



# RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

SÉRIE DIGITAL

DETERMINAÇÃO DE IDADE DE JUVENIS DE SARDINHA  
(*Sardina pilchardus*, WALBAUM 1792) A PARTIR DE  
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DOS INDIVÍDUOS  
E DOS OTÓLITOS

Andreia V. Silva, Isabel Meneses, Alexandra Silva

2012

53



Os **RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPIMAR** destinam-se a uma divulgação rápida de resultados preliminares de carácter científico e técnico, resultantes de actividades de investigação e de desenvolvimento e inovação tecnológica. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes do sector, podendo os trabalhos serem escritos em português, em francês ou em inglês.

A **SÉRIE COOPERAÇÃO** destina-se, primordialmente, à divulgação de trabalhos realizados com países terceiros no âmbito de programas de cooperação.

A **SÉRIE DIGITAL** destina-se a promover uma Consulta mais diversificada e expedita dos trabalhos na área da investigação das pescas e do mar.

**Edição**

IPIMAR

Avenida de Brasília

1449-006 LISBOA

Portugal

**Corpo Editorial**

Francisco Ruano – Coordenador

Aida Campos

Irineu Batista

Manuela Falcão

Maria José Brogueira

Maria Manuel Martins

Rogélia Martins

**Edição Digital**

Anabela Farinha / Irineu Batista / Luís Catalan

As instruções para os autores estão disponíveis no sítio web do IPIMAR <http://ipimar-iniap.ipimar.pt/> ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação

**Capa**

Luís Catalan

**ISSN**

1645-863x

Todos os direitos reservados

# DETERMINAÇÃO DE IDADE DE JUVENIS DE SARDINHA (*Sardina pilchardus*, WALBAUM 1792) A PARTIR DE CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DOS INDIVÍDUOS E DOS OTÓLITOS.

Andreia V. Silva, Isabel Meneses, Alexandra Silva  
IPIMAR

Recebido em: 02-06-2011

Aceite em: 17.02.12

## RESUMO

Numa amostra de 236 juvenis de *Sardina pilchardus*, recolhidos durante os meses de Maio de 2004 a Janeiro de 2005 na costa norte de Portugal, foram registados o peso (PO), o diâmetro dos otólitos (DO), o peso (PI), e o comprimento individuais (CI). De forma a estabelecer a relação entre estas características e a idade (Id), seleccionou-se uma amostra de 36 otólitos para contagem de anéis diários. As idades variaram entre 103-269 dias. Verificou-se que a relação linear entre Log (Id) - PO ( $r^2 = 0,88$ ), pode ser usada para prever a idade dos juvenis com um erro de 19%. As datas de nascimento estimadas revelaram que 80% dos indivíduos amostrados nasceram entre Janeiro e Março de 2004. Embora não seja possível avaliar o rigor das idades a partir desta relação, a coerência existente entre as relações CI-Idade, as datas de nascimento e taxas de crescimento encontradas no presente trabalho, com os dados de outros autores, conferem algum suporte aos resultados.

**Palavras-chave:** *Sardina pilchardus*; anéis diários; peso dos otólitos; diâmetro dos otólitos; comprimento individual; peso individual.

## ABSTRACT

**Title:** Age determination of sardine juveniles (*Sardina pilchardus*, Walbaum 1792) using individual and otolith morphometric characteristics.

In a sample of 236 juveniles of *Sardina pilchardus*, collected during May 2004 – January 2005 off the northern Portuguese coast, otolith weight (PO) and diameter (DO), individual fish length (CI) and weight (PI) were measured. To establish a relationship between fish age and individual and otolith morphometric characteristics, ages (Id) of 36 otoliths were determined by counts of daily growth rings. Ages ranged between 103-269 days. It was concluded that the linear relationship between Log (Id) - PO ( $r^2 = 0,88$ ), could be used in age determination of this species, with a 19% of error. The back-calculated date of birth shows that 80% of individuals were born between January and March 2004. Although it is not possible to evaluate the accuracy of the estimated ages, the consistency between the relationships CI – Id, the date of birth and the daily growth rates observed in this study, with the data of other authors, give some support to our results.

**Key-words:** *Sardina pilchardus*; daily rings; otolith weight; otolith diameter; individual length; individual weight.

---

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVA, A.V., MENESES, I., SILVA, A., 2012. Determinação da idade de juvenis de sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) a partir de características morfométricas dos indivíduos e dos otólitos *Relat. Cient. Téc. Inst. Invest. Pescas Mar, Série Digital*, nº 53. 24p.

## INTRODUÇÃO

A sardinha, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), é uma espécie do grupo de pequenos pelágicos com ampla distribuição geográfica no Atlântico Nordeste e no Mediterrâneo (Parrish *et al.*, 1989). Em Portugal, é um dos recursos pesqueiros mais importantes representando 40% do peso total do pescado desembarcado anualmente no continente. É capturada sobretudo na pescaria do cerco, com desembarques variando entre as 50 000 e 70 000 toneladas nos últimos anos (DGPA, 2010). Para efeitos de gestão pesqueira, a sardinha distribuída nas águas atlânticas de Portugal e Espanha é considerada um *stock* único, designado *stock* Atlântico-Ibérico, cujo estado de exploração é avaliado anualmente pelo Conselho Internacional para a Exploração do Mar, CIEM/ ICES (*e.g.* ICES, 2010).

A costa Norte de Portugal é uma das principais áreas de desova e de “*nursery*” da sardinha na Península Ibérica, resultado da combinação de processos oceanográficos de retenção e da elevada produção planctónica associada a fenómenos de afloramento costeiro e “*river-runoff*” (Alvarez & Alemany 1997; Santos *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007). Estima-se que cerca de 60% do recrutamento anual do *stock* Atlântico-Ibérico provém desta região (Silva *et al.*, 2009).

Como é característico dos pequenos pelágicos, a sardinha apresenta grandes flutuações de abundância, por vezes com alterações da área de distribuição, resultantes de variações marcadas no recrutamento anual (Bernal *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). Estas flutuações dificultam a avaliação da abundância da população e o estabelecimento de medidas de gestão para a pescaria. Para além disso, sendo a sardinha um elo importante da cadeia alimentar pelágica, esta variabilidade tem implicações na trofodinâmica do ecossistema pelágico da região (Santos *et al.*, 2004; Sinovčić, G. *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2008).

O estudo das idades e das datas de nascimento dos juvenis pode ser usado para explorar os factores ambientais que afectam a sua sobrevivência e contribuir para compreender as causas da variabilidade do recrutamento (Jones, 1992; Wilhelm *et al.*, 2005; Meneses, 2003; Alemany *et al.*, 2006). A estimativa de idades dos juvenis bem como das larvas de peixes baseia-se na contagem de anéis diários nos otólitos, usualmente os *sagittae* (Pannella, 1974; 1980; Morales-Nin, 2000; Wootton, 1998). No caso da sardinha, o método de determinação da idade pela observação da microestrutura dos otólitos está bem validado nas larvas e o seu crescimento é bem conhecido (Ré, 1986; Silva & Miranda, 1992). No entanto, a fase juvenil tem sido pouco estudada principalmente devido à complexidade e morosidade dos procedimentos de preparação e leitura dos otólitos (Meneses, 2003; Alemany *et al.*, 2006).

Com vista a ultrapassar as dificuldades associadas à leitura de anéis diários, têm sido explorados métodos complementares ou alternativos a este. As características morfológicas dos otólitos (*e.g.* diâmetro e peso do otólito) e as características morfométricas individuais (*e.g.* comprimento do corpo) são frequentemente bem correlacionadas com a idade dos peixes (Templeman & Squires, 1956; Pawson, 1990; Flecher, 1991, 1995; Araya *et al.*, 2001; Fossen, *et al.*, 2003; Meneses, 2003; Metín & İlkyaz, 2008). Em adultos de várias espécies, incluindo a sardinha e outros clupeídeos, a idade é bem estimada pelo peso dos otólitos (Pawson, 1990; Fletcher, 1991 e 1995; Labropoulou & Papaconstantinou, 2000; Araya *et al.*, 2001). Estes resultados levaram alguns investigadores a recomendarem a sua aplicação a peixes juvenis, tendo em conta as dificuldades de leitura directa das idades (Pawson, 1990; Alemany *et al.*, 2006).

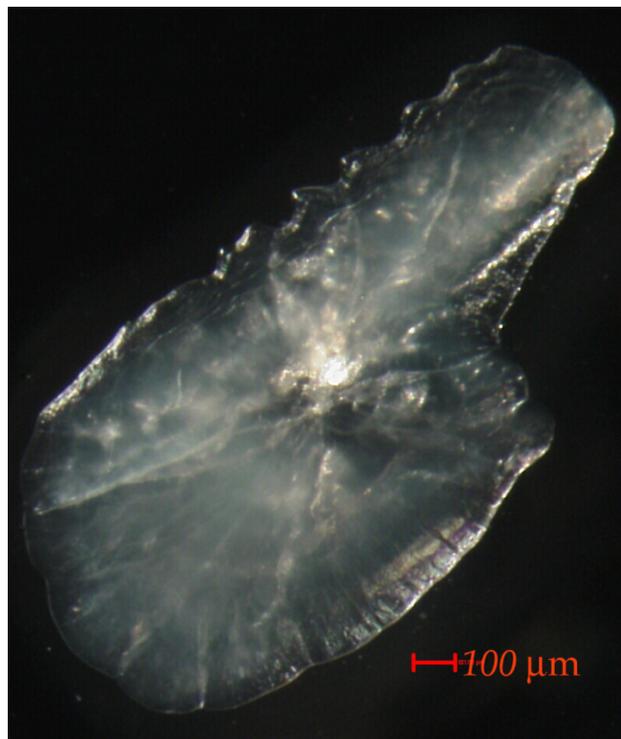
Este estudo teve como objectivo relacionar a idade de juvenis de sardinha, obtida pela contagem de anéis diários, com características morfométricas dos indivíduos (peso e comprimento total) e dos otólitos (peso e diâmetro). Estimaram-se as relações entre a idade e as diferentes variáveis e comparou-se a sua capacidade preditiva. Usou-se a melhor relação para estimar as idades e datas de nascimento de novos indivíduos, isto é, juvenis recolhidos no mesmo período para os quais não se determinou a idade cujas características morfométricas foram registadas. O trabalho baseou-se em amostras de juvenis da coorte de 2004, uma das mais fortes dos últimos anos (ICES, 2010).

## **METODOLOGIA**

Foram recolhidas treze amostras de juvenis de sardinha provenientes de desembarques comerciais na costa norte de Portugal entre os meses de Maio de 2004 e Janeiro de 2005 (Tab. 1). Foram retirados aleatoriamente 99-205 indivíduos por amostra (N.º total = 1759 indivíduos), sendo os comprimentos amostrados representativos da distribuição do respectivo desembarque. Distribuíram-se os indivíduos por classes de comprimento de 0,5 cm e seleccionaram-se 5 de cada uma das classes extremas da distribuição de comprimentos e 5 da classe modal. Foram medidos o comprimento total (mm), o peso total (g) dos indivíduos e extraídos os otólitos (*sagittae*). Estes foram preservados em tubos *eppendorf* e divididos em duas amostras:

Amostra 1: Amostra de 36 otólitos, sendo 5 dos quais seleccionados da classe modal, por mês. Para a amostra de 20 de Maio de 2004 foram também seleccionados indivíduos das classes extrema (Tab. 1). Estes otólitos foram pesados e medidos os seus diâmetros, tendo sido posteriormente polidos. Após exclusão dos otólitos com problemas de malformações (Fig. 1) ou sobre-polimento, foram observadas e interpretadas as suas microestruturas para determinação da idade em dias e estimação das datas de nascimento. Estabeleceram-se as relações entre a idade e as características morfométricas dos otólitos e dos indivíduos.

Amostra 2: constituída pelos restantes otólitos, num total de 200, os quais foram pesados e medidos os seus diâmetros. Foram estimadas a idade e as datas de nascimento destes indivíduos com base na melhor relação encontrada na Amostra 1.



**Figura 1-** *Sagitta* de juvenil com estrutura cristalina anormal, capturado em 20 de Julho de 2004.

**Tabela 1** - Dados relativos às amostras estudadas.

<b>Data Captura</b>	<b>Porto</b>	<b>Embarcação</b>	<b>NOA</b>	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2</sub></b>	<b>A<sub>1</sub> + A<sub>2</sub></b>
20-05-2004	POV	Zé Calais	205	12	4	16
27-05-2004	POV	Armadores	184	5	32	37
04-06-2004	POV	Virgílio Miguel	99	-	45	45
28-06-2004	POV	Zé Calais	170	4	9	13
01-07-2004	MAT	Deus do Sol	150	-	11	11
20-07-2004	POV	Zé Calais	164	3	10	13
26-07-2004	MAT	Deus do Sol	102	-	14	14
24-08-2004	MAT	Fátima Torrão	110	2	9	11
06-09-2004	MAT	Zé Calais	107	-	14	14
23-09-2004	MAT	Mestre da Galileia	108	4	14	18
16-11-2004	POV	Fátima Torrão	87	-	15	15
19-11-2004	MAT	Henrique Câmbola	155	4	13	17
10-01-2005	MAT	Abraão Miguel	118	2	10	12
<b>Total</b>			1759	36	200	236

POV - Porto da Póvoa de Varzim; MAT - Porto de Matosinhos; NOA- Número de indivíduos amostrados; A<sub>1</sub> - Amostra 1; A<sub>2</sub>- Amostra 2.

## Amostras 1 e 2

### Pesagem dos otólitos

As membranas das câmaras epiteliais do ouvido interno dos peixes, ou os seus resíduos, aderem à superfície dos otólitos, pelo que se procedeu à remoção mecânica com pinças de relojoeiro e um pincel numa solução de hipoclorito de sódio (duas a três gotas em cerca de 5 ml de água) (Secor *et al.*, 1992).

Os otólitos foram lavados e posteriormente colocados a secar numa estufa a uma temperatura de 60 °C (Fletcher, 1991) durante 14 horas, seguido de uma hora num exsiccador. Posteriormente foram transferidos para placas com alvéolos escavados forrados com papel de alumínio e depois pesados numa micro-balança Mettler UMT2, com uma aproximação de 0,0001 mg.

De forma a verificar se existiam diferenças entre os pesos dos otólitos direito e esquerdo do mesmo indivíduo, escolheu-se uma das sub-amostras e pesaram-se ambos os otólitos. Aplicando um teste *t-Student* emparelhado (Zar, 1984) verificou-se que não existiam diferenças significativas nos pesos médios dos otólitos direito e esquerdo ( $t = -0,066$ ;  $n = 42$ ;  $p > 0,05$ ). Desta forma, escolheu-se o otólito esquerdo para a medição, a pesagem e a leitura de anéis diários.

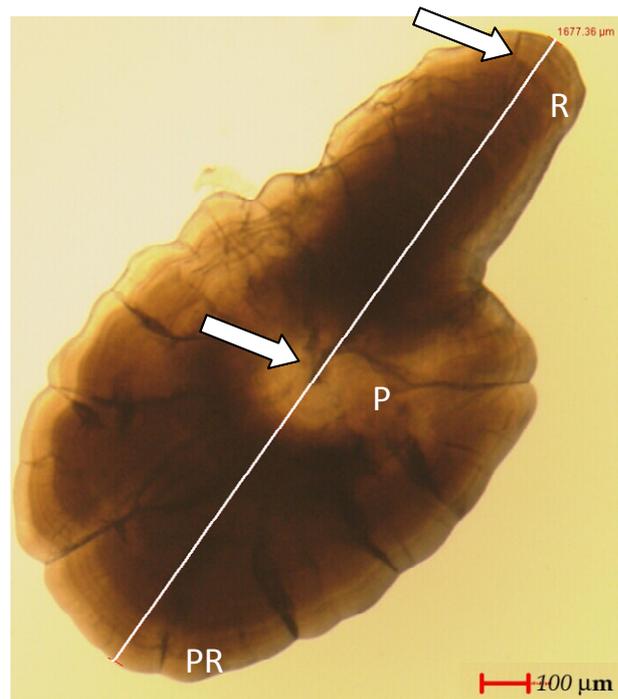
### Medição do diâmetro

Os diâmetros dos otólitos foram medidos com um sistema de análise de imagem devidamente calibrado, composto por uma lupa binocular Olympus SZX 1, uma câmara

digital Sony DFW-SX 910 ligada a um computador com o programa Visilog 6.3 © Noesis (<http://www.noesis.fr>).

As ampliações escolhidas foram aquelas que permitiam observar o otólito em todo o seu comprimento.

Para se obter o diâmetro do otólito, mediu-se o segmento de recta desde o ponto médio do rostro até ao postrostro. Os pontos de referência para o traçado foram o *primordium* (núcleo) e o centro do arco do rostro do otólito (Fig. 2).



**Figura 2** – Orientação do eixo (segmento de recta) usado para as medições e os pontos de referência (setas) do *sagitta* de juvenil de sardinha capturado a 8 de Junho de 2004. **R** - rostro; **P**- *primordium*; **PR** - postrostro.

## Amostra 1

### Processamento dos otólitos

Os otólitos foram montados à lupa com o sulco (face mediana do otólito) voltado para baixo numa lâmina de vidro, devidamente identificada, com uma gota de resina de secagem rápida e dureza média (*Entellan*®). De seguida, foram colocados na estufa a 37-40°C, durante pelo menos 12 horas, deixando-se posteriormente arrefecer num local livre de poeiras.

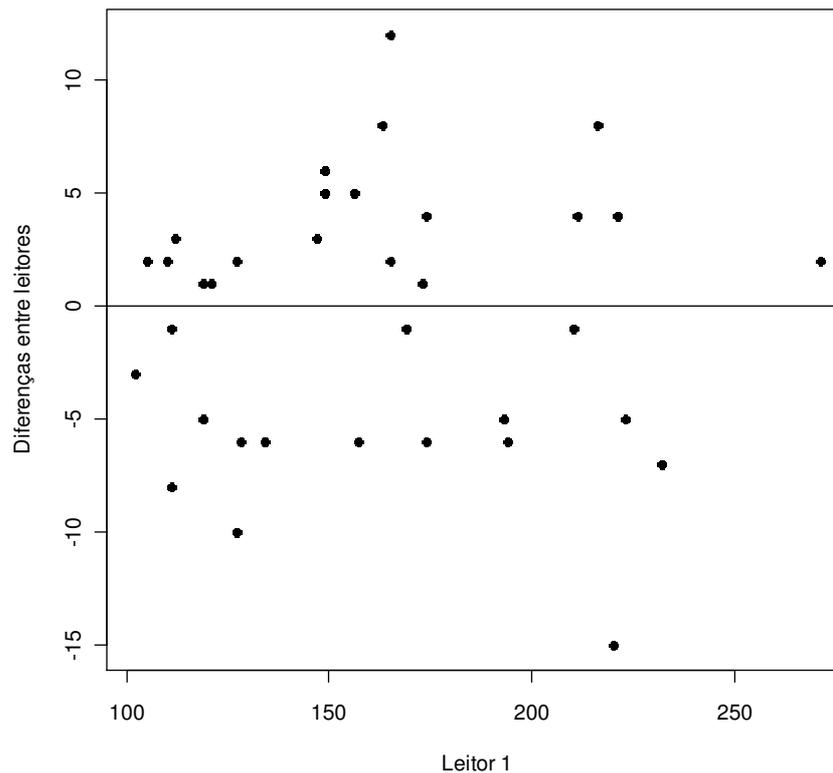
Após estas medições, os otólitos foram polidos com lixas microabrasivas com grão de 30 µm e 9 µm humedecidas com água destilada. Utilizou-se então uma lixa de grão 0,3 µm para espelhar a superfície do otólito de forma a obter uma resolução suficiente para a observação da microestrutura (Secor *et al.*, 1992).

Depois do polimento procedeu-se à aquisição de imagens de cada otólito usando o sistema de análise de imagem referido anteriormente, ligado a um microscópio Olympus GX 51. Usou-se uma ampliação de 200x. Dado que com esta ampliação não era possível visualizar os otólitos inteiros, fizeram-se séries de imagens sucessivas (mosaicos) de cada otólito de forma a obter-se uma cobertura completa da sua microestrutura. Realizaram-se 60 imagens em média para cada otólito. Os mosaicos foram montados numa única imagem formando o otólito completo, recorrendo ao programa de tratamento de imagem, Adobe® Photoshop® CS2, sendo no final convertida para uma escala de cinzentos. Para a contagem dos microincrementos utilizou-se a aplicação TNPC 4 do programa Visiolog 6.3, © Noesis (<http://www.noesis.fr>).

### **Leitura de idades e determinação da data de nascimento**

Para determinar a idade, contaram-se os anéis diários nos otólitos, correspondentes a uma sequência de zonas concêntricas opacas e translúcidas (hialinas) (Morales-Nin, 2000) e adicionaram-se 5 dias ao número de incrementos contados, correspondendo ao período médio decorrido desde a eclosão até à fase de primeira alimentação (Blaxter, 1969; Silva & Miranda, 1992). A partir desta fase passam a ser marcados os incrementos diários (Ré, 1986; Jones, 1992).

Os incrementos diários foram enumerados por dois leitores em separado, sendo o leitor 1, mais experiente, e compararam-se os resultados obtidos por cada um. Após discussão e nova leitura dos otólitos que apresentaram discordância, aqueles que mantiveram uma diferença superior a 15 dias foram excluídos (3 otólitos). Dos restantes, seleccionaram-se os que apresentavam um coeficiente de concordância (idade atribuída pelo leitor 1, a dividir pela idade atribuída pelo leitor 2), superior a 90 % (Pertierra, 1989). Na amostra final não se observaram diferenças significativas entre os dois leitores (*t-Student* para amostras emparelhadas;  $t = -0,68$ ;  $p > 0,05$ ;  $n = 36$ ), (Fig. 3). Para as análises subsequentes foi utilizada a média das idades atribuídas pelos dois leitores.



**Figura 3** – Diferença entre as idades atribuídas pelos leitores 1 e 2.

### **Análise estatística**

Para explorar a relação entre a idade das sardinhas (Id) e as variáveis comprimento individual (CI), peso individual (PI), diâmetro do otólito (DO) e peso do otólito (PO) calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Como todas as variáveis mostraram ser fortemente correlacionadas ( $0,82 < r < 0,98$ ; Amostras 1 e 2), realizou-se o diagnóstico de multicolinearidade calculando o Factor de Inflação da Variância (FIV). Este factor indica em que medida uma dada variável independente é explicada pelas outras variáveis independentes; valores superiores a 5 indicam colinearidade. Os valores de FIV encontrados confirmaram a existência de multicolinearidade entre as variáveis morfométricas e, dado que a sua existência torna impossível determinar correctamente a contribuição individual de cada uma das variáveis num modelo de regressão linear múltipla (Faraway, 2002), ajustaram-se modelos de regressão linear simples, usando a idade como variável dependente e cada uma das variáveis morfométricas separadamente como variáveis independentes. A idade das sardinhas foi transformada para uma escala logarítmica para se assegurar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Os testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) e a análise gráfica dos resíduos dos modelos confirmaram que não houve violações graves destes pressupostos.

Realizou-se também uma regressão de componentes principais (PCR, Massy, 1965), método que permite contornar o problema da multicolinearidade e utilizar o conjunto de todas as variáveis morfométricas para estimar a idade dos indivíduos. Este método compreende a realização de uma Análise de Componentes Principais (PCA) das variáveis morfométricas, a partir da matriz de correlações, e a utilização das componentes principais como variáveis independentes num modelo de regressão linear múltipla passo a passo. O melhor modelo PCR encontrado incluiu a primeira Componente Principal (PC1).

De forma a verificar quais dos modelos de regressão que permitiam prever a idade com maior precisão, calcularam-se intervalos de confiança de predição (ICP) para cada regressão linear (Zar, 1984). Estes intervalos foram calculados para dois valores de cada variável independente, sendo que um dos pontos calculados correspondeu a um valor próximo do mínimo, e o outro correspondeu a um valor situado no ponto médio da recta. Os valores, preditos em número de dias, e respectivos ICP's foram anti-logaritmizados. Uma vez que a PCR não melhorou o modelo de previsão da idade de juvenis de sardinha e, como segundo Fossen *et al.* (2003), os otólitos permitem prever mais objectivamente e com maior precisão a idade porque contêm informação sobre o número de dias do peixe e taxa de crescimento individual, estimaram-se as idades dos indivíduos da Amostra 2 usando o modelo de regressão estimado pelo peso dos otólitos. As datas de nascimento foram determinadas subtraindo a idade em dias, estimada pela recta, à data de captura.

A determinação dos modelos de regressão e a PCR foram realizados com o *software* IBM SPSS *Statistics* 19, e as restantes análises foram realizadas no software STATISTICA 7.0

As inferências estatísticas foram baseadas a um nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS

A análise descritiva dos dados (média, mínimo, máximo e desvio padrão) encontra-se sumariada na Tabela 2. Para a Amostra 1 verificou-se que as idades determinadas variaram entre 103-270 dias (3,5 a 8,5 meses), correspondentes a indivíduos de comprimento total entre 6,7 – 12,9 cm. Os indivíduos da Amostra 2 apresentavam comprimentos ligeiramente superiores aos da Amostra 1. Desta forma também os pesos e diâmetros máximos dos otólitos foram superiores na Amostra 2.

**Tabela 2** - Sumário da análise das amostras de otólitos de *S. pilchardus*.

	<b>A<sub>1</sub></b>				<b>A<sub>2</sub></b>			
	<b>Média</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máx.</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Média</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>CI (cm)</b>	10,1	6,7	12,9	1,9	11,1	7,3	15,8	2,0
<b>PI (g)</b>	8,0	1,8	15,7	4,1	10,7	2,6	30,4	6,1
<b>DO (µm)</b>	1642,0	976,3	2264,2	408,5	1846,8	1286,9	2597,3	332,5
<b>PO (mg)</b>	0,4	0,12	0,7	0,2	0,5	0,2	1,1	0,2
<b>Id (dias)</b>	162,7	103	270	43,5	184,0*	125,4*	358,4*	49,9*

A<sub>1</sub> - Amostra 1; n= 36 otólitos. A<sub>2</sub> - Amostra 2; n= 200 otólitos. **CI** - Comprimento Individual; **PI** - Peso individual; **DO** - Diâmetro dos otólitos; **PO** - Peso dos otólitos; **Id** - Idade; \*Valores estimados pela relação Log(id)-PO.

### Relação entre as variáveis morfométricas

Os resultados da análise de correlação entre as variáveis morfométricas consideradas são apresentados na Tabela 3. As correlações entre as variáveis foram altamente significativas ( $P < 0,05$ ), com os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) a variarem entre 0,91 e 0,98 para a Amostra 1 e entre 0,82 e 0,97 para a Amostra 2.

**Tabela 3** - Correlações ( $r$ ) entre as variáveis para a Amostras 1 (acima da diagonal) e Amostra 2 (abaixo da diagonal).

	<b>CI</b>	<b>PI</b>	<b>DO</b>	<b>PO</b>	<b>Id</b>
<b>CI</b>	-	<b>0,98</b>	<b>0,97</b>	<b>0,93</b>	<b>0,91</b>
<b>PI</b>	0,97	-	<b>0,94</b>	<b>0,91</b>	<b>0,90</b>
<b>DO</b>	0,94	0,90	-	<b>0,97</b>	<b>0,94</b>
<b>PO</b>	0,85	0,82	0,92	-	<b>0,94</b>

### Relação entre a idade e as variáveis morfométricas

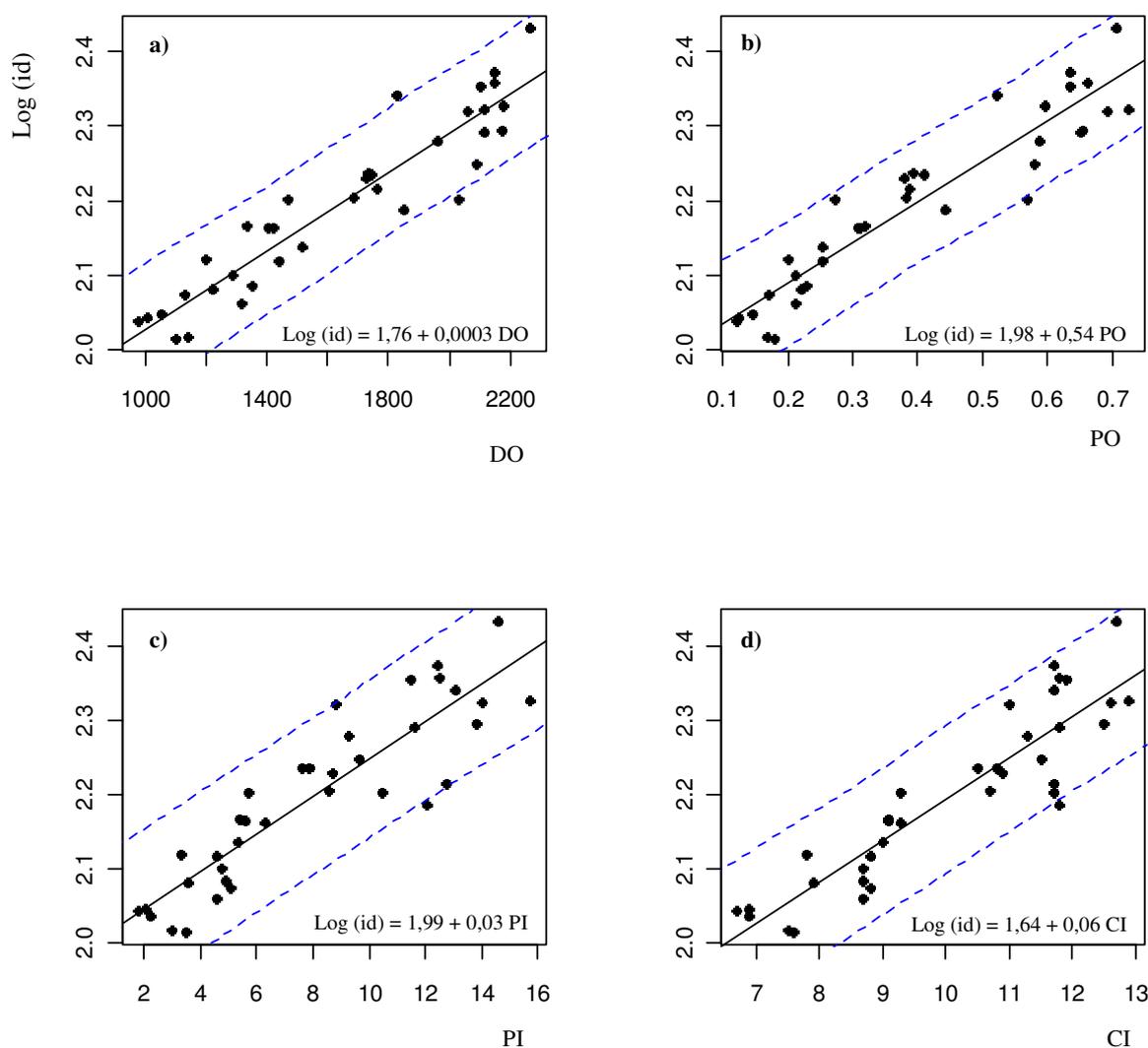
Estabeleceu-se a correlação entre a idade e as variáveis em estudo. A idade apresentou correlações significativas com todas as características morfométricas analisadas, sendo as obtidas com as variáveis associadas aos otólitos ( $r = 0,94$  para PO e DO), ligeiramente superiores às observadas com as características morfométricas dos indivíduos ( $r = 0,91$  para CI e  $r = 0,90$  para PI), (Tab. 3).

As estimativas pontuais da idade da sardinha a partir das variáveis associadas aos otólitos foram semelhantes, mas os intervalos de confiança da predição para o PO foram ligeiramente inferiores (Fig. 4). Os erros de predição superior e inferior, usando o PO variaram, em média, cerca de 19% correspondendo a 19 e 23 dias, para uma idade de 104 dias para o ponto mínimo e 31 e 37 dias para uma idade de 178 dias (Tab. 4).

**Tabela 4** – Parâmetros dos modelos de Regressão linear simples, relacionando o Log(id) com as características em análise e respectivos intervalos de confiança da predição.

	$r^2$	Valor usado na predição	Estimativa pontual	ICP 95%	% Erro ICP Sup.	% Erro ICP Inf.
<b>Log(id) = 1,98 + 0,54 PO</b> (0,02) (0,03)	0,88	0,1	108	(89,3; 130,8)	17,3	21,0
		0,5	178	(147,1; 215,0)	17,3	20,9
<b>Log(id) = 1,76 + 0,0003 DO</b> (0,03) (0,00002)	0,87	913	108	(88,9; 131,4)	17,7	21,5
		1633	178	(146,4; 215,9)	17,7	21,5
<b>Log(id) = 1,64 + 0,06 CI</b> (0,04) (0,004)	0,83	6,6	109	(86,9; 135,8)	20,0	25,0
		10,2	179	(142,9; 223,1)	20,0	25,0
<b>Log(id) = 1,99 + 0,03 PI</b> (0,02) (0,002)	0,81	1,5	108	(85,0; 138,3)	21,6	28,0
		8,7	178	(140,0; 227,0)	21,5	27,4
<b>Log(id) = 2,20 - 0,11 PC1</b> (0,007) (0,007)	0,88	1,5	108	(89,2; 131,7)	17,7	21,5
		- 0,5	180	(148,8; 217,5)	17,3	20,9

Os valores em parênteses representam os erros padrão. ICP – Intervalo de Confiança da Predição;  $r^2$  – Coeficiente de determinação; ICP 95% - Intervalos de confiança de predição a 95%



**Figura 4** - Relações entre o logaritmo da idade das sardinhas e as características morfométricas dos otólitos e dos indivíduos. **a)** Relação com o diâmetro do otólito;  $F(1,34) = 237,5$ ;  $p < 0,05$ . **b)** Relação com o peso do otólito;  $F(1,34) = 250,8$ ;  $p < 0,05$ . **c)** Relação com o peso individual;  $F(1,34) = 142,2$ ;  $p < 0,05$ . **d)** Relação com o comprimento individual;  $F(1,34) = 166,8$ ;  $p < 0,05$ . As rectas descontínuas a azul representam o limite do intervalo de predição a 95%.

### Regressão de Componentes Principais

A primeira componente (PC1) apresentou uma forte relação com todas as variáveis em estudo, explicando cerca de 96,1% da variabilidade total (Tab. 5).

A PCR mostrou que o melhor modelo para determinar a idade das sardinhas inclui apenas a PC1 (Tab. 4). A percentagem de variância da idade explicada por este modelo foi de 88%, o que, comparativamente com as regressões analisadas anteriormente, não melhorou significativamente a relação com a idade. Os intervalos de confiança da predição foram semelhantes aos encontrados para as relações  $\text{Log}(\text{id}) - \text{PO}$  e  $\text{Log}(\text{id}) - \text{DO}$ . (Tab. 4)

**Tabela 5** - Matriz das PC's Componentes Principais

	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>
<b>CI</b>	<b>0,98</b>	0,01
<b>PI</b>	<b>0,95</b>	0,04
<b>DO</b>	<b>0,98</b>	0,01
<b>PO</b>	<b>0,94</b>	0,05
<b>Valor Próprio</b>	3,8	0,1
<b>% Variância</b>	96,1	2,9
<b>% Cumulativo</b>	96,1	99,0

### Estimação das idades e das datas de nascimento

As idades médias observadas (Amostra 1) e estimadas (Amostra 2) variaram entre os 103 dias e 358 dias, correspondendo a datas mínimas e máximas de nascimento entre 1 Novembro de 2003 e 6 de Junho de 2004. Verifica-se que a data de nascimento média das sardinhas, para cada uma das amostras, se situa entre os meses de Janeiro e Março, à excepção da amostra de 10 de Janeiro de 2005, em que a média de nascimento se situou no início do mês de Junho de 2004 (Tab. 6).

A distribuição das datas de nascimento, estimadas pela contagem de anéis diários nos otólitos dos juvenis de sardinha mostrou que cerca de 80% dos indivíduos nasceram no período de Janeiro – Março de 2004 (Fig.5). Esta figura sugere também, durante o intervalo de tempo referido, a existência de três períodos modais; o primeiro, e mais evidente, a meio do mês de Janeiro de 2004. Os restantes períodos modais tiveram um menor número de nascimentos e ocorreram no final de Fevereiro e início de Março de 2004.

A figura 5 mostra também a ocorrência de nascimentos nos meses de Junho e Julho de 2004.

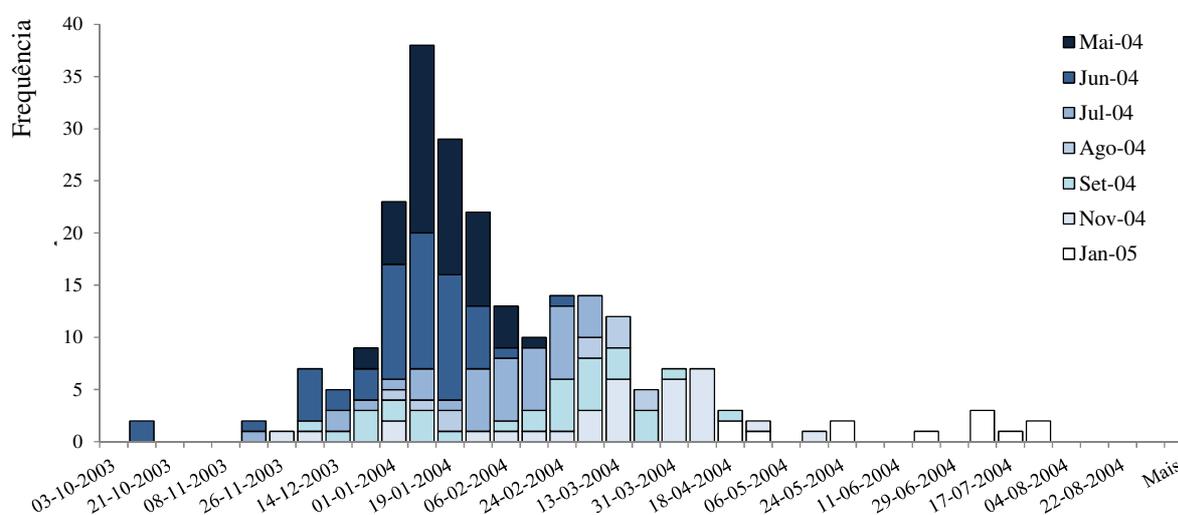
Tabela 6 – Datas de nascimento para as amostras 1 e 2.

Amostras	2003			2004					
	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
20-Mai-04									
27-Mai-04									
04-Jun-04									
28-Jun-04									
01-Jul-04									
20-Jul-04									
26-Jul-04									
24-Ago-04									
06-Set-04									
23-Set-04									
16-Nov-04									
19-Nov-04									
10-Jan-05									

A cinzento: o intervalo de datas de nascimento para cada amostra . Linha vermelha vertical dia médio de nascimento.

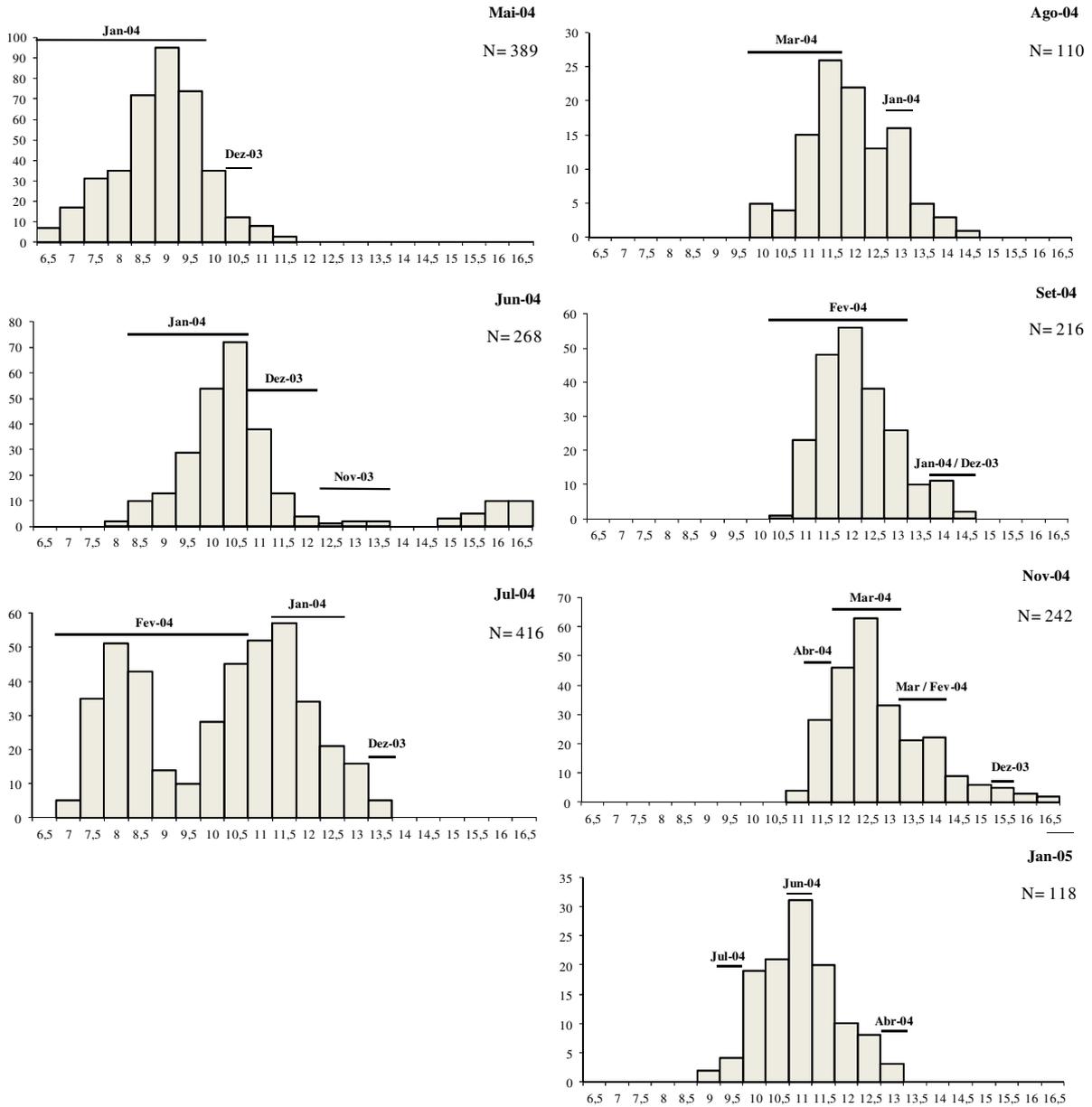
A progressão das modas das distribuições de comprimento mostra alguma coerência com o crescimento de grupos de juvenis nascidos no mesmo mês (Fig. 6). As sardinhas, nascidas em Janeiro de 2004, mostraram um aumento de comprimento total modal de 6,5 cm em Maio 2004 para, 13 cm em Agosto de 2005 (cerca de 90 dias), correspondendo portanto a uma taxa de crescimento média de  $0,07 \text{ cm dia}^{-1}$ . Do mesmo modo, as sardinhas com data de nascimento estimada em Fevereiro de 2004, apresentaram uma taxa de crescimento média de  $0,07 \text{ cm dia}^{-1}$ , entre Julho e Setembro de 2004.

A estimativa de crescimento de sardinhas amostradas de Maio a Novembro de 2004, cuja data de desova estimada ocorreu em Dezembro de 2003, mostrou um aumento no comprimento total de 10 cm para 15,5 cm durante cerca de 180 dias, correspondendo a uma taxa de crescimento média de  $0,03 \text{ cm dia}^{-1}$ . Foi observada uma taxa análoga para as sardinhas com data de nascimento estimada em Março de 2004, num período de 90 dias, nas sardinhas com 10 cm em Agosto de 2004, que cresceram até 13 cm em Novembro de 2004. Estas tiveram portanto uma taxa de crescimento médio de  $0,03 \text{ cm dia}^{-1}$ .



**Figura 5** – Distribuição da data de nascimento das sardinhas estimadas pela relação  $\text{Log}(\text{id}) - \text{PO}$ , para as amostras 1 e 2;  $n= 236$ .

n



Comprimento (cm)

**Figura 6** – Distribuição de classes de comprimento das sardinhas desembarcadas e datas estimadas pelas Amostras 1 e 2. Linhas contínuas e meses indicam a data média de nascimento determinada pela relação Log(id) – PO.

## DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o logaritmo da idade dos juvenis de sardinha apresenta correlações lineares positivas com as quatro variáveis morfométricas analisadas: o peso e o diâmetro dos otólitos e o peso e o comprimento dos indivíduos. As características associadas à morfologia dos otólitos, peso e diâmetro, foram as mais correlacionadas com o logaritmo da idade ( $r= 0,94$  em ambos os casos), explicando 88% e 87% da variabilidade total, respectivamente. O peso dos otólitos permite prever a idade com maior precisão do que as outras variáveis; os erros da estimativa da idade (anti-logaritmizada) variaram, em média, cerca de 19% correspondendo a 21 dias para um valor baixo de peso do otólito (indivíduos com 108 dias e cerca de 7 cm) e 30 e 36 dias para um valor médio de peso do otólito (indivíduos com 177 dias e cerca de 10 cm). Para além disso, não se observou melhoria na predição da idade quando as variáveis foram usadas em conjunto. As idades dos juvenis capturados no Norte de Portugal entre Junho de 2004 e Janeiro de 2005 variaram entre 103 dias e 269 dias (amostra 1, directamente observados), sendo mais frequentes indivíduos de 130-180 dias. As datas de nascimento médias por amostra situaram-se entre final de Dezembro e início de Março, isto é, dentro da época principal de desova da espécie na nossa costa. As distribuições das datas de nascimento sugerem a existência de diferentes sub-coortes da coorte anual de 2004, com taxas médias de crescimento semelhantes e próximas de  $0,07 \text{ cm dia}^{-1}$ , para os que nasceram em Janeiro de 2004 e Fevereiro de 2004. Para os nascidos nos meses de Dezembro de 2003 e Março de 2004 verificou-se uma taxa de crescimento média de  $0,03 \text{ cm dia}^{-1}$ .

Medições dos otólitos e dos indivíduos têm fornecido resultados satisfatórios na determinação da idade em peixes adultos de várias espécies de zonas temperadas e tropicais (Boehlert, 1985; Pawson, 1990; Flecher 1991, 1995; Araya *et al.*, 2001; Lou *et al.* 2007). Por exemplo, Boehlert (1985) refere que a combinação do peso dos otólitos com o comprimento dos indivíduos permite estimar a idade de *Sebastes diplopoa* com precisão idêntica à da leitura directa de anéis de crescimento. Também Pawson (1990) verificou ser possível classificar correctamente a idade de adultos de sardinela – lombuda (*Sardinella aurita*) a partir do peso dos otólitos e do comprimento dos indivíduos em 82% dos casos e Fletcher (1991, 1995) verificou uma boa correspondência entre idades determinadas com base na leitura de otólitos e nas classes modais das distribuições de frequências dos pesos dos otólitos na sardinha da Austrália (*Sardinops sagax*). No entanto, Francis & Campana (2004) alertam

para alguma precaução na atribuição de idades a partir de relações com o peso dos otólitos. Estes autores observaram que a estimação da estrutura etária das populações a partir destes dados pode estar enviesada, recomendando a aplicação de um modelo de análise misto que inclua parâmetros morfométricos dos otólitos e do peixe.

Em peixes adultos, o uso das características dos otólitos, para determinar a idade baseia-se em dois aspectos. O primeiro está relacionado com o facto do crescimento do otólito ser contínuo ao longo de toda a vida. Em algumas espécies, particularmente no caso dos clupeídeos, o crescimento somático é rápido durante o primeiro ano e diminui até ser quase nulo nos anos seguintes. Desta forma, peixes com o mesmo comprimento podem diferir em vários anos (Francis & Campana, 2004).

O segundo aspecto está relacionado com o facto do crescimento dos otólitos, em peso, ser afectado em menor grau e mais lentamente por condições ambientais adversas, como a temperatura ou a falta de alimento. O crescimento dos otólitos é portanto mais “conservador” reflectindo melhor a idade dos peixes, (Folkvord *et al.*, 2000; Meneses, 2003; Lou *et al.*, 2005).

Pawson (1990) e Fletcher (1995) verificaram que indivíduos de comprimento semelhante podem ser distinguidos pelo peso dos otólitos, superior nos mais velhos. No caso dos juvenis, esta característica de crescimento dos otólitos é igualmente útil e possivelmente explica a maior correlação da idade com as dimensões morfométricas dos otólitos do que com as dimensões morfométricas dos indivíduos observada no presente estudo.

As leituras directas dos otólitos (Amostra 1), mostraram que a idade dos juvenis com comprimentos entre 6,7 e 12,9 cm variou entre 103 e 270 dias e a taxa média de crescimento variou entre 0,03-0,07 cm dia<sup>-1</sup> (Figs. 4 e 6). Estes resultados encontram-se dentro da gama de valores obtidos para a sardinha por outros autores. Por exemplo, Meneses (2003) determinou idades entre 125 e 250 dias em juvenis com 7-14 cm recolhidos no Inverno de 1989 e Primavera de 1989 e 1990, na zona de Peniche, estimando taxas de crescimento de 0,028 cm dia<sup>-1</sup> no período de Verão e 0,022 cm dia<sup>-1</sup> no período de Inverno. Alemany *et al.* (2006) reporta idades entre 116 e 294 dias para juvenis de 8 a 17,2 cm e uma taxa média de crescimento de 0,04 cm dia<sup>-1</sup> recolhidos no Mar de Alborán (sudoeste do Mediterrâneo) também em 2004.

As datas de nascimento dos juvenis de sardinha situaram-se entre o início de Novembro de 2003 e o final de Abril de 2004, excepto para a amostra de Janeiro de 2005 (Tab. 6), ou

seja, dentro da época principal de desova da espécie na costa Portuguesa (Ré *et al.*, 1986 e 1990, Coombs *et al.*, 2006; Stratoudakis *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2011). A época de desova da sardinha é extensa, ocorrendo principalmente de Outubro a Abril embora exista alguma actividade reprodutiva ao longo de todo o ano (Garcia *et al.*, 1992; Álvarez & Alemany, 1997; Meneses, 2003; Coombs *et al.*, 2006; Stratoudakis *et al.*, 2007). As datas médias de nascimento concentraram-se em Janeiro e Fevereiro, o que também está de acordo com a existência de um pico de desova entre Dezembro e Fevereiro (Nunes *et al.*, 2011). Contudo, os juvenis da amostra de Janeiro de 2005 nasceram entre meados de Abril e finais de Julho de 2004 (média em Junho) o que indica actividade reprodutora no Verão possivelmente combinada com uma taxa de sobrevivência elevada dos indivíduos nascidos nesse período. Também Meneses (2003) observou que o nascimento dos indivíduos recolhidos em Peniche ocorreu fora da época principal de desova o que estava associado à maturação de adultos no período de Verão. Dados relativos à sazonalidade da desova baseados na ocorrência de ovos e na evolução da maturação sexual dos adultos evidenciam actividade reprodutora, embora residual, fora da época principal de desova (Ré, 1986 e 1990; Nunes *et al.*, 2011).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a relacionar a idade em dias com características morfométricas dos otólitos com o objectivo de prever a idade de indivíduos juvenis. Os resultados mostraram que o peso dos otólitos permitiu prever a idade de juvenis de sardinha com 7 a 16 cm de comprimento total com um erro de cerca de 19%. Embora não seja possível avaliar o rigor das idades atribuídas com base nesta relação, nomeadamente porque os trabalhos de validação da determinação directa da idade são escassos ou não existem, a coerência das relações comprimento-idade, das datas de nascimento e das taxas de crescimento obtidas com resultados de outros autores conferem algum suporte aos resultados. No entanto, a amostra usada para as leituras directas foi de 36 otólitos e o erro da predição da idade foi moderado, o que implicou maior incerteza em parâmetros estimados a partir das idades e consequentemente menor capacidade de detectar diferenças significativas em eventuais comparações (por exemplo, taxas de crescimento).

A análise de microincrementos dos otólitos para estimar idades é um processo moroso, metodologicamente difícil e dispendioso, acabando por limitar o desenvolvimento de estudos de crescimento e sobrevivência da fase juvenil. O registo de dados morfométricos dos otólitos é comparativamente simples e rápido constituindo uma forma de complementar as leituras directas e obter maior volume de dados. Tal como verificado em indivíduos adultos (*e.g.* Lou

*et al.*, 2007), é provável que as relações entre o peso dos otólitos e a idade variem com o ano e a área geográfica, sendo importante utilizar sempre amostras de calibração nas quais se efectuaram leituras directas (Francis & Campana, 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMANY, F., ÁLVAREZ, I., GARCÍA, A., CORTÉS, D., RAMIZES, T., QUINTANILLA, J., ÀLVAREZ, F., RODRIGUEZ, M., 2006. Post larvae and juvenile daily growth patterns of the Alboran Sea sardine (*Sardina pilchardus* Wald.): influence of wind. *Scientia Marina*, 93-104.

ÀLVAREZ, F., ALEMANY, F., 1997. Birthdate analysis and it's application to the study of recruitment of the Atlanto-Iberian sardine, *Sardina pilchardus*. *Fisheries Bulletin*, 95: 187-194.

ARAYA, M., CUBILLOS, L.A., GUZMÁN, M., PEÑAILILLO, SEPÚLVEDA, A., 2001. Evidence of a relationship between age and otolith weight in the Chilean jack mackerel *Trachurus symmetricus murphy* (Nichols). *Fisheries Research*, 51: 17-26.

BERNAL, M., STRATOUDAKIS, Y., COOMBS, S., ANGELICO, M.M., LAGO DE LANZO, A., PORTEIRO C., SAGARMINAGA Y., SANTOS M., URIARTE A., CUNHA E., VALDE'S L., BORCHERS, D., 2007. Sardine spawning off the European Atlantic coast: Characterization of and spatio-temporal variability in spawning habitat. *Progress in Oceanography*, 74: 210-227.

BLAXTER, J. H. S., 1969. Visual thresholds and spectral sensitivity of flatfish larvae. *Journal of Experimental Biology*, 51: 221-230.

BOEHLERT, G. W., 1985. Using objective criteria and multiple regression models for age determination in fishes. *Fisheries Bulletin U. S.*, 83: 103-117.

COOMBS, S. H., SMYTH, T. J., CONWAY, D. V. P., HALLIDAY, N. C., BERNAL, M., STRATOUDAKIS, Y., ÁLVAREZ, P., 2006. Spawning season and temperature relationships for sardine (*Sardina pilchardus*) in the eastern North Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 86: 1245–1252.

DGPA, 2010. Recursos da Pesca – Série estatística 2009, Volume 23 A-B. DGPA – Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, Lisboa, 181p.

- FARAWAY J. J., 2002. Practical Regression and Anova using R. <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf>, 213p.
- FLETCHER, W.J., 1991. A test of the relationship between otolith weight and age for the Pilchard *Sardinops neopilchardus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 35-38.
- FLETCHER, W.J., 1995. Application of the otolith weight-age relationship for the Pilchard, *Sardinops sagax neopilchardus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 657-664.
- FOLKVORD, A., BLOM, G., JOHANNENSSSEN, A., MOKSNESS, E., 2000. Growth-dependent age estimation in herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Fisheries Research*, 46 : 91-103.
- FOSSSEN, I., ALBERT, O., NILSSEN, E., 2003. Improving the precision of ageing assessments for long rough dab by using digitalized pictures and otoliths measurements. *Fisheries Research*, 60: 53-64.
- FRANCIS, R.I.C., CAMPANA, S.E., 2004. Inferring age from otolith measurements: a review and a new approach. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 91: 1269-1284.
- GARCIA, A., PÉREZ, N., LO, N.C., LAGO DE LANZOS, A., SOLÁ, A. 1992. The egg production coast. *Bol. Inst. Esp. Ocean.*, 8: 123-138.
- GARRIDO, S., BEN-HAMADOU, R., OLIVEIRA, P., CUNHA, M., CHÍCHARO, M., LINGEN, C., 2008. Diet and feeding intensity of sardine *Sardina pilchardus*: correlation with satellite-derived chlorophyll data. *Marine Ecology Progress Series*, 354: 245-256.
- ICES, 2010. Report of the Working Group on Anchovy and Sardine (WGANSAs). ICES CM 2010/ACOM: 16, 295p.
- JONES, C.M., 1992. Development and application of the otolith increment technique, p.1-11 In D.K. Stevenson e S.E. Campana (eds.) Otolith Microstructure Examination and Analysis. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 117: 1-11.
- LABROPOULOU, M., PAPACONSTANTINO, C., 2000. Comparison of otolith growth and somatic growth in two macrourid fishes. *Fisheries Research*, 46: 177-188.
- LOU, D.C., MAPSTONE, B.D., RUSS, G.R., BEGG, G. A., DAVIES, C. R., 2005. Using otolith-weight relationship to predicted age based metrics of coral reef fish populations across different temporal scales. *Fisheries Research*, 71: 279-294.

- LOU, D. C., MAPSTONE, B. D., RUSS, G. R., BEGG, G. A., DAVIES, C. R., 2007. Using otolith weight-age relationships to predict age based metrics of coral reef fish populations across different temporal scales. *Fisheries Research*, 83: 216-227.
- MASSY, W. F., 1965. Principal Components Regression in Exploratory Statistical Research. *Journal of the American Statistical Association*, 60 (309): 234-256.
- MENESES, I., 2003. Estimação de factores que Condicionam a Variabilidade do Recrutamento de Peixes na Costa Atlântica da Península Ibérica. PhD Thesis, INIAP/IPIMAR, 328p.
- METÍN, G., İLKHAZ, A., 2008. Use of otolith length and weight in age determination of poor cod (*Trisopterus minutus* Linn., 1758). *Turk. J. Zool.*, 38: 293-297.
- MORALES-NIN, B., 2000. Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research*, 46: 53-67.
- NUNES, C., SILVA, A., SOARES, E., GANIAS, K., 2011. The use of hepatic and somatic indices and histological information to characterize the reproductive dynamics of Atlantic Sardine *Sardina pilchardus* from the Portuguese coast. *Marine and Coastal Fisheries*, 3: 127-144.
- PANELLA, G., 1974. Otolith growth patterns: an aid in age determination in temperate and tropical fishes. In T.B. Bagenal (ed.), *Aging of fishes*. Unwin Bros. Ltd., England: 28-29.
- PANELLA, G., 1980. Growth patterns in fish *sagittae* In *Skeletal growth of aquatic organisms: Biological Records of Environmental Change*. Plenum Press, New York, 519-560p.
- PARRISH, R.H., SERRA, R., GRANT, W.S., 1989. The monotypic sardines, *Sardine* and *Sardinops*: their taxonomy, distribution, stock structure and zoogeography. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(11): 2019-2036.
- PAWSON, M.G., 1990. Using otolith weight to age fish. *Journal of Fish Biology*, 36: 521-531.
- PERTIERRA, J. P., 1989. Sardine growth in the Catalan Sea (NW Mediterranean) determined by means of otolith interpretation and length frequency data. *Scientia Marina*, 53 (4): 821-826.

- TEMPLEMAN, W., SQUIRES, H. J., 1956. Relationship of otolith lengths and weights in the haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) to the rate of growth of the fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 13: 467-487.
- RÉ, P., CABRAL E SILVA, R., CUNHA, M. E., FARINHA, A., MENESES, I., MOITA, T., 1990. Sardine spawning off Portugal. *Boletim Instituto Nacional Investigação das Pescas*, 15: 31-44.
- RÉ, P., 1986. Otolith microstructure and detection of life history events in sardine and anchovy larvae. *Ciênc. Biol. Ecol. Syst.*, 6(1/2): 9-17.
- SANTOS, A. M. P., PELIZ, A., DUBERT, J.; OLIVEIRA, P. B., ANGELICO, M. M., RÉ, 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: 149-165.
- SECOR, D.H., DEAN, J.M., LABAN, E.H., 1992. Otolith removal and preparation for microstructure examination p.19-57 In D.K. Stevenson e S.E. Campana (eds.) Otolith Microstructure Examination and Analysis. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 117: 19-57.
- SILVA, A., MIRANDA, A., 1992. Laboratory rearing of sardine larvae, *Sardina pilchardus* (Walb.), and early effects of starvation: a preliminary experiment. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 8 (1): 163-174.
- SILVA, A., SKAGEN, D. W., URIARTE, A., MASSÉ, J., SANTOS, M. B., MARQUES, V., CARRERA, P., BEILLOIS, P., PESTANA, G., PORTEIRO, C., STRATOUDAKIS, Y., 2009. Geographic variability of sardine dynamics in the Iberian Biscay region. *ICES Journal of Marine Science*, 66: 495-508.
- SINOVIĆ, G., KEČ, V. C., ZORICA, B., 2008. Population structure, size at maturity and condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walb., 1792), in the nursery ground of the eastern Adriatic Sea (Krka River Estuary, Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76: 739-744.
- STRATOUDAKIS, Y., COOMBS, S., LAGO DE LANZÓS, A., HALLIDAY, N., COSTAS, G., CANECO, B., FRANCO, C., 2007. Sardine (*Sardina pilchardus*) spawning seasonality in European waters of the northeast Atlantic. *Marine Biology*, 152: 201–212.
- WILHELM, M.R., PAINTING, S.J., FIELD, J.G., KERSTAN, M., DURHOLTZ, M.D., 2005. Impact of environmental factors on survival of larval and juvenile Cape anchovy

*Engraulis encrasicolus* (G.) in the southern Benguela upwelling region, determined from hatch-date distributions: implications for recruitment. *Marine Freshwater Research*, 56: 561-572.

WOOTON, R. J., 1998. Ecology of teleost fishes. Kluwer Academic Publishers. *Fish and Fisheries Series 24*. London, 386 p.

ZAR, J.H., 1984. Biostatistical analysis. 2nd ed. Prentice-Hall, (eds), Englewood Cliffs, New Jersey, 718p.