultura e crescimento desses organismos na sua maioria para comercialização (Ribeiro, 2008). Enquanto os aquários e tanques utilizados para a produção em aquacultura ornamental são simples e com as condições adequadas à produção, manutenção e crescimento da espécie cultivada, os aquários ornamentais domésticos são normalmente complexos e elaborados e abrigam várias espécies simulando ambientes naturais (Ribeiro, 2008).

A aquacultura ornamental desempenha cada vez mais um papel importante nos dias de hoje e tem benefícios tanto a nível ambiental como comercial. O primeiro benefício da aquacultura ornamental foca-se na conservação das espécies e na produção de espécies difíceis de obter do meio selvagem, incluindo animais raros no ambiente natural, animais que apesar de se encontrarem em grande número no seu habitat natural são raros a nível comercial, bem como nos casos em que a procura não consegue ser correspondida pela captura selvagem. O segundo benefício é a minimização dos danos causados no ambiente ou maximização dos benefícios ambientais, tendo ainda como benefício final a produção e criação de novas variedades de cores e tipos/formas de corpo para o aumento da oferta comercial e variedade (Tlusty, 2002).

Nos peixes ornamentais, a reprodução pode variar entre indivíduos e segundo as estações do ano, tendo a temperatura da água um papel importante neste campo (Griffith e Pryke, 2006; Griffith e Sheldon, 2001). Durante muito tempo, as preferências de acasalamento e os comportamentos reprodutivos foram considerados como tendo um padrão uniforme dentro de cada espécie. No entanto, novos estudos demonstraram que os processos de seleção sexual e os papéis nestes desempenhados não são necessariamente fixos, mas podem variar dentro das populações e entre populações (Houde, 2001). É preciso esclarecer que os benefícios e os custos da escolha do parceiro ou parceiros sexuais podem variar no tempo e no espaço, sendo por isso esperado que esta escolha seja variável. Estudos recentes mostram que a seleção do parceiro sexual é influenciada por vários fatores externos como os níveis de oxigénio, a presença/ausência de predadores, a densidade/disponibilidade de parceiros, qualidade dos parceiros e a própria qualidade dos indivíduos que fazem a escolha bem como a proporção sexual existente na população (Amundsen e Forsgren, 2003).

Quando o tamanho da fêmea está correlacionado com a fecundidade é esperado que o macho tenha preferência por fêmeas grandes para acasalar. Quando as fêmeas do caboz-de-duas-pintas estão sexualmente maduras, o ventre tem uma coloração laranja forte. Esta coloração é provocada pelas gonadas ricas em carotenoides que são visíveis pela pele do abdómen e pela pigmentação do cromatóforo na pele (Pélabon et al, 2003; Svensson et al, 2008).

A espécie *Gobiusculus flavescens* (caboz-de-duas-pintas) é um gobídeo que pertence ao filo Chordata, classe Actinopterygii (peixes com barbatanas com raios) e à ordem dos Perciformes, atingem um comprimento máximo de cerca de 6 cm e têm uma longevidade de 2 anos (Campbell, 2006; Picton e Morrow, 2010). Sendo uma espécie

pelágica de pequenas dimensões que se encontra em cardumes, principalmente em zonas entre marés e no infralitoral até aos 20 metros de profundidade em redor de algas como as laminárias ou *Zostera*, são fáceis de distinguir das outras espécies de cabozes que são bentónicas. O caboz-de-duas-pintas é um pequeno peixe marinho planctívoro que se alimenta de pequenos crustáceos como misidáceos, artémia e copépodes (Bone e Moore, 2008).

Esta espécie tem os olhos muito separados bem como as barbatanas dorsais que apresentam a parte superior sem raios e a segunda barbatana dorsal mais comprida que a primeira e com sete raios. A parte superior do corpo (dorso) é acastanhada, com manchas azuladas ao longo do corpo e o ventre é branco amarelado (fig 1).



Figura 1 – *Gobiusculus flavescens*, fêmea em cima e macho em baixo.

É uma espécie com dimorfismo sexual, tendo os machos duas pintas pretas, uma ao nível da barbatana peitoral e outra na origem da barbatana caudal e as fêmeas apenas uma na origem da barbatana caudal. Quando se encontram sexualmente maduras, as fêmeas desenvolvem uma barriga alaranjada e proeminente (fig. 1). Os machos têm maior preferência por fêmeas mais coloridas para acasalar de modo a aumentar o sucesso reprodutivo (Amundsen e Forgren, 2001). A barriga nupcial das fêmeas é originada pelos ovos ricos em carotenoides e de elevada qualidade que são visíveis através da pele da parede abdominal que é semitransparente (Svensson et al, 2005). Os ovos ricos em

carotenoides têm exibido maior qualidade ao nível do êxito de eclosão, do aumento da taxa de fertilização e sobrevivência larvar (Ahmadi et al, 2006).

Durante a época reprodutiva, os machos fazem ninhos com conchas vazias ou algas onde as fêmeas põem os ovos dos quais o macho cuida desde a fertilização até à eclosão. As fêmeas têm preferência pelos machos maiores e mais coloridos, por serem bons competidores e por defenderem melhor os ninhos. A seletividade das fêmeas vai diminuindo ao longo da época de acasalamento consoante as condições ambientais e a estação do ano. As fêmeas são mais exigentes quando há muita variedade na qualidade e na quantidade de machos mas são menos seletivas quando há menor variedade na qualidade dos machos e menor quantidade. A disponibilidade de machos é diferente ao longo da época reprodutiva. Em Março há maior seletividade (início da época reprodutiva) e em Julho/Agosto a seletividade é menor ou quase inexistente (final da época reprodutiva). Os machos maiores para além de serem mais férteis são melhores competidores do que os outros machos e cuidam melhor do ninho e dos ovos. No final da época reprodutiva, a competição masculina e o comportamento agnóstico diminui sendo a escolha do parceiro influenciada pela corte e pelo comportamento agnóstico entre os indivíduos (Borg et al, 2006).

Esta espécie distribui-se pelo Oceano Atlântico, desde o Canal da Mancha até ao Mar Báltico e ao Mar do Norte (Campbell, 2006; Saldanha, 1995) (fig.2).



Figura 2 – Mapa de distribuição de *Gobiussculus flavescens*

Para se poder conhecer melhor as características e o modo como os recursos selvagens podem ser explorados é importante estudar melhor os recursos selvagens e as suas espécies. Sendo *G. flavescens* uma espécie selvagem, e com interesse para a aquacultura ornamental tem vindo a ser objeto de vários estudos. Estudos anteriores (Maranhão et al (aceite para publicação), Silva e Teles, 2011) mostraram que o caboz-de-duas-pintas é uma espécie que pode sobreviver numa gama de temperaturas alargada (6/7°C a 23/24°C) mas, sendo uma espécie encontrada em águas mais frias apresenta um melhor desenvolvimento em temperaturas abaixo dos 18°C. A baixa taxa de mortalidade obtida no período de aclimatização mostra que o *G. flavescens* é uma espécie de fácil manutenção e devido às suas características ornamentais é uma espécie importante e com grande interesse para a aquacultura ornamental (Maranhão et al (aceite para publicação), Silva e Teles, 2011).

Com o aumento da aquariofilia ornamental a nível mundial nos últimos anos, houve um aumento na procura de peixes marinhos para fins ornamentais. A utilização de espécies comuns da costa portuguesa em aquariofilia ornamental proporciona uma boa oportunidade para a rentabilização dos recursos marinhos em Portugal (Silva e Teles, 2011).



## 2. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivos a manutenção e reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, *Gobiusculus flavescens*, presente na costa portuguesa.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Manutenção em cativeiro de exemplares da espécie *G. flavescens* provenientes da costa portuguesa.
- Reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas em condições controladas laboratorialmente.
- Manutenção e crescimento das larvas obtidas em cativeiro.



### 3. Material e Métodos

#### Parte 1 – Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2013

##### 3.1 Local de captura e recolha

Os exemplares da espécie em estudo foram capturados com o auxílio de camaroeiros e foram seguidamente transportados para o laboratório em baldes com água do mar recolhida no local. No dia 1 de Março de 2013 na praia do Porto da Areia Norte em Peniche (fig.3), foram capturados 63 indivíduos da espécie *G. flavescens*. Nos dias 24 e 26 de Abril foram recolhidos mais 20 novos indivíduos para renovação de stock dos reprodutores. A preferência pelo local de captura escolhido deveu-se ao facto deste possuir as características do habitat da espécie em estudo, como zonas rochosas com fundos arenosos com algas e pedras soltas ou conchas vazias que lhes possam servir de abrigo. As características deste local permitem ainda que em maré baixa se formem pequenas poças de água entre as rochas expostas onde os peixes ficam abrigados e consequentemente presos durante esta fase, permitindo assim uma captura mais fácil dos indivíduos.



Figura 3 – Local de recolha, praia do Porto da Areia Norte (Peniche).

### 3.2 Aclimatização e manutenção

Após captura e transporte para o laboratório, os indivíduos foram colocados em dois aquários de 60L com sistema de recirculação de água e arejamento através de um tubo com pedra difusora (fig. 4). Os aquários foram mantidos a uma temperatura de 18/19°C, com uma salinidade de 37. De modo a manter a água o mais limpa possível eram efetuadas trocas parciais da água dos aquários, cerca de metade do volume total, uma vez por semana e após a administração da alimentação os aquários eram sifonados. Durante todo o período de aclimatização os indivíduos foram alimentados todos os dias com uma mistura de *Mysis* e *Artemia* congelada da marca *Ocean Nutrition*. O fotoperíodo utilizado foi o natural do laboratório. Foi colocada uma rede na parte superior do aquário de modo a evitar que os peixes saltassem para fora deste e morressem.

Os peixes foram mantidos nestes aquários durante 21 dias para permitir a sua aclimatização ao ambiente laboratorial. Os machos e as fêmeas foram mantidos em aquários separados e sem visibilidade entre aquários para evitar competição e comportamentos agnósticos. Posteriormente foram selecionados os indivíduos machos mais pequenos e conseqüentemente mais frágeis e retirados do aquário dos machos devido aos comportamentos agressivos dos machos maiores.



Figura 4 – Sistema de aclimatização.

### 3.3 Desenho experimental e experiência laboratorial

No início do mês de Março de 2013 montou-se o sistema onde ocorreu a primeira parte da experiência de reprodução do *G. flavescens*. Esta primeira etapa teve um tempo de duração de 112 dias, tendo terminado no dia 28 de Junho de 2013. No dia 3 de Junho colocou-se plástico preto em volta dos aquários da reprodução e dando-se assim início a uma segunda parte da experiência, denominada “com resguardo”.

A partir dos indivíduos já separados anteriormente foi feita uma nova seleção consoante as suas características reprodutivas. Deste modo, foram escolhidos os machos maiores que apresentavam características estéticas mais atrativas, como barbatanas dorsais maiores e mais coloridas, e as fêmeas que tinham o ventre mais alaranjado. O *sex ratio* utilizado nesta experiência foi de 2 machos para 4 fêmeas em cada aquário do sistema como utilizado por Jong et al (2009) e seguindo o princípio descrito por Svensson et al (2008).

A experiência desenvolveu-se durante 112 dias e foi realizada num sistema de 6 aquários de 18 L, com recirculação de água e filtração realizada por uma SUMP constituída por filtros, esponjas e biobolas. Para a realização da experiência reprodutiva foram utilizadas as mesmas condições utilizadas para a aclimatização dos indivíduos. Para garantir que a água se mantinha o mais limpa possível foram executados regularmente procedimentos de limpeza dos aquários, como a sifonagem dos fundos para retirar restos de alimento e matéria orgânica produzida pelos peixes.

Nos aquários foram colocados tubos de PVC previamente cortados com 8 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento para servirem de ninhos. Em três dos aquários foram colocados 2 tubos no fundo (opção A) e nos outros três foram colocados 2 tubos no fundo e outros dois em suspensão com o auxílio de fio de pesca preso nas redes de proteção colocadas por cima dos aquários (opção B) (fig.5).

Apos já ter decorrido mais de metade do tempo da experiência (65 dias), testou-se a possibilidade da reprodução ocorrer com maior facilidade com os aquários resguardados. Para essa finalidade, foi utilizado um material preto e baço para cobrir os aquários, de modo a que os indivíduos se sentissem mais seguros e não fossem perturbados pelo movimento no laboratório. Para esta fase da experiência alguns dos reprodutores foram substituídos por novos reprodutores, 2 fêmeas e 3 machos, uma vez que apresentavam sinais de agressões (barbatanas mordidas).

A dieta administrada durante a experiência aos reprodutores foi constituída por *Mysis* e *Artemia* congelada da marca *Ocean Nutrition*, a qual mostrou recetividade positiva.

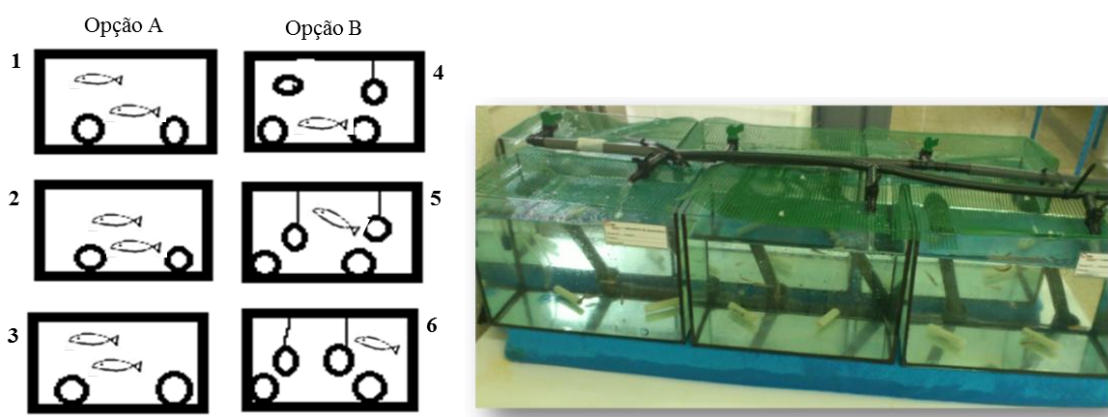


Figura 5 – Desenho experimental (esquerda), fotografia do sistema reprodutivo 2013 (direita).

### 3.4 Características físico-químicas do sistema

Durante a experiência, os indivíduos foram mantidos a uma temperatura de 18-19°C com o auxílio de termoacumuladores de frio, a uma salinidade de 37 e um nível de oxigénio dissolvido nos 7 mg/L. Manteve-se o fotoperíodo natural do laboratório. Para a medição destes parâmetros foi utilizado, diariamente, um refratómetro modelo RHS-10ATC e um oxímetro modelo Oxy-Check HI9147, permitindo assim garantir que o sistema se encontrava nas condições ideais para que ocorresse a reprodução da espécie em estudo. Os parâmetros físico-químicos como a amónia, os nitritos e nitratos, o pH e os fosfatos foram quantificados semanalmente com kits comerciais da marca *Sera test* e *Nutrafin test*.

### 3.5 Manutenção das larvas de *G. flavescens*

Quando os ovos se encontravam maduros e prontos para eclodir, o tubo onde se encontravam era transferido para um recipiente com água salgada (salinidade 37) e arejamento fraco de modo a manter as larvas em suspensão na água mas sem causar resistência. Depois de todas as larvas eclodirem (fig. 6), eram recolhidas amostras e observadas à lupa para verificar se já apresentavam a boca aberta. A primeira alimentação

era administrada após abertura da boca e era constituída por rotíferos cultivados em *Isocrysis galbana* (microalga) de modo a fornecer um alimento rico e completo às larvas (anexo I).

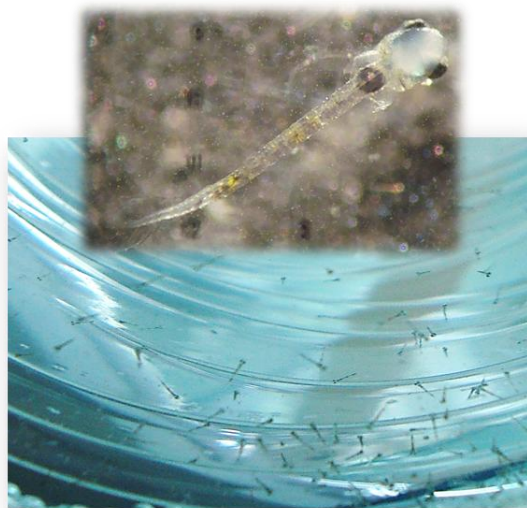


Figura 6 – Larvas recém-eclodidas de *Gobiusc ulus flavescens*.

A contabilização das larvas foi sempre realizada a olho nu e, inicialmente eram repartidas por vários recipientes com água salgada para facilitar a contagem. Ao longo do tempo e com a morte das larvas, a contagem era efetuada diretamente no recipiente de eclosão.

O recipiente onde se encontravam as larvas era limpo diariamente, através da filtração da água por uma pedra difusora e foram efetuadas trocas parciais de água (cerca de metade do volume total do sistema) para manter os parâmetros adequados. Os parâmetros eram medidos diariamente e com o mesmo equipamento que era utilizado para os adultos.

Nas posturas seguintes, o recipiente onde se encontravam as larvas foi colocado num sistema de tanques de 500L com temperatura controlada, permitindo assim baixar a temperatura da água do recipiente até aos 16°C. Manteve-se um maior controlo dos nitratos de modo a que estes se mantivessem próximos dos 0 mg/ml. Foram também colocadas pequenas placas de esferovite em redor do recipiente de maneira a que este tivesse maior estabilidade e para garantir que a água do sistema dos tanques também não se misturasse com a do recipiente.

## Parte 2 – experiência reprodutiva realizada na época reprodutiva de 2014

### 3.6 Local de captura e recolha

Os indivíduos utilizados para a segunda parte deste trabalho foram capturados com o recurso a mergulho com escafandro autónomo na zona costeira de Peniche, no Porto da Areia Sul e junto à saída do porto de pesca de Peniche (fig. 7). Nos dias 15 e 17 de Abril de 2014 foram capturados 9 machos e 15 fêmeas, tendo sido transportados para o laboratório em recipientes com água do mar e arejamento. Posteriormente foram capturados mais 20 indivíduos (11 machos e 9 fêmeas).

A mudança de técnica de captura e de local de recolha deveu-se às más condições climatéricas que se verificaram ao longo dos meses que antecederam o início da experiência. As fortes tempestades ocorridas durante o Inverno e mesmo na Primavera, não permitiram a recolha na praia. Mesmo quando as condições climatéricas e do mar estavam mais calmas não foi possível recolher os indivíduos durante a maré baixa pois estes não se encontravam nas poças que se formam nas zonas rochosas da praia quando a maré baixa.



Figura 7 – Local de recolha, Porto da Areia Sul (A) e saída do porto de pesca de Peniche (B).

### **3.7 Aclimatização e manutenção**

Após terem sido transportados para o laboratório, os indivíduos foram colocados em aquários de 30 L com recirculação de água, sistema de filtração com recurso a escumador e sistema de refrigeração (refrigerador Hailea, modelo:HC-300A). Os machos e as fêmeas foram colocados em aquários separados e os machos mais pequenos foram seleccionados e colocados noutra aquário para evitar comportamentos agressivos por parte dos machos maiores. O período de aclimatização dos reprodutores ao sistema foi de 23 dias.

O sistema encontrava-se a 16 °C com uma salinidade de 35 e os parâmetros físico-químicos como a amónia, nitritos, nitratos, fosfatos e pH foram controlados semanalmente através de kits comerciais (*Sera test* e *Nutrafin test*).

### **3.8 Desenho experimental e experiência laboratorial**

Nesta segunda etapa do trabalho, o desenho experimental sofreu algumas modificações bem como a metodologia do mesmo. A experiência realizou-se em 5 aquários de 30 L que faziam parte do sistema descrito anteriormente para a aclimatização dos reprodutores (fig. 8). A experiência reprodutiva foi realizada durante 100 dias.

Foram, novamente, escolhidos os indivíduos com as melhores características e distribuídos pelos aquários numa proporção de 2 machos para 4 fêmeas em cada aquário, como utilizado por Jong et al (2009), e uma vez que se tinha tido sucesso na experiência realizada em 2013.

Em cada aquário foram colocados dois tubos de PVC, com 8 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento, no fundo do aquário para servirem de ninho como se tinha utilizado anteriormente. Como se verificou na experiência anterior que não houve qualquer postura nos tubos suspensos, estes não foram utilizados. Para manter uma melhor qualidade da água eram feitas trocas parciais de água (cerca de metade do volume total do sistema) com regularidade e os aquários eram limpos e sifonados diariamente para recolher os restos de alimento e matéria orgânica produzida pelos peixes.

Os reprodutores eram alimentados com *Mysis* e *Artemia* congelada da marca *Ocean Nutrition* até à saciedade uma vez por dia em horas diferentes de modo a não criar uma rotina.

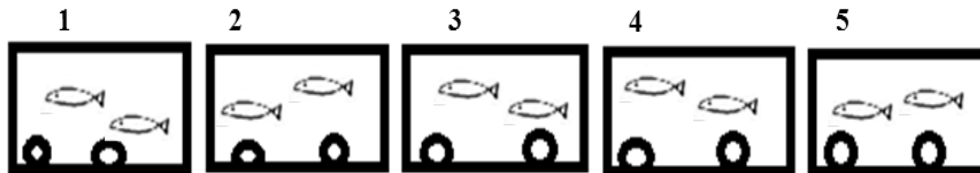


Figura 8 – Desenho experimental (em baixo), sistema para a experiência reprodutiva 2014 (em cima).

### 3.9 Características físico-químicas do sistema

Para esta experiência manteve-se o sistema com temperatura regulada para os 16°C e uma salinidade sempre próxima dos 35. O nível de oxigénio foi mantido nos 7 mg/L, como utilizado anteriormente. Os níveis de amónia, nitratos e nitritos eram mantidos sempre próximos dos 0 mg/ml. Os parâmetros físico-químicos eram medidos com kits comerciais (*Sera test*) semanalmente. Utilizou-se o fotoperíodo natural do laboratório durante todo o tempo da experiência.

### 3.10 Manutenção das larvas de *G. flavescens*

A incubação era feita nos aquários dos reprodutores e o ninho e os ovos ficavam ao cuidado dos machos até estarem prontos a eclodir. Durante todo o cultivo larvar o fotoperíodo utilizado foi o mesmo fornecido aos reprodutores, fotoperíodo natural do laboratório.

Na primeira postura, deixaram-se eclodir os ovos no aquário dos reprodutores sem os resguardar destes. Colocaram-se filtros com uma malhagem mais reduzida nas saídas de água para que as larvas não fossem levadas pela corrente e por sua vez se perdessem no sistema. A alimentação dos reprodutores e das larvas foi fornecida diretamente no aquário, uma vez por dia.

Na segunda postura, por se verificar que havia predação por parte dos reprodutores, utilizou-se um garrafão de 5 L modificado para eclosão das larvas. O tubo com os ovos (ninho) foi colocado dentro do garrafão e este colocado dentro do aquário dos reprodutores de modo a que a água entrasse mas que as larvas não conseguissem sair. Assim conseguiu-se manter a temperatura da água do garrafão à mesma temperatura do sistema (16°C) e permitiu que o volume de água em que as larvas se encontravam fosse menor, o que facilitava a alimentação e evitava a predação por parte dos adultos.

Nas posturas seguintes utilizaram-se garrafas de plástico de litro e meio para eclosão das larvas, mas de modo a mante-las nos aquários dos reprodutores e nas mesmas condições em que estes se encontravam. Quando os ovos se encontravam maduros e prontos para eclodir transferia-se o tubo onde estes se encontravam para uma garrafa onde ocorria a eclosão das larvas. Após se verificar que todos os ovos viáveis tinham eclodido e que não restavam mais larvas por eclodir, retirava-se o tubo da garrafa e fazia-se a contagem dos ovos por eclodir e das larvas eclodidas.

De modo a verificar se as larvas já tinham a boca aberta para ser administrada a primeira alimentação exógena, eram recolhidas amostras de larvas e observadas à lupa. Assim que se verificava que a boca se encontrava aberta era administrada a primeira alimentação exógena constituída por microalga (*Nannochloropsis salina*) e rotíferos (*Brachionus rotundiformis* e *Brachionus plicatilis*) produzidos no laboratório. A alimentação fornecida às larvas foi produzida seguindo os protocolos descritos no anexo I.

A água das garrafas de cultivo larvar era proveniente do aquário dos reprodutores e possuía as mesmas características físico-químicas do restante sistema. A água circulava

nas garrafas de forma livre o que permitia uma constante renovação da água de cultivo. O arejamento era feito através de pedras difusoras colocadas por baixo das garrafas junto da entrada de água, de modo a manter uma boa oxigenação da água mas sem causar muito movimento na água dentro das garrafas (fig. 9).

Uma das posturas foi utilizada para verificar se as larvas se desenvolviam melhor num sistema em forma de cone. Para isso, utilizou-se uma garrafa invertida de modo a formar um cone e onde a entrada de ar se localizava na parte inferior da garrafa de forma controlada para não causar movimentos bruscos na água. Foi ainda colocado um plástico preto em volta da garrafa para permitir uma melhor visualização do alimento por parte das larvas (Takeuti, 2009).

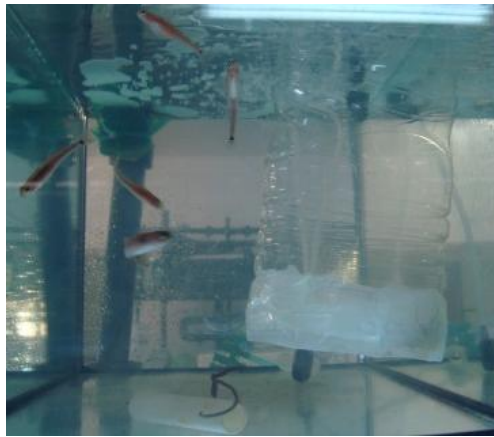


Figura 9 – Garrafa para eclosão das larvas.

## 4 Resultados

Apresentam-se seguidamente os resultados referentes às experiências realizadas durante as épocas reprodutivas de 2013 e 2014

### 4.1 Parte 1– Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2013

Durante esta etapa da experiência obtiveram-se 7 posturas das quais apenas 3 tiveram sucesso, tendo as larvas, sobrevivido um máximo de 21 dias (tabela. I).

Passados três dias após se terem colocado os indivíduos nos aquários de reprodução ocorreu a primeira postura num dos tubos de fundo do aquário 5. Ao fim de dois dias os ovos dessa postura foram comidos pelos adultos.

No início do mês de Abril (após 27 dias do início da experiência) ocorreram mais duas posturas, uma no aquário 2 e outra no aquário 3. Com 5 dias, observou-se que os ovos das duas posturas já se encontravam olhados (pigmentação dos olhos da larva). Destas duas posturas, apenas a do aquário 3 teve sucesso, os ovos da postura do aquário 2 desapareceram ao fim de 6 dias de incubação. O tubo com os ovos da postura do aquário 3 foi transferido para um recipiente com água salgada e arejamento suave quando os ovos se encontravam maduros e prontos para eclodir. Desta postura eclodiram cerca de 300 larvas, tendo morrido mais de metade até ao final do segundo dia e as restantes sobreviveram apenas até ao sexto dia (tabela I).

Tabela I - Posturas ocorridas durante a experiência reprodutiva 2013.

Aquário	Opção	Postura	Período de incubação (em dias)	Nº larvas (aprox.)	Sobrevivência das larvas (em dias)	Temperatura da água (°C)
1	A	Não	-	-	-	18-19
2	A	Sim	-	-	-	18-19
2	A	Sim	3	510	15	18-19
3	A	Sim	8	300	6	18-19
3	A	Sim	-	-	-	18-19
3	A	Sim	5	361	21	18-19
4	B	Sim	-	-	-	18-19
5	B	Sim	-	-	-	18-19
6	B	Não	-	-	-	18-19

No final do mês de Abril (após 34 dias do início da experiência) ocorreu uma nova postura no aquário 3. Ao fim de 5 dias de incubação observou-se que as larvas estavam completamente formadas e prontas para eclodir. Transferiu-se o tubo onde se encontravam os ovos para um recipiente igual ao utilizado anteriormente para eclosão das larvas. Desta postura, eclodiram 361 larvas das quais mais de metade morreu até ao terceiro dia. Ao longo de 21 dias foram-se observando as larvas e verificou-se uma pequena diminuição da mortalidade ao longo do tempo (fig. 10).

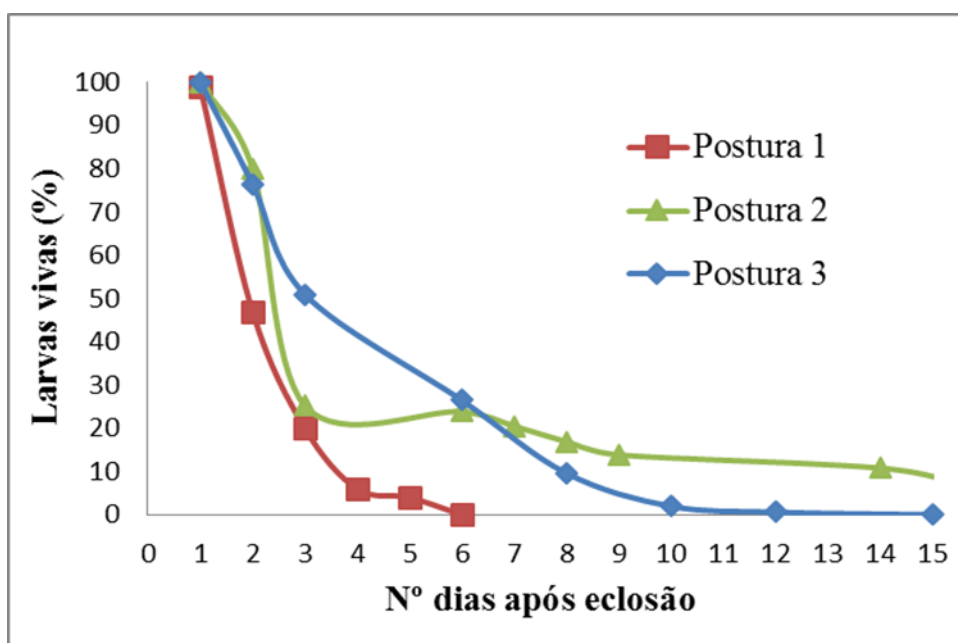


Figura 10 – Sobrevivência larvar das posturas da época reprodutiva 2013.

A última postura com sucesso ocorreu a meio do mês de Maio (após 65 dias do início da experiência) no aquário 2, observando-se uma diminuição do tempo de incubação dos ovos, tendo-se verificado que ao fim de 3 dias estes se encontravam olhados e prontos para eclodir. Transferiu-se o tubo com os ovos para um recipiente com água salgada e arejamento suave, igual aos utilizados anteriormente, e deixaram-se eclodir as larvas. Nasceram aproximadamente 510 larvas e observaram-se algumas mal formações nas larvas recém-eclodidas. Ao fim de 10 dias havia apenas 20 larvas vivas, as quais sobreviveram apenas mais 5 dias (fig. 11).

Ao longo da época reprodutiva registaram-se picos de temperatura, ou seja, sempre que a temperatura ambiente do laboratório aumentava a temperatura da água dos aquários também aumentava. Quando se registavam os picos de temperatura observavam-se mudanças comportamentais (natação mais lenta) e morfológicas (perda de coloração) e não se registavam posturas durante estes picos de temperatura.



Figura 11 – Larva de *Gobiusculus flavescens* com malformações.

Na segunda etapa desta experiência em que se colocou o plástico preto em volta dos aquários para resguardar e proporcionar maior segurança aos indivíduos, obtiveram-se apenas mais duas posturas (após 14 dias do início da experiência). Obteve-se uma postura no aquário 4 e outra postura no aquário 5, mas nenhuma delas teve sucesso. Os ovos da postura do aquário 4 foram comidos pelos adultos no dia seguinte à desova. O mesmo aconteceu aos ovos da postura do aquário 5 após três dias de incubação (tabela II).

Observou-se ainda, que os ovos destas duas posturas se encontravam transparentes e por fertilizar. Não apresentavam nenhum sinal de pigmentação nem de formação larvar.

Tabela II - Posturas ocorridas durante a experiência com resguardo.

Aquário	Opção	Postura	Período de incubação (em dias)	Nº larvas (aprox.)	Sobrevivência das larvas (em dias)	Temperatura da água (°C)
1	A	Não	-	-	-	18-19
2	A	Não	-	-	-	18-19
3	A	Não	-	-	-	18-19
4	A	Sim	-	-	-	18-19
5	A	Sim	-	-	-	18-19
6	A	Não	-	-	-	18-19



#### 4.2 Parte 2 – Experiência realizada durante a época reprodutiva de 2014

Durante o decorrer da experiência reprodutiva obtiveram-se 18 posturas, 12 delas com sucesso e com obtenção de larvas (tabela III).

Passados 8 dias de se terem colocado os machos com as fêmeas nos aquários da reprodução ocorreu a primeira postura. A primeira postura ocorreu no aquário 3 e obtiveram-se cerca de 300 larvas que sobreviveram 7 dias.

A postura da qual se obtiveram mais larvas foi a postura número 5 (após 25 dias do início da experiência), que ocorreu no aquário 5 e que por sua vez também teve a melhor taxa de eclosão (100%) sendo a única postura da qual todos os ovos eclodiram (tabela IV).

Tabela III - Posturas ocorridas durante a experiência reprodutiva 2014.

Aquário	Postura	Incubação (em dias)	Nº larvas (aprox.)	Sobrevivência das larvas (em dias)	Temperatura da água (°C)
1	Sim	8	100	12	16
2	Sim	1	-	-	16
2	Sim	8	120	15	16
2	Sim	11	150	17	16
2	Sim	11	100	7	16
2	Sim	7	-	-	16
2	Sim	7	90	14	16
3	Sim	9	300	7	16
3	Sim	9	106	15	16
3	Sim	8	100	15	16
3	Sim	3	-	-	16
4	Sim	6	-	-	16
4	Sim	5	-	-	16
4	Sim	8	112	11	16
5	Sim	6	500	14	16
5	Sim	8	-	-	16
5	Sim	7	110	13	16
5	Sim	8	96	18	16

A postura que teve menor taxa de eclosão (20%) foi a postura número 18 (após 64 dias do início da experiência) que ocorreu no aquário 2 (tabela IV). Esta postura ocorreu no final do mês de Junho e foi a última que se obteve durante o tempo de experiência. Quando observados à lupa, verificou-se que havia um grande número de ovos com fungos, baços e alguns também não se encontravam fertilizados.

O tempo de incubação das posturas que tiveram sucesso e das quais se obtiveram larvas variou de 6 a 11 dias (tabela III). As larvas da postura número 10 que ocorreu no aquário 2 (após 39 dias do início da experiência) foram as que viveram menos tempo, apenas 7 dias. As larvas desta postura morreram todas de um dia para o outro.

As larvas da postura número 15 que ocorreu no aquário 5 (após 57 dias do início da experiência) foram as que viveram mais tempo, tendo sobrevivido durante 18 dias. A maior parte dos ovos que não eclodiram não eram viáveis e/ou estavam mortos. Quando observadas à lupa, as larvas apresentavam alimento no seu interior e demonstravam que tinha havido crescimento e desenvolvimento das mesmas. Algumas destas larvas observadas à lupa apresentavam o corpo mais composto e a formação de pigmentação em algumas zonas do corpo como na cabeça e zona dorsal (fig.12).



Figura 12 – Larva de *Gobiusculus flavescens* com pigmentação na cabeça e zona dorsal.

Algumas fêmeas, como as do aquário 2, desovaram mais que uma vez já que havia apenas 4 fêmeas por aquário e ocorreram 4 ou mais posturas em quase todos os aquários. No aquário 2 ocorreram 6 posturas, o que indica que a mesma fêmea desovou duas vezes.

Tabela IV – Taxa de eclosão e de ovos mortos/não viáveis das posturas com sucesso.

Postura (n°)	Aquário (n°)	Taxa de eclosão (%)	Taxa de ovos mortos/não viáveis (%)
1	3	70	30
3	1	60	40
4	2	65	35
5	5	100	0
6	2	55	45
7	3	63	37
10	2	50	50
11	3	48	52
13	5	46	54
15	5	66	34
17	4	53	47
18	2	20	80

Durante a experiência reprodutiva 2014 observou-se, em algumas posturas, que ocorreu uma diminuição de mortalidade ao longo dos dias após a eclosão das larvas, tendo a postura 10 tido a melhor taxa de sobrevivência ao longo do desenvolvimento larvar (fig. 13).

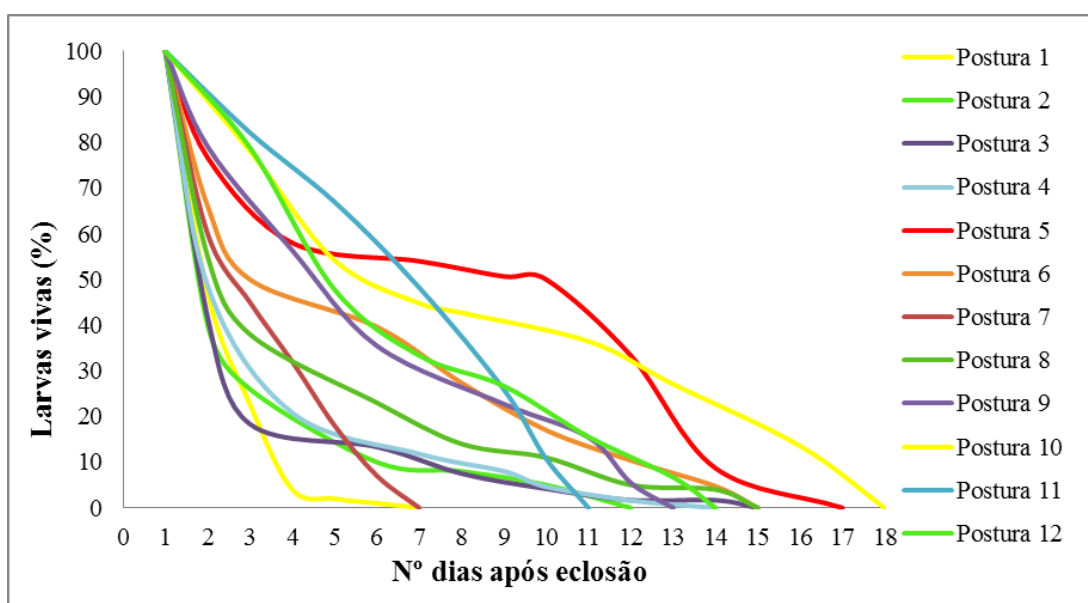


Figura 13 – Sobrevivência larvar das posturas da época reprodutiva 2014.

### 4.3 Comportamento agnóstico, corte e desova

Ao longo deste trabalho laboratorial observaram-se comportamentos agressivos dos machos maiores para com os outros machos e algumas vezes para com as fêmeas. Observou-se várias vezes um comportamento defensivo por parte do macho quando este estava a cuidar do ninho e principalmente quando tinha ovos a seu cuidado como descrito por Jong (2011).

Durante a corte, os indivíduos nadavam em volta um do outro e em volta do ninho preparado pelo macho. Observou-se que durante algum tempo os indivíduos apenas nadavam um junto do outro e junto ao ninho sem que entrassem neste.

Após algum tempo foi possível observar o momento da desova. Inicialmente a fêmea entrava no tubo e ia depositando os ovos no seu interior enquanto o macho ficava no exterior do tubo de forma defensiva (fig.14, esquerda). Após a fêmea ter depositado alguns ovos, o macho entrava no tubo e fertilizava-os. Depois de o macho fertilizar os primeiros ovos, a fêmea continuava a depositar mais ovos em volta do tubo e o macho ia-os fertilizando, como se fosse uma dança entre os dois. Quando a fêmea acabava de depositar os ovos saía do tubo e o macho ficava a cuidar dos ovos (fig. 14, direita), comportamento igualmente descrito por Skolbekken e Utne-Palm (2001).



Figura 14 – Fêmea a depositar os ovos (esquerda) e macho a guardar o ninho (direita).

## 5 Discussão e Conclusão

O presente trabalho, teve como principal objetivo a reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, *Gobiusculus flavescens*. Sendo uma espécie que tem um tempo médio de vida de dois anos, reproduz-se várias vezes durante a época reprodutiva. Tal como muitas espécies que têm uma capacidade reprodutiva grande, deparam-se com diferentes condições ambientais e fisiológicas de cada vez que se reproduzem no seu habitat natural (Svensson et al, 2008; Sköld et al, 2008).

Sendo um peixe de águas temperadas que apresenta uma época reprodutiva longa, é uma espécie com características ideais para estudos na área da reprodução (Skolbekken e Utne-Palm, 2001). Através de trabalhos anteriores, verificou-se que o caboz-de-duas-pintas consegue viver num largo intervalo de temperaturas, entre os 6/7°C até 23/24°C no máximo. A sua observação em locais distintos da Europa, desde a costa da Noruega até às praias rochosas de Espanha e Portugal, que apresentam temperaturas diferentes de região para região é mais uma prova de que é uma espécie que se adapta a várias temperaturas (Jong, 2011; Silva e Teles, 2011).

Apesar de não haver estudos realizados sobre a influência da temperatura na reprodução desta espécie, através de trabalhos realizados anteriormente (Maranhão et al (aceite para publicação), Silva e Teles, 2011) podemos dizer que a temperatura desempenha um papel importante na sobrevivência e crescimento dos juvenis e adultos de *G. flavescens*. Com os resultados obtidos durante a época reprodutiva de 2013 verificou-se que sempre que a temperatura ambiente do laboratório aumentava, o que provocava um aumento da temperatura dos aquários, havia uma mudança de comportamento dos reprodutores e não ocorria reprodução. Seguindo este princípio, podemos então dizer que apesar de esta espécie viver num intervalo de temperaturas alargado, esta desempenha um papel importante na sua reprodução, o que cria um problema para a sua produção em cativeiro. Para contornar este problema, foram utilizados termoacumuladores de frio nos aquários para manter a temperatura da água mais baixa e evitar variações bruscas de temperatura. Esta poderá ser uma das principais razões que levaram a que se obtivessem menos posturas durante a experiência de 2013 em relação a 2014.

O caboz-de-duas-pintas é uma espécie em que os papéis sexuais são dinâmicos, ou seja, no início da época reprodutiva o macho tem um papel mais ativo na competição com os outros machos pelas fêmeas (papel sexual convencional), no final da época

reprodutiva é a fêmea que se torna mais ativa na procura de parceiro e na competição com as outras fêmeas pelo macho (papel sexual revertido) (Forsgren et al, 2004). Durante a época reprodutiva os machos competem pelas fêmeas com comportamentos de corte mas também comportamentos agressivos para com os machos concorrentes, tendo os machos maiores e mais coloridos mais sucesso do que os mais pequenos junto das fêmeas na procura por parceiro (Jong, 2011). Ao longo do tempo, os machos foram desenvolvendo características ornamentais que lhes permitem ter mais sucesso na procura por parceiro através da denominada seleção natural (Amundsen e Forsgren, 2001). Os machos maiores são mais vezes observados junto das fêmeas e em processos reprodutivos demonstrando ainda maior agressividade que os machos mais pequenos, o que pode explicar o porquê de terem mais sucesso reprodutivo com as fêmeas (Wacker et al, 2012). Através das observações feitas no laboratório a quando da manutenção dos machos e seguindo o já observado em trabalhos anteriores, pode-se dizer que a separação dos machos pequenos dos maiores nos aquários de manutenção foi essencial para a sobrevivência dos mesmos. Quando as fêmeas estão prontas para acasalar e estão sexualmente maduras apresentam o ventre alaranjado (Svensson et al, 2005).

Seguindo o princípio de Svensson et al (2008), utilizou-se um rácio de 2 machos para 4 fêmeas uma vez que os machos podem acasalar com 2 a 6 fêmeas que apresentem o ventre mais laranja e mais desenvolvido, como já foi demonstrado no trabalho de Amundsen e Forsgren (2001) sobre a preferência dos machos por fêmeas com essas características.

Para servir de ninho, foram utilizados tubos de PVC seguindo as indicações do trabalho de Skolbekken e Utne-Palm (2001). Na primeira parte deste trabalho, utilizaram-se os tubos de duas maneiras de modo a determinar qual a mais adequada para a espécie. Uma vez que esta espécie procura locais abrigados e de pouco movimento para depositar os seus ovos, era esperada uma maior preferência pelos tubos que se encontravam no fundo do aquário (opção A). Através dos resultados obtidos e das observações realizadas, verificou-se que nenhum macho cuidou dos tubos suspensos e que apenas os tubos de fundo receberam ovos e despertaram interesse nos machos. Estes resultados fizeram com que nos restantes trabalhos realizados, se utilizassem apenas os tubos no fundo do aquário (opção A).

Das desovas obtidas na época reprodutiva de 2013, apenas 3 tiveram sucesso e todas apresentavam uma característica em comum, que foi demonstrado pela diminuição da capacidade reprodutiva consoante o desenvolvimento da época de reprodução. Com a

proximidade do final da época reprodutiva e da primeira parte do trabalho laboratorial, testou-se ainda se os indivíduos se reproduziam com maior facilidade quando lhes era proporcionado um ambiente mais resguardado. Estudos anteriores mostraram que apesar do caboz-de-duas-pintas ser uma espécie predominantemente diurna, apresenta alguma atividade noturna (Silva e Teles, 2011). Os resultados obtidos nesta etapa não foram conclusivos, o que não permitiu fazer comparações com os resultados obtidos anteriormente, sendo por isso necessário efetuar mais estudos neste sentido.

Das três desovas com sucesso, obtiveram-se larvas sem sinais de malformações e perfeitamente sãs. O tempo de incubação das três posturas foi diferente e apenas os ovos da segunda postura com sucesso demoraram cerca de 8 dias para eclodir como observado no trabalho de Jong (2011), nos ovos mantidos a 18°C. O mesmo não se verificou nas restantes posturas, uma vez que com o aumento da temperatura ambiente no laboratório os ovos demoravam menos tempo a ficar maduros e prontos para eclodir. O facto do segundo macho não ter ovos para guardar pode justificar o insucesso das restantes posturas, uma vez que por vezes o segundo macho destrói os ovos guardados pelo macho dominante (Mobley et al, 2009). A maior parte das larvas da terceira desova morreram devido ao alimento administrado que, posteriormente verificou-se estar contaminado. No segundo dia após as larvas desta postura terem eclodido, mais de metade das larvas morreram, e verificou-se um aumento brusco de temperatura no recipiente onde se encontravam as larvas o que poderá ter causado esta mortalidade.

No entanto, apesar de se ter conseguido sucesso no que diz respeito à reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, não se conseguiu manter as larvas obtidas nesta época reprodutiva mais de 21 dias.

Na época reprodutiva de 2014, o número de posturas aumentou bem como o número de posturas com sucesso que passou de 3 para 12. Durante esta época reprodutiva observou-se que o macho efetuava a fertilização dos ovos imediatamente a terem sido depositados, o que lhe permite ter mais tempo para a defesa do ninho, para a corte de outras fêmeas e assim evita que outros machos fertilizem os seus ovos (Skolbekken e Utne-Palm, 2001).

Apesar da temperatura da água em que foi feito o cultivo das larvas ser controlada houve outros fatores que influenciaram o seu desenvolvimento e que provocaram mortalidade elevada. O facto de as larvas serem mais sensíveis nos primeiros dias após a eclosão e durante o período de transição para a primeira alimentação exógena contribui para que haja maior mortalidade larvar (Ferreira, 2009).

O volume da água para procura de alimento depende do campo de visão da larva, da distância de observação e da velocidade de natação da larva, fatores que também influenciam a sobrevivência larvar (Bone e Moore, 2008). Outro fator que provavelmente contribuiu para a mortalidade das larvas e para que estas não sobrevivessem mais do que os 18 dias foi o facto de terem uma capacidade de captura de presa baixa. A capacidade/habilidade de captura de presas depende do tamanho da larva comparando com o tamanho da boca da larva quando aberta e da experiência da larva, a eficiência de caça da larva aumenta com a idade e com o aumento do seu tamanho (Fuiman et al, 2006). O facto das larvas do caboz-de-duas-pintas serem muito pequenas (cerca de 2,3mm) e de não possuírem quase nenhuma reserva vitelina quando eclodem também contribui para que estas sejam mais frágeis e que ocorra maior mortalidade.

A escolha do alimento adequado para a primeira alimentação exógena das larvas é muito importante para garantir que estas tenham um desenvolvimento saudável e que obtenham toda a nutrição necessária para que cresçam saudáveis. O alimento tem que possuir as características nutricionais e o tamanho adequado a cada espécie (Ferreira, 2009). Algumas das larvas observadas à lupa, apresentavam alimento no seu interior, o que sugere que a alimentação administrada foi bem aceite.

As larvas obtidas nesta época reprodutiva foram cultivadas seguindo alguns dos métodos utilizados por Meirelles (2008), no cultivo do gobídeo (*Elacatinus figaro*). Sendo duas espécies pertencentes à mesma família têm algumas características em comum, o que permitiu utilizar alguns dos métodos utilizados para o cultivo do *E. figaro* fazendo algumas alterações nas metodologias. Apesar das semelhanças das espécies em termos reprodutivos e de comportamentos de corte, o cultivo das larvas mostrou-se mais difícil no caso do caboz-de-duas-pintas.

O cultivo larvar de *G. flavescens* apresenta alguns problemas que são possíveis de solucionar através do aperfeiçoamento das metodologias e das condições laboratoriais. Para garantir que as larvas recém-eclodidas têm as condições adequadas ao seu desenvolvimento é necessário um maior controlo do ambiente de cultivo, alimento vivo adequado ao tamanho da boca das larvas e às suas necessidades nutricionais, bem como uma temperatura e um fotoperíodo controlado e adequado, água filtrada e esterilizada, oxigénio e pH adequados ao cultivo (Kolkovski et al, 2004).

A maioria das espécies produz desovas maiores no ambiente natural do que em cativeiro, o que leva a que haja maior produção de ovos na natureza do que em cativeiro (Takeuti, 2009). Não tendo conhecimento de nenhum trabalho realizado com esta espécie

no qual seja avaliado o tamanho das desovas e/ou a taxa de eclosão não é possível fazer uma comparação. Contudo, seguindo o princípio descrito por Takeuti (2009) para outras espécies podemos então dizer que as desovas obtidas durante este trabalho foram sempre relativamente pequenas e que a taxa de eclosão foi muito variável, tendo em média de 58%. O elevado número de ovos mortos e não viáveis contribuiu para que a taxa de eclosão fosse baixa assim como o número de larvas obtidas em cada postura. Os cuidados parentais nesta espécie são essenciais para que haja sucesso na eclosão larvar e para um bom desenvolvimento dos ovos (Skolbekken e Utne-Palm, 2001). A qualidade da água, a temperatura e uma boa oxigenação, são fatores muito importantes para o desenvolvimento de ovos viáveis e sem fungos (Takeuti, 2009).

Durante o decorrer da experiência reprodutiva observou-se que cada fêmea podia desovar mais que uma vez, como se pode comprovar através da ocorrência de 6 posturas no aquário 2 onde se encontravam apenas 4 fêmeas. Como já observado em trabalhos anteriores, esta espécie tendo pouco tempo de vida, tem a capacidade de se reproduzir várias vezes durante a época reprodutiva sendo por isso expectável que cada fêmea possa efetuar mais que uma desova (Svensson et al, 2008; Sköld et al, 2008). Apesar de ser expectável que ocorresse mais que uma postura em todos os aquários, tal não se verificou no aquário 1. O facto de as fêmeas serem um pouco mais pequenas (provavelmente jovem adultas) e não terem apresentado o ventre alaranjado mais nenhuma vez após a primeira postura ocorrida no aquário pode ter provocado a falta de mais posturas no aquário 1.



## 6 Perspetivas Futuras

Uma vez que *G. flavescens* é uma espécie com potencial interesse para a aquacultura ornamental e através dos trabalhos desenvolvidos mostrou ser de fácil manutenção em cativeiro, seria bom efetuar mais estudos de modo a determinar quais são as condições específicas para a sua manutenção e produção em cativeiro.

Tendo em conta os estudos já realizados com as temperaturas, seria interessante estudar melhor a influência desta nos comportamentos de corte, alimentação e reprodução e de forma a testar quais as implicações que esta tem a nível morfológico e fisiológico.

Através dos estudos já realizados, verificou-se que a reprodução em cativeiro do caboz-de-duas-pintas é possível apesar de ainda ser um tópico com muitos problemas associados. Para solucionar estes problemas seria interessante efetuar um estudo mais prolongado dos comportamentos de corte e dos fatores que os influenciam.

A manutenção das larvas do *G. flavescens* é outro tópico que precisa ser estudado mais a fundo. É necessário testar qual a temperatura ótima para o cultivo larvar e qual a influência desta no desenvolvimento das larvas ao longo das diferentes fases da metamorfose.

A alimentação é um fator muito importante para o desenvolvimento saudável das larvas e juvenis, por isso, é interessante estudar quais as necessidades nutricionais da espécie e qual o alimento mais adequado para administração nas diferentes fases de vida do *G. flavescens*.



## Referências Bibliográficas

Ahmadi M.R., Bazyar A.A., Safi S., Ytrestøyl T., Bjerkeng B., 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, pp. 388–394.

Amundsen, T., Forsgren, E., 2001. Male mate choice selects for female coloration in a fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. pp. 13155–13160.

Amundsen, T., Forsgren, E., 2003. Male preference for colourful females affected by male size in a marine fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, pp. 54:55-64.

Campbell, A., 2006. *Fauna e Flora do litoral de Portugal e Europa*; Guias Fapas, 2ª edição; Porto; Impresso por: Inova, Artes Gráficas

Bone, Q., Moore, 2008. *Biology of fishes*; Third Edition; Taylor & Francis Group; Abingdon; UK

Borg, Å. A., Forsgren, E., Amundsen, T., 2006. Seasonal change in female choice for male size in the two-spotted goby, Original Research Article *Animal Behaviour*, Volume 72, Issue 4, Pg. 763-771

Ferreira, P. M. P., 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia para a larvicultura de peixes marinhos. Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P. *IPIMAR*, ISBN: 978-972-9372-37-7

Forsgren, E., Amundsen, T., Borg, Å.A., Bjelvenmark, J., 2004. Unusually dynamic sex roles in a fish. *Nature* 429, 551–554

Fuiman, L.A., Rose, K.A., Cowan, J.H. Jr., Smith, E.P., 2006. Survival skills required for predator evasion by fish larvae and their relationship to laboratory measures of performance. *Animal Behaviour* 71: 1389–1399.

Griffith S.C., Pryke, S.R., 2006. Bird coloration: Function and Evolution. Chapter: Benefits to females of assessing color displays. London: *Harvard University Press*, pp. 233-279

Griffith S.C., Sheldon B.C., 2001. Phenotypic plasticity in the expression of sexually selected traits: neglected components of variation. *Animal Behaviour*, pp. 987-993

Houde, A. E., 2001. Sex roles, ornaments, and evolutionary explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, pp. 12857-12859

Jong, K., 2011. Operational Sex Ratio and Reproductive Behaviour in the Two-spotted Goby (*Gobiusculus flavescens*). 147 p. *Tese (Philosophiae Doctor) - Department of Biology*, Faculty of Natural Sciences and Technology, Norway

Jong, K., Wacker, S., Amundsen, T., Forsgren, E., 2009. Do operational sex ratio and density affect mating behaviour? An experiment on the two spotted goby; *Animal Behaviour* 78:1229-1238; doi:10.1016/j.anbehav.2009.08.006)

Kolkovski, S., Curnow, J., King, J., 2004. Intensive rearing system for fish larvae research: I. Marine fish larval rearing system. *Aquacultural Engineering*, Volume 31, Issues 3 – 4, pp. 295–308

Maranhão, P., Teles, V., Silva, A., Mendes, S.. Maintenance of two-spotted goby, *Gobiusculus flavescens*, in captivity as a resource for ornamental fishkeeping. *Thalassas* (aceite para publicação)

Meirelles, M. E., 2008. Viabilidade do cultivo do néon gobi, *Elacatinus fígaro*. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC p. 13-26.

Mobley, K. B., Amundsen, T., Forsgren, E., Svensson, P. A., Jones, A., 2009. Multiple mating and a low incidence of cuckoldry for nest-holding males in the two-spotted goby, *Gobiusculus flavescens*. *BioMed Central Evolutionary Biology*, 9

Pélabon, C., Borg, A.A., Bjelvenmark, J., Forsgren, E., Barber, I., Amundsen, T., 2003. Do male two-spotted gobies prefer large fecund females?. *Behavioral Ecology* Vol. 14 No. 4: 787–792 DOI: 10.1093/beheco/arg074

Picton, B., Morrow, C., 2010. *Gobiusculus flavescens* (Fabricius, 1779) - Two-spotted goby; Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland; In: <http://www.eol.org/pages/204773>

Ribeiro, F. A. S., 2008. Policultivo de acará-bandeira e camarão marinho. *Tese (Doutor Aquicultura) Programa de Pós-graduação em Aquicultura*, Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal

Saldanha, L., 1995. *Fauna Submarina Atlântica: Portugal Continental, Açores e Madeira*; Publicações Europa-América, 4ª edição

Scott, P. W., 1996. *O Grande Livro do Aquário: Um guia prático para escolha, montagem, povoamento e manutenção de aquários de água doce e salgada*; Seleções Reader's Digest; Cetrativros – Edição e Distribuições, Lda.; Lisboa

Silva, A., Teles, V., 2011. Manutenção em cativeiro do caboz-de-duas-pintas, *Gobiusculus flavescens*. Recurso para a aquarioria ornamental? *Projeto Licenciatura em Biologia Marinha e Biotecnologia*, ESTM, Peniche

Skolbekken, R., Utne-Palm, A. C., 2001. Parental investment of male two-spotted goby, *Gobiusculus flavescens* (Fabricius), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 261: 137-157

Sköld H. N., Amundsen T., Svensson P.A., Mayer I., Bjelvenmark J., Forsgren E., 2008. Hormonal regulation of female nuptial coloration in a fish. *Horm Behav.* 54:549–556.

Svensson, P.A., Forsgren, E., Amundsen, T., Sköld, H.N., 2005. Chromatic interaction between egg pigmentation and skin chromatophores in the nuptial coloration of female two-spotted gobies; *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*; 208; 4391 - 4397

Svensson, P. A., Pélabon, C., Blount, J. D., Forsgren, E., Bjerkgren, B., Amundsen, T., 2008. Temporal variability in a multicomponent trait: nuptial coloration of female two spotted gobies. *Behavioral Ecology* doi:10.1093/beheco/arn154

Takeuti, T., 2009. Variação da frequência de desova e fecundidade de animais selvagens e de cultivo e aspectos de sanidade do néon gobi (*Elacatinus figaro*). *Curso de Graduação em Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina*, Engenheiro de Aquicultura, Florianópolis

Thlusty M. F., 2002. The benefits and risk of aquaculture production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205: 203-219

Wacker, S., Jong, K., Forsgren, E., Amundsen, T., 2012. Large males fight and court more across a range of social environments: an experiment on the two spotted goby *Gobiusculus flavescens*. *Journal of Fish Biology*, 81: 21-34

Wiley, E. O., Johnson, G. D., 2010. A teleost classification based on monophyletic groups. In J. S. Nelson, H.-P. Schultze, M. V. H. Wilson (eds) *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*. Pg. 123-182, Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany.

## **Anexo I**

### **Cultivos auxiliares**

O alimento vivo, rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) cultivados em *Isocrysis galbana*, administrado às larvas nascidas na época reprodutiva de 2013 foi cultivado pelos alunos de Biologia Marinha e Biotecnologia no âmbito das aulas de Técnicas de Produção Aquícola. Para o cultivo do alimento vivo fornecido às larvas obtidas na época reprodutiva de 2014 foram realizados cultivos auxiliares em laboratório.

### Cultivo de rotíferos (*Brachionus rotundiformis* e *Brachionus plicatilis*)

Os rotíferos fornecidos às larvas foram cultivados em meio F/2 com a microalga *Nannochloropsis salina* num volume total de 6 L de água salgada previamente esterilizada. As culturas foram realizadas na sala de microalgas do laboratório a uma temperatura média de 25°C e com uma salinidade de 35. A microalga que foi utilizada já se encontrava na fase exponencial e foi cedida por uma colega do mestrado de Aquacultura.

O meio F/2 é constituído por nitratos (1,0 ml / L), fosfatos (1,0 ml / L), metais (1,0 ml / L) e vitaminas (0,5 ml / L). A cultura inicial foi inoculada em balões de 6 L com rotíferos a uma concentração de 50 rot/mL. A produção ia sendo retirada e foi acrescentado igual volume de microalgas para manter o cultivo. Quando as condições do meio de cultivo se degradavam, iniciava-se um novo cultivo.