

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

EFEITOS DA SALINIDADE SOBRE OVOS, LARVAS E JUVENIS
DO LINGUADO *Paralichthys orbignyanus*

LUCIANO DE SIQUEIRA FREITAS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

RIO GRANDE, RS, BRASIL

JULHO DE 2005

ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução	1
O linguado	1
A salinidade	3
Objetivo Geral	6
Objetivos Específicos	6
Materiais e Métodos	7
Salinidades Experimentais	7
Experimento 1: Efeitos da salinidade sobre a fertilização artificial	7
Experimento 2: Sobrevivência de larvas e juvenis de diferentes idades em água doce	9
Experimento 3: Efeitos da salinidade na sobrevivência e crescimento de larvas	12
Experimento 4: Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado cultivados em baixas salinidades	13
Biometrias e análise dos dados	14
Resultados	16
Experimento 1: Efeitos da salinidade sobre a fertilização artificial	16
Experimento 2: Sobrevivência de larvas e juvenis de diferentes idades em água doce	17
Experimento 3: Efeitos da salinidade na sobrevivência e crescimento de larvas	18
Experimento 4: Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado cultivados em baixas salinidades	21

Discussão	26
Conclusões	37
Referências Bibliográficas	38

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao orientador – Dr. Luís André Sampaio – pela orientação durante a condução dos experimentos e no desenvolvimento dessa dissertação.

Aos Drs. Adalto Bianchini e Evoir Zaniboni – pelas críticas e sugestões apresentadas a esse trabalho.

Aos órgãos financiadores – CNPq, Sul-Química LTDA e SCT-RS – pela ajuda financeira essencial para a realização dos experimentos.

Aos estagiários, alunos e amigos da Estação Marinha de Aqüicultura, cujos nomes eu não poderia deixar de mencionar – Andréa (sem 'i') Ferreto, Ricardo Robaldo, Marcelo Okamoto, Ricardo Rodrigues, Cristina Carvalho e Camila Souza – obrigado pela sua participação direta nesses experimentos.

Aos demais estagiários da piscicultura – que participaram da produção de rotíferos, *Artemia* e microalgas, sendo de grande importância para a realização desse trabalho.

Ao restante da equipe da EMA – professores, funcionários e estagiários – que estão sempre contribuindo de alguma forma para o desenvolvimento da piscicultura marinha no Brasil.

Às pessoas mais presentes durante esses dois anos (e meio) de mestrado – Dona Norma, Seu Nelson e Dona Juliana – obrigado pela paciência e pelo apoio!

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da salinidade sobre a fertilização artificial e o cultivo de larvas e juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Foi avaliada a influência da salinidade (10, 15, 25 e 35) sobre a fertilização artificial dos óvulos. Na salinidade 10, não houve fertilização, mas a partir da salinidade 15, as taxas de fertilização foram diretamente proporcionais à salinidade, sendo iguais a 15, 40 e 75% nas salinidades 15, 25 e 35, respectivamente. Apesar de ter ocorrido fertilização nestas três salinidades, a eclosão das larvas ocorreu somente na salinidade 35. Foi avaliada a resistência de larvas (6 e 16 dias de idade) e de juvenis (30, 45 e 60 dias de idade) de linguado à água doce. Nenhuma larva com 6 dias de idade sobreviveu à água doce, sendo que a sobrevivência das larvas com 16 dias de idade foi de 93%. Nenhuma mortalidade de juvenis foi observada durante este experimento. O efeito de diferentes salinidades (5, 10, 20 e 30) sobre a sobrevivência, o crescimento e o tempo de assentamento de larvas de linguado foi avaliado. Nenhuma larva sobreviveu à salinidade 5, mas a partir da salinidade 10, a sobrevivência aumentou proporcionalmente com o aumento de salinidade. Na salinidade 10 foi detectado um menor crescimento ($P < 0,05$) em relação às salinidades 20 e 30, que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). A salinidade não afetou o tempo de assentamento dos indivíduos, pois todos iniciaram o processo de assentamento 23 dias após a eclosão e este processo foi concluído 30 dias após a eclosão em todas as salinidades. A sobrevivência e o crescimento de juvenis cultivados nas salinidades 0, 5, 10 e 30 foram estudados. A salinidade não afetou a sobrevivência dos juvenis ($P > 0,05$), entretanto o crescimento dos juvenis cultivados na salinidade 10 foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que os demais, enquanto que os cultivados em água doce apresentaram o menor crescimento ($P < 0,05$). Os resultados obtidos indicam que a dependência do linguado por salinidades elevadas é inversamente proporcional à sua idade, sendo necessária água oceânica (salinidade 35) para sua reprodução e água salobra (salinidade 20) para sua larvicultura, enquanto que seus alevinos podem até ser cultivados em água doce, sem prejuízo para sua sobrevivência, apesar do crescimento ser maior em água de salinidade 10.

ABSTRACT

The effects of salinity on artificial egg fertilization, and larval and juvenile rearing of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* were evaluated. Fertilization was directly proportional to salinity, with exception of eggs exposed to salinity 10, because in this case fertilization was not achieved. At salinities 15, 25, and 35 the fertilization rates were 15, 40, and 75% respectively. However, no larvae emerged from eggs fertilized at salinities 15 and 25 as they sank to the bottom, larvae hatched only in salinity 35. The resistance to freshwater was evaluated with larvae (6 and 16 days after hatching, d.a.h.) and juveniles (30, 45 and 60 d.a.h.). Early larvae (6 d.a.h.) did not survive in freshwater, but 93% of the older larvae (16 d.a.h.) survived an 96 h exposition to freshwater. No mortalities were observed for the juveniles, independent of their age. The effects of salinity (5, 10, 20 and 30) during the larviculture were studied. Larvae did not resist for 10 days at salinity 5, but survival increased proportionally with salinity. Growth was reduced at salinity 10 ($P < 0.05$) when compared to larvae reared at salinities 20 and 30, which were not significantly different ($P > 0.05$). Salinity had no effect on the time for settling, all larvae began to settle 23 d.a.h. and finished the settling process 30 d.a.h. in all salinities tested. Survival and growth of juvenile reared in salinities 0, 5, 10 and 30 were also studied. Salinity had no effect on juvenile survival ($P > 0.05$), but growth was hampered in freshwater. The highest growth rate was observed at salinity 10, which is close to the isosmotic point of the species, and growth of juvenile reared at salinity 5 and 30 were not significantly different ($P > 0.05$). The results obtained in these studies indicate that the Brazilian flounder rely on salt water (salinity 35) for reproduction, and thereafter the dependence on high salinities is inversely proportional to age. Larvae can be reared at salinity 20 with no harm on survival and growth. Juveniles can be cultured in freshwater without mortality, but their highest growth rate is achieved when they are reared at salinity 10.

INTRODUÇÃO

A aquicultura vem desempenhando um papel muito importante na produção de pescado, uma vez que nas últimas décadas a produção proveniente da pesca tem sofrido uma relativa estabilização. Atualmente, a taxa de crescimento desse setor de produção animal é de aproximadamente 10% ao ano, sendo que os organismos mais produzidos são os peixes de água doce (FAO, 2003).

No Brasil, a piscicultura marinha comercial é inexistente, sendo realizada apenas experimentalmente com algumas espécies como o peixe-rei *Odontesthes argentinensis* (Phonlor & Vinagre, 1989), o robalo *Centropomus parallelus* (Borquéz & Cerqueira, 1998), a tainha *Mugil platanus* (Sampaio *et al.*, 2001a), o pampo *Trachinotus marginatus* (Sampaio *et al.*, 2003) e o linguado *Paralichthys orbignyanus*, alvo de estudo no presente trabalho.

O linguado

A carne do linguado é bastante apreciada e apresenta um elevado valor de mercado (Figueiredo & Menezes, 2000). O linguado representa uma boa alternativa para a produção de peixes marinhos no Brasil, pois possui uma ampla faixa de tolerância frente a diferentes parâmetros ambientais importantes para a aquicultura como salinidade (Wasielesky *et al.*, 1995), produtos nitrogenados (Bianchini *et al.*, 1996), pH (Wasielesky *et al.*, 1997) e temperatura (Wasielesky *et al.*, 1998).

A distribuição de *P. orbignyanus* se estende desde o Rio de Janeiro no Brasil até Mar Del Plata na Argentina, sendo encontrado em zonas estuarinas e costeiras, em

profundidades até 20 ou 30 metros (Figueiredo & Menezes, 2000). Chao *et al* (1982) caracterizam *P. orbignyana* como uma espécie estuarino-dependente, sendo encontrada ao longo de todo o ano na porção estuarina da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente à desembocadura do estuário.

Os primeiros estudos sobre reprodução de *P. orbignyana* em cativeiro foram realizados por Cerqueira *et al.* (1997). Posteriormente, Robaldo (2003) avaliou o efeito de diferentes doses de HCG e LHRHa sobre a ovulação, fertilização e eclosão de *P. orbignyana* e determinaram que essa espécie é bastante sensível aos hormônios testados, sendo as doses de 250 UI de HCG kg⁻¹ ou 25µg de LHRHa kg⁻¹ eficazes.

Pisseti (2002) analisou o efeito da salinidade de ativação sobre a mobilidade dos espermatozoides de *P. orbignyana* mantidos em diferentes salinidades. A ativação dos espermatozoides se deu somente em salinidades superiores a 10, independente da salinidade em que os reprodutores foram aclimatados. Os indivíduos aclimatados à salinidade 30 apresentam espermatozoides com maior longevidade, mas aqueles mantidos em água doce ou salinidade 15 também podem ser utilizados como fonte de sêmen para a reprodução artificial.

Os efeitos da salinidade sobre juvenis (entre 3 e 150 g) foram estudados por Sampaio *et al.* (2001b) e Sampaio & Bianchini (2002). Nestes estudos foi verificado que a sobrevivência não é afetada pela salinidade, mas em salinidades baixas (entre 0 e 2) o crescimento é menor do que o dos linguados mantidos em água com salinidade equivalente ao seu ponto isosmótico (salinidade 11) ou em água do mar (salinidade 30).

Estudos sobre a produção de *P. orbignyana* vêm sendo conduzidos intensamente pelo grupo de pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), incluindo a produção de larvas e juvenis, patologia e genética.

A temperatura ideal para o desenvolvimento embrionário de *P. orbignyanus* situa-se entre 20 e 23°C, mas o crescimento das larvas é maximizado a 23°C (Okamoto, 2004). O fotoperíodo é importante para o desenvolvimento do linguado, pois as larvas morrem quando cultivadas no escuro e o melhor crescimento é observado quando elas são mantidas sob iluminação constante. Entretanto, os juvenis apresentam crescimento mais rápido ao serem cultivados com 18h de luz e 6h de escuro (Louzada, 2004).

As doenças são sempre uma ameaça ao cultivo de peixes e alguns parasitas do linguado foram estudados. Robaldo *et al.* (2002) estudaram o ciclo de desenvolvimento de *Caligus* sp., Velloso (2004) estudou a ocorrência de *Therodamas fluviatilis* em linguados capturados no oceano e no estuário e Abreu *et al.* (2005) descreveram métodos para evitar a mortalidade associada a infestação do protozoário *Amyloodinium ocellatus*.

As técnicas de biologia molecular vêm sendo cada vez mais utilizadas para aumentar a eficiência da produção animal. Méier (2005) sugere que o hormônio do crescimento tem um papel importante na osmorregulação de *P. orbignyanus* e após um choque hiperosmótico conseguiu isolar e sequenciar o cDNA deste hormônio. O conhecimento da estrutura do hormônio do crescimento pode permitir o desenvolvimento de estudos de modificação genética, na busca por indivíduos com maior taxa de crescimento.

A salinidade

A salinidade é considerada um parâmetro importante na produção de alevinos de peixes marinhos, sendo necessária a compreensão dos seus efeitos sobre a sobrevivência

e o crescimento de larvas e juvenis, com a finalidade de maximizar a sua produção em laboratório (Hart *et al.*, 1996).

Ao avaliarem a estrutura ovárica em *P. orbignyana*, Silveira *et al.* (1995) não encontraram fêmeas maduras no estuário da Lagoa dos Patos. Esse resultado, associado ao obtido por Muelbert & Weiss (1991), sugere que os ovos e as larvas dessa espécie sejam dependentes do ambiente marinho. O mesmo acontece com outras espécies, como é o caso *Chanos chanos* (Swanson, 1996), cujas larvas crescem mais em salinidades iguais ou superiores à da água do mar. Por outro lado, a larvicultura de *Sparus aurata* (Tandler *et al.*, 1995) e *Rhombosolea tapirina* (Hart & Purser, 1995) pode ser realizada tanto em água salobra quanto em água salgada, demonstrando a eurialinidade dos indivíduos mais jovens. No caso de *Acanthopagrus butcheri*, larvas e juvenis também podem ser cultivados tanto em água salobra quanto em água do mar, sem prejuízo para a sobrevivência (Haddy & Pankurst, 2000; Partridge & Jenkins, 2002).

Para os linguados em geral, a salinidade limita a distribuição dos exemplares no ambiente, sendo que esse efeito varia conforme o estágio de desenvolvimento que o indivíduo se encontra (Schreiber, 2001). No caso de *Paralichthys lethostigma*, as larvas estão mais adaptadas à água do mar do que a águas salobras (Moustakas *et al.*, 2004), enquanto que os juvenis apresentam uma resistência à baixas salinidades, que aumenta proporcionalmente com a sua idade (Smith *et al.*, 1999). Já o linguado *Paralichthys californicus*, responde de forma oposta a *P. lethostigma*, visto que os juvenis menores são mais resistentes à variações de salinidade do que os juvenis mais desenvolvidos, demonstrando que os indivíduos mais jovens estão mais aptos a explorar estuários e lagoas costeiras, enquanto que os mais velhos estão melhor ajustados à condição marinha (Madon, 2002).

Os efeitos da salinidade sobre *P. orbignyana* durante as diferentes etapas de sua produção são poucos conhecidos. Desta forma, o presente trabalho foi realizado com a intenção de fornecer informações que maximizem a produção de larvas e juvenis do linguado por meio do manejo da salinidade, visando seu cultivo em áreas estuarinas e lacustres.

OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos de diferentes salinidades sobre ovos, larvas e juvenis do linguado *P. orbignyanus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da salinidade sobre a fertilização artificial do linguado.
- Estudar a influência da idade de larvas e juvenis do linguado sobre a sua resistência à água doce.
- Verificar a sobrevivência e o crescimento de larvas do linguado cultivadas em diferentes salinidades.
- Determinar o tempo de assentamento de larvas cultivadas em diferentes salinidades.
- Analisar o efeito de baixas salinidades na sobrevivência e o crescimento de juvenis do linguado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Salinidades Experimentais

A preparação das salinidades testadas foi feita misturando-se água do mar (salinidade 35) filtrada ($5\mu\text{m}$) e água doce da rede pública de abastecimento (salinidade 0). Para eliminar o efeito tóxico do cloro, foi adicionado tiosulfato de sódio à água doce tratada numa concentração de 70 mg L^{-1} . A água preparada nas respectivas salinidades foi estocada em reservatórios de 100 L (um reservatório por tratamento). A salinidade foi medida por meio de um refratômetro com precisão de ± 1 de salinidade.

Experimento 1: Efeitos da salinidade sobre a fertilização artificial

Reprodutores de linguado foram capturados na praia do Cassino (Rio Grande - RS) junto à zona de arrebentação e transferidos para o laboratório. Para a identificação do sexo os linguados foram anestesiados com benzocaína (50ppm) e foi realizada uma massagem abdominal para a extrusão do sêmen. No caso dos indivíduos que não liberaram sêmen foi feita uma biopsia intragonadal com o auxílio de uma seringa e agulha hipodérmica 16G na busca de folículos ovarianos. Os linguados cujo sexo não foi identificado foram descartados, assim como as fêmeas que apresentaram folículos com diâmetro inferior a $300\mu\text{m}$ (Robaldo, 2003).

A ovulação foi induzida por meio de uma aplicação de extrato de hipófise de carpa (3 mg Kg^{-1}) macerado em solução de cloreto de sódio a 0,9%. As fêmeas induzidas foram mantidas em tanques (200 L) contendo água da mesma salinidade em

que foram coletadas (34 e 35 de salinidade). A temperatura da água foi mantida em 23°C e as fêmeas foram submetidas a uma baixa intensidade luminosa (5 lux) até que fosse realizada a extrusão manual dos óvulos (de 24 a 36 h após a indução hormonal).

A fertilização artificial foi realizada a seco, sendo que o abdômen dos reprodutores foi massageado para que ocorresse a liberação de óvulos ou espermatozóides.

Para avaliar os efeitos da salinidade sobre a fertilização dos óvulos de *P. orbignyanus* foram testadas quatro salinidades: 10, 15, 25 e 35. Foram realizadas quatro desovas com fêmeas diferentes, sendo cada uma considerada como uma repetição.

Após a extrusão dos óvulos, amostras de 2 mL foram transferidas para quatro recipientes plásticos vazios (120 mL). Para a fertilização foi utilizado sêmen de três machos, sendo feito um 'pool' de modo que, para cada fêmea, fosse utilizado o mesmo grupo de sêmen em todas as salinidades. Os espermatozóides foram ativados com água nas salinidades 10, 15, 25 e 35 e imediatamente adicionados aos óvulos, após 10 min a água foi trocada para se eliminar restos de sêmen e fluído ovariano.

Avaliações preliminares mostraram que os ovos de linguado possuem flutuabilidade negativa em água de salinidade igual ou abaixo de 25. Levando isso em consideração, o percentual de ovos flutuantes não pôde ser estimado como um índice de fertilização, optando-se por fazer uma comparação entre o percentual de ovos que apresentassem segmentação 1 h após a adição do sêmen sobre os óvulos (Robaldo, 2003). Para isso, os ovos foram suavemente homogeneizados e uma amostra de aproximadamente 100 ovos de cada tratamento foi transferida para lâminas escavadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. O número total de ovos segmentados (N_{seg}) e o número total de ovos em cada amostra (N_T) das diferentes salinidades foram contados sob microscópio equipado com objetiva micrométrica. O percentual de fertilização (PF)

foi calculado como a razão entre N_{seg} e N_T , segundo a fórmula $PF\% = 100 \cdot N_{seg} \cdot N_T^{-1}$.

Em seguida, os ovos segmentados em cada salinidade foram distribuídos em quatro tubos de ensaio (75 mL) desprovidos de aeração e preenchidos com água nas respectivas salinidades, onde foram mantidos até o momento da eclosão para avaliação dos efeitos da salinidade sobre o tempo de eclosão, o percentual de eclosão e a proporção de larvas normais e larvas deformadas (notocorda torta).

Após a eclosão, foi realizada a biometria das larvas ($n = 30$ por salinidade), sendo medidos o comprimento da notocorda e a altura (a) e o comprimento (c) do saco vitelínico. O volume do saco vitelínico (V) foi calculado pela forma de uma elipsóide, conforme sugerido por Blaxter & Hempel (1963), ou seja, $V = 1/6 \cdot \pi \cdot c \cdot a^2$.

Experimento 2: Sobrevivência de larvas e juvenis de diferentes idades em água doce

A avaliação da sobrevivência de larvas e juvenis do linguado em água doce foi feita após redução gradativa da salinidade durante 78 h e subsequente exposição à água doce, durante 96 h (Figura 1).

As larvas utilizadas nesse experimento foram cultivadas até o assentamento em tanques cilindro-cônicos com volume útil de 40 L, utilizando-se o sistema de 'água-verde' com a microalga *Nannochloropsis oculata*. A salinidade e a temperatura durante a larvicultura foram mantidas em 34 e 23°C, respectivamente. Durante o período de primeira alimentação, utilizou-se o rotífero *Brachionus plicatilis*. Na passagem da primeira para a segunda alimentação (12 d.a.e. – dias após a eclosão), os rotíferos foram substituídos gradativamente por náuplios recém eclodidos de *Artemia* até que as larvas fossem capazes de se alimentar exclusivamente dessa nova presa (20 d.a.e.). Durante a

larvicultura, a renovação diária da água dos tanques foi de 90 %. Após o assentamento, os indivíduos foram transferidos para tanques cilíndricos de fundo plano branco e paredes pretas, com volume útil de 50 L. Nessa nova etapa, somente *Artemia* foi oferecida aos juvenis. A partir de 30 d.a.e., além dos náuplios de *Artemia*, a alimentação dos juvenis foi complementada com camarão picado. Após a alimentação, os tanques eram sifonados e os meios renovados em 80%. Durante essa fase do cultivo, a salinidade e a temperatura da água foram mantidas em, respectivamente, 34 e 23°C. As larvas e juvenis foram mantidos sob essas condições até a realização dos experimentos.

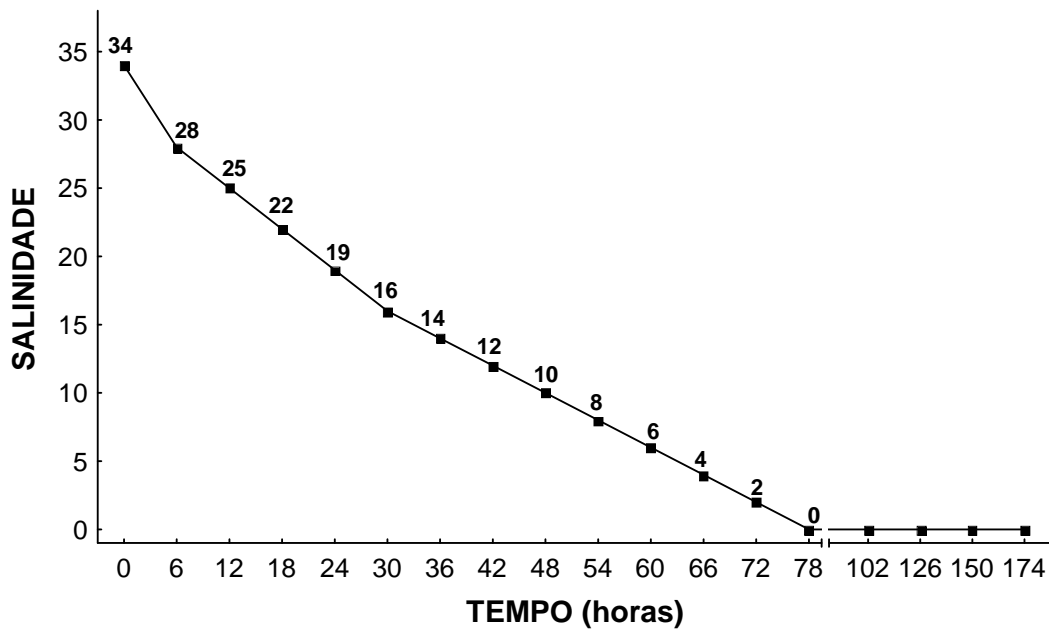


Figura 1. Redução gradativa de salinidade e exposição de larvas e juvenis de *Paralichthys orbignyanus* durante 174 h de experimento.

Foram testadas larvas com 6 (L6) e 16 dias de idade (L16), e juvenis com 30 (J30), 45 (J45) e 60 dias (J60) de idade (Tabela 1). As larvas foram mantidas em béqueres com 900 mL de água e os juvenis em béqueres com 2000 mL, sendo fornecida

aeração por meio de pedras difusoras. Para cada idade foram montadas três repetições e três controles: nos testes com larvas 15 indivíduos foram colocados em cada béquer e nos testes com juvenis foram colocados cinco indivíduos em cada béquer. Todos os béqueres foram mantidos a 23°C em banho termostatizado. Para o controle, os linguados foram mantidos nas salinidades de cultivo e submetidos às mesmas trocas de água realizadas para os animais tratados, só que sem a redução de salinidade.

Tabela 1. Comprimento (média \pm erro padrão) dos grupos de larvas e juvenis de *Paralichthys orbignyanus* submetidos à redução gradativa de salinidade e exposição à água doce.

Grupo	Idade (dias)	Fase	Comprimento (mm)
L6	6	larva	3,44 \pm 0,40 ¹
L16	16	larva	6,07 \pm 0,22 ¹
J30	30	juvenil	11,01 \pm 0,14 ²
J45	45	juvenil	19,80 \pm 0,86 ²
J60	60	juvenil	43,20 \pm 2,52 ²

1 – comprimento padrão

2 – comprimento total

Inicialmente, cada béquer foi preenchido com ¼ de seu volume com água na salinidade 34. A redução da salinidade foi realizada adicionando-se água doce nas unidades experimentais e ao completar o volume do béquer a água foi retirada, sendo repostada novamente com ¼ do volume com água na próxima salinidade. Durante a manutenção dos exemplares em água doce, a água foi trocada a cada 24 h. Num primeiro momento, a salinidade da água foi reduzida de 34 para 28 e durante as 24 h seguintes, a salinidade foi reduzida em 3 unidades em intervalos de 6 horas. Posteriormente, a redução de salinidade foi de 2 unidades a cada 6 horas, até a

salinidade atingir 0 no tempo 78 h. Durante o experimento, a salinidade foi verificada em cada tanque após cada redução salinidade.

A mortalidade foi registrada a cada 6 horas, antes da nova redução de salinidade. Ao atingir a água doce, a mortalidade foi observada a cada 24 h.

Como alimento, foi oferecido rotífero para o grupo L6, rotífero e náuplios de *Artemia* para o grupo L16, náuplios de *Artemia* para o grupo J30 e camarão picado para os grupos J45 e J60. Os náuplios de *Artemia* e os rotíferos foram lavados com água na salinidade em que os linguados se encontravam em filtros com malha de 210 e 22 μm , respectivamente. Esse procedimento foi repetido a cada redução de salinidade para se evitar a morte dos náuplios e a redução da qualidade nutricional dos rotíferos, uma vez que a técnica de ‘água-verde’ não pôde ser utilizada devido às baixas salinidades utilizadas.

Com a finalidade de se eliminar resíduos, os tanques foram sifonados a cada 6 h durante a etapa de redução de salinidade e a cada 24 h quando a salinidade 0 foi atingida.

Experimento 3: Efeitos da salinidade na sobrevivência e crescimento de larvas

As larvas utilizadas neste experimento foram obtidas por meio de fertilização artificial e cultivadas conforme os procedimentos descritos no experimento 2. No terceiro d.a.e., 6.000 larvas ($2,8 \pm 0,02$ mm; média \pm erro padrão, $n = 30$) foram transferidas de um tanque de cultivo para 12 tanques cilíndricos de fundo plano branco e paredes pretas com 10 L de água, resultando numa densidade de estocagem de 50 larvas L^{-1} . Durante o experimento, foram testadas 4 salinidades: 5, 10, 20 e 30. Todos os

tratamentos foram realizados com três repetições.

A temperatura, a salinidade da água e o número de larvas mortas foram registrados diariamente. Após a retirada das larvas mortas, os tanques foram sifonados para que os resíduos depositados no fundo fossem eliminados e 50% da água foi renovada. A água dos tanques foi constantemente aerada.

Durante os primeiros 17 dias, as larvas foram alimentadas com o rotífero *B. plicatilis*, numa densidade aproximada de 20 rotíferos mL⁻¹, utilizando-se a técnica de ‘água-verde’ com a adição da microalga *Tetraselmis tetrathele* (5.10⁴ céls mL⁻¹). A partir do 18º dias também foram oferecidos náuplios de *Artemia*, a densidade de náuplios aumentou de 2 para 10 mL⁻¹ ao final do experimento.

O comprimento total das larvas (n = 10) foi acompanhado por meio de biometrias a cada 5 dias até o 15º dia de experimento (18 d.a.e.). Após isso, as larvas de cada salinidade foram agrupadas e mantidas por mais 14 dias (32 d.a.e.) nas salinidades testadas. Durante esse período, foi acompanhada a proporção diária de indivíduos assentados nas diferentes salinidades. A proporção de assentamento (PA) foi estimada como a razão entre o número de larvas assentadas (N_A) e o número total de indivíduos (N_T) presentes no tanque no momento da observação, sendo calculado pela fórmula $PA\% = 100 \cdot N_A \cdot N_T^{-1}$.

Experimento 4: Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado cultivados em baixas salinidades

Para avaliar os efeitos da salinidade sobre a sobrevivência e o crescimento dos juvenis do linguado foram utilizados 560 juvenis (45 d.a.e., 18,8 ± 0,4 mm e 82,6 ± 5,1

mg; média \pm erro padrão, n = 50), obtidos por meio de fertilização artificial e cultivados conforme os procedimentos descritos no experimento 2.

Os juvenis foram transferidos aleatoriamente para 16 tanques de fundo plano e parede preta com volume útil de 50L em um número inicial de 35 juvenis tanque⁻¹. O experimento teve duração de 42 dias e foram testadas quatro salinidades: 0, 5, 10 e 30. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições.

Durante o experimento, a salinidade e a temperatura foram verificadas diariamente pela manhã. Os juvenis mortos foram registrados e retirados imediatamente.

A alimentação dos juvenis consistiu de camarão picado complementado com náuplios recém-eclodidos de *Artemia* até o 14º dia de experimento (59 d.a.e.). A partir daí, somente o camarão picado foi oferecido. A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, uma no início da manhã e outra no início da tarde. Entre 30 e 60 min após a alimentação, a água dos tanques foi renovada em 80%, resultando numa taxa de renovação de 160% dia⁻¹. A água foi constantemente aerada através de pedras difusoras.

O comprimento total e o peso úmido dos juvenis de cada tanque (n = 35) foram acompanhados por meio de biometrias semanais. A partir dos dados de peso (P) e de comprimento (C), foi estimada a taxa de crescimento específico diário (TCE), determinando-se a diferença entre o peso final (P_f) e o peso inicial (P_i) dos exemplares (mm) em função do tempo de experimento em dias (t). Para isso, utilizou-se a fórmula $TCE = 100 \cdot t^{-1} \cdot (\ln P_f - \ln P_i)$ (Ricker, 1979).

Biometrias e análise dos dados

No procedimento de biometria das larvas, foi utilizado o anestésico MS-222 (50

ppm). O comprimento da notocorda e dimensões do saco vitelínico foram medidos com o auxílio de um microscópio estereoscópico com objetiva micrométrica, exceto no experimento 3. Nesse experimento a biometria foi realizada com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio para capturar imagens. As imagens capturadas foram transferidas para um microcomputador com o programa 'Pro Media'. As biometrias foram realizadas por meio do programa 'Image Tool'.

Para a biometria dos juvenis, utilizou-se como anestésico a benzocaína numa concentração de 50 ppm (Sampaio *et al.*, 1998). Foi medido o comprimento total dos indivíduos também com o auxílio de um microscópio estereoscópico equipado com objetiva micrométrica. O peso dos juvenis foi obtido utilizando-se uma balança analítica.

Ao final das biometrias, larvas e juvenis foram devolvidos aos seus respectivos tanques.

A homocedasticidade dos dados obtidos foi analisada com o Teste de Levene e a normalidade com o Teste Kolmogorov Smirnov. Em seguida, os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) ao nível de 95% de significância. Ao serem encontradas diferenças significativas nos experimentos 1, 3 e 4, foi aplicado o Teste '*a posteriori*' de Tukey para que as diferenças entre os tratamentos fossem identificadas. Os dados expressos em percentagem foram previamente transformados para o arcoseno para poderem ser analisados. Todos os dados obtidos estão apresentados na forma de média e erro padrão (média \pm erro padrão).

RESULTADOS

Experimento 1: Efeitos da salinidade sobre a fertilização artificial

Os ovos fertilizados do linguado flutuaram apenas na salinidade 35, enquanto nas salinidades mais baixas, tanto os ovos fertilizados quanto os não fertilizados sedimentaram. Ovos com segmentação foram observados apenas em salinidades iguais ou superiores a 15. O percentual de segmentação na salinidade 35 foi de $74,9 \pm 9,3\%$, sendo considerado significativamente maior ($P < 0,05$) que aquele observado na salinidade 15 ($14,5 \pm 5,0\%$). Entretanto, não foi detectada diferença significativa ($P > 0,05$) entre o percentual de ovos segmentados na salinidade 25 ($40,1 \pm 12,0\%$) e aqueles obtidos nas demais salinidades (Figura 2).

Durante o desenvolvimento embrionário, houve a mortalidade total dos embriões incubados nas salinidades 15 e 25, sendo verificada apenas a eclosão de larvas na salinidade 35. Nesse grupo, a taxa de eclosão foi de $55,6 \pm 2,4\%$, sendo que tempo de eclosão se estendeu de 32 à 37 h. O comprimento das larvas ao eclodir foi de $1,65 \pm 0,07$ mm. O volume do vitelo foi de $0,19 \pm 0,07$ mm³ e o percentual de larvas com má formação foi de $10,0 \pm 2,1\%$.

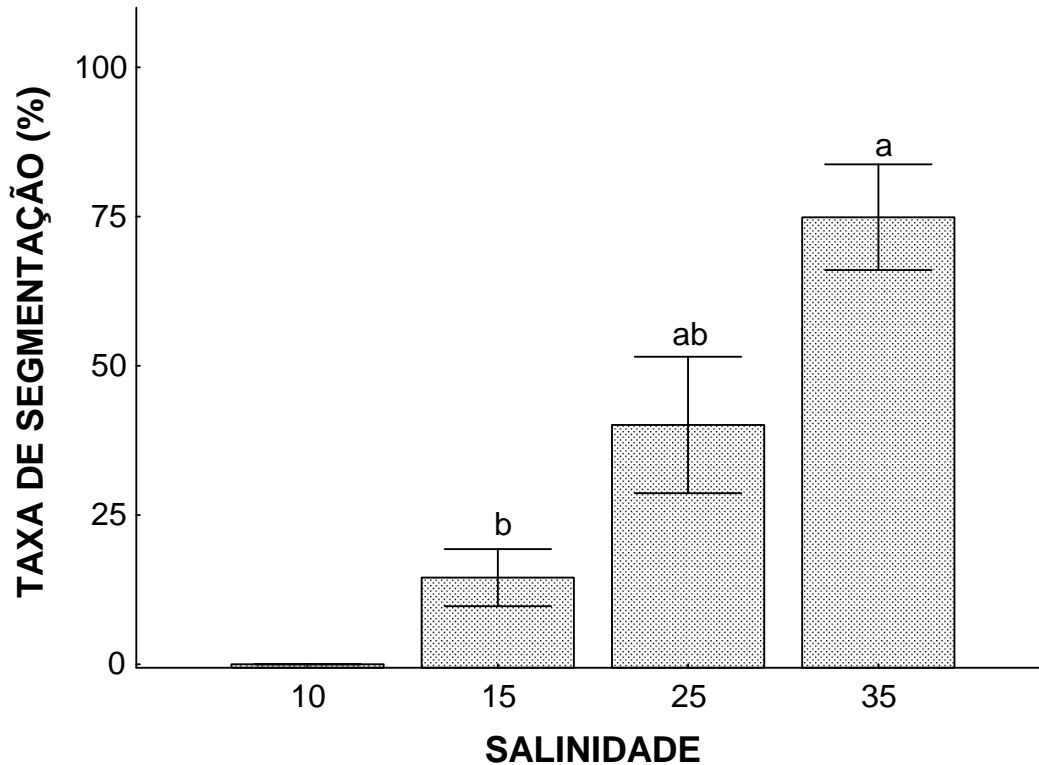


Figura 2. Efeito da salinidade sobre o percentual médio de segmentação (\pm erro padrão, $n = 4$) do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Não foram observados óvulos fertilizados na salinidade 10. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Experimento 2: Sobrevivência de larvas e juvenis de diferentes idades em água doce

Independentemente da idade, não foi verificada mortalidade de larvas e juvenis durante as primeiras 42 h de experimento, quando a salinidade havia sido reduzida de 34 para 12. Quando a salinidade chegou a 8 (tempo 54 h), foram observados os primeiros indivíduos mortos no grupo L6, tendo a sobrevivência desse grupo atingido $80,0 \pm 7,7\%$ após 60 h de experimento. Até esse momento, nenhum indivíduo de outras idades havia morrido. Seis horas mais tarde, quando a salinidade chegou a 4, a

sobrevivência do grupo L6 foi reduzida para $46,7 \pm 10,2\%$, sendo que esses indivíduos já apresentavam dificuldade de natação, permanecendo junto ao fundo praticamente moribundos. Quando a salinidade chegou a 0 (tempo 78 h), todas as larvas do grupo L6 estavam mortas, mas nenhum linguado dos demais grupos de idade havia morrido.

Durante a etapa de exposição à água doce, somente foram observados indivíduos mortos no grupo L16. Após 96 h de manutenção em água doce, a sobrevivência dos indivíduos do grupo L16 foi de $93,3 \pm 3,8\%$, enquanto a sobrevivência dos juvenis foi de 100% ao longo do experimento.

Nos grupos controle, somente foram observados indivíduos mortos no grupo L6. A sobrevivência ao final do período de redução de salinidade (78h) foi de $23,4 \pm 7,9\%$, tendo sido reduzida para $20,3 \pm 6,6\%$ ao final do experimento.

Experimento 3: Efeitos da salinidade na sobrevivência e crescimento de larvas

A sobrevivência das larvas foi significativamente afetada pela salinidade ($P < 0,05$), tendo sido observada uma relação diretamente proporcional entre a sobrevivência e a salinidade.

Aos cinco dias de experimento (8 d.a.e.), foi observada uma elevada mortalidade em todas as salinidades, tendo a sobrevivência oscilado entre 9 e 28% entre as salinidades 5 e 30. Entretanto, passado mais um dia, todas as larvas cultivadas na salinidade 5 haviam morrido. A partir dessa idade, a sobrevivência se estabilizou principalmente nas salinidades mais elevadas. Ao final do experimento, a sobrevivência das larvas mantidas na salinidade 10 ($5,3 \pm 4,3\%$) foi significativamente ($P < 0,05$) mais baixa do que aquela registrada na salinidade 30 ($19,7 \pm 5,4\%$). Contudo, a sobrevivência

final na salinidade 20 ($13,7 \pm 4,7\%$) foi semelhante ($P>0,05$) àquelas registradas nas salinidades 10 e 30 (Figura 3).

O comprimento das larvas foi afetado pela salinidade ($P<0,05$). A partir de 13 d.a.e., foi detectado um menor comprimento ($P<0,05$) das larvas submetidas à salinidade 10 em relação às larvas mantidas nas salinidades 20 e 30, não havendo diferenças significativas entre essas últimas ($P>0,05$). Esse resultado permaneceu até o final da avaliação do crescimento (18 d.a.e.), quando as larvas alcançaram $5,7 \pm 0,1$ mm (salinidade 10), $6,5 \pm 0,1$ mm (salinidade 20) e $6,6 \pm 0,1$ mm (salinidade 30) (Figura 4).

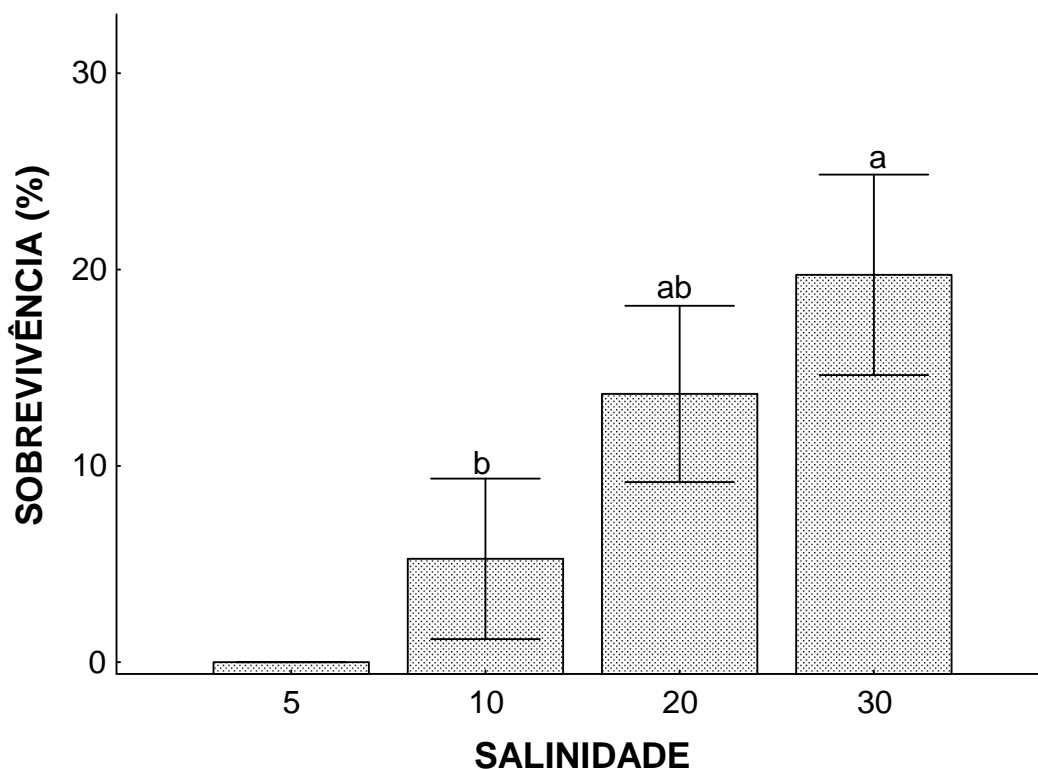


Figura 3. Sobrevivência (média \pm erro padrão; $n = 3$ em cada salinidade) de larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivadas por 15 dias em diferentes salinidades. Não houve sobreviventes na salinidade 5 ao final do experimento. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as salinidades ($P<0,05$).

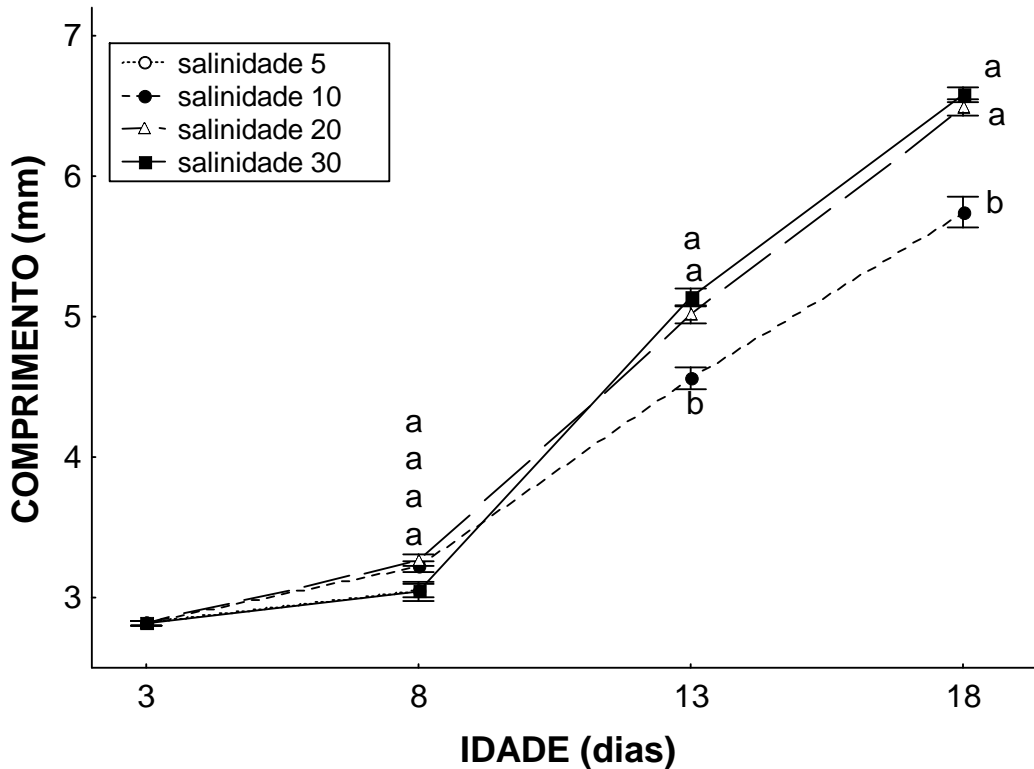


Figura 4. Comprimento (média \pm erro padrão; $n = 30$ em cada salinidade para cada idade) de larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivadas por 15 dias em diferentes salinidades. Letras diferentes em uma mesma idade representam diferenças significativas entre as salinidades ($P < 0,05$).

O tempo de assentamento foi semelhante para todos os tratamentos. Em todas as salinidades onde houve sobrevivência das larvas (salinidade 10, 20 e 30), o processo de migração dos olhos teve início 20 d.a.e. Depois de 3 dias (23 d.a.e.), foram observados os primeiros indivíduos assentados em todas as salinidades, mas o percentual de assentamento foi diretamente proporcional à salinidade, sendo igual a 17, 46 e 54% nas salinidades 10, 20 e 30, respectivamente. O assentamento de 100% dos indivíduos nas três salinidades ocorreu 30 d.a.e. (Figura 5). Após o assentamento, foi observado que os indivíduos atingiram o comprimento de $11,2 \pm 0,6$ mm, $12,8 \pm 0,5$ mm e $12,2 \pm 1,2$ mm

nas salinidades 10, 20 e 30, respectivamente.

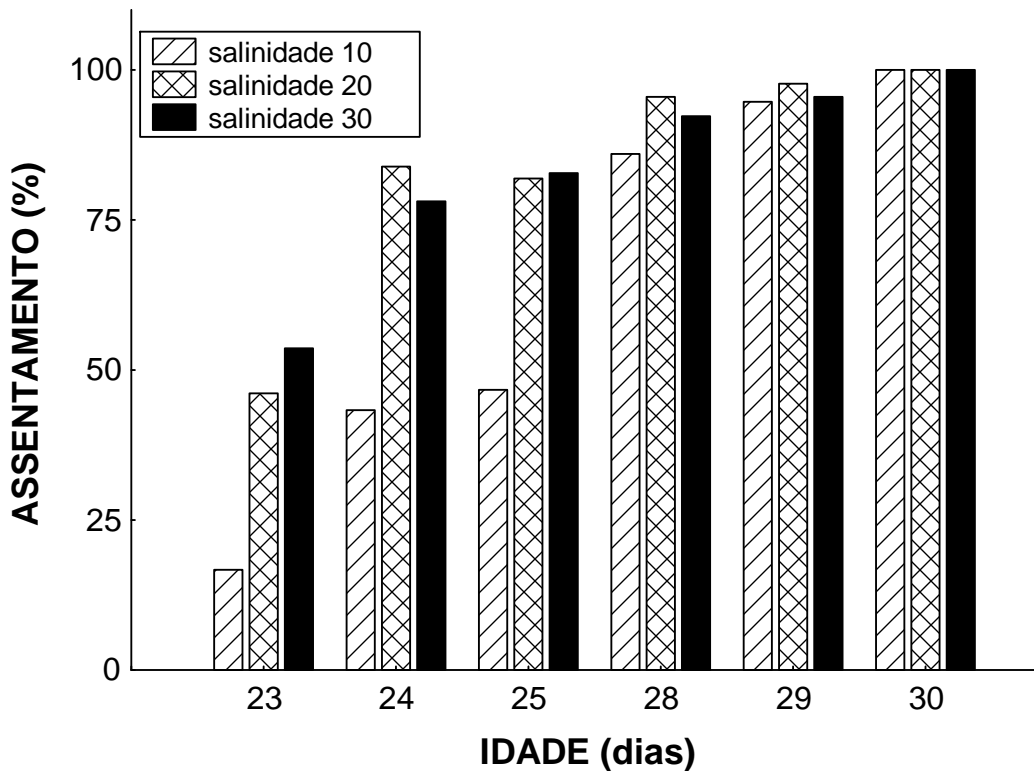


Figura 5. Efeito da salinidade sobre o tempo de assentamento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*.

Experimento 4: Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado cultivados em baixas salinidades

A sobrevivência dos juvenis não foi afetada significativamente pela salinidade ($P > 0,05$), variando entre $98,6 \pm 0,8\%$ na salinidade 5 e $92,8 \pm 4,3\%$ na salinidade 0 ao final do experimento (Figura 6). No 37º dia de experimento (82 d.a.e.) foi observada a presença de um patógeno nos linguados mantidos em água doce, o que causou a

mortalidade total dos indivíduos de uma das repetições e reduziu em 50% a sobrevivência em outra repetição. Entretanto, não foi possível identificar o grupo patogênico responsável pela mortalidade. Essas mortalidades foram excluídas da análise estatística, porque não foram provocadas pela salinidade.

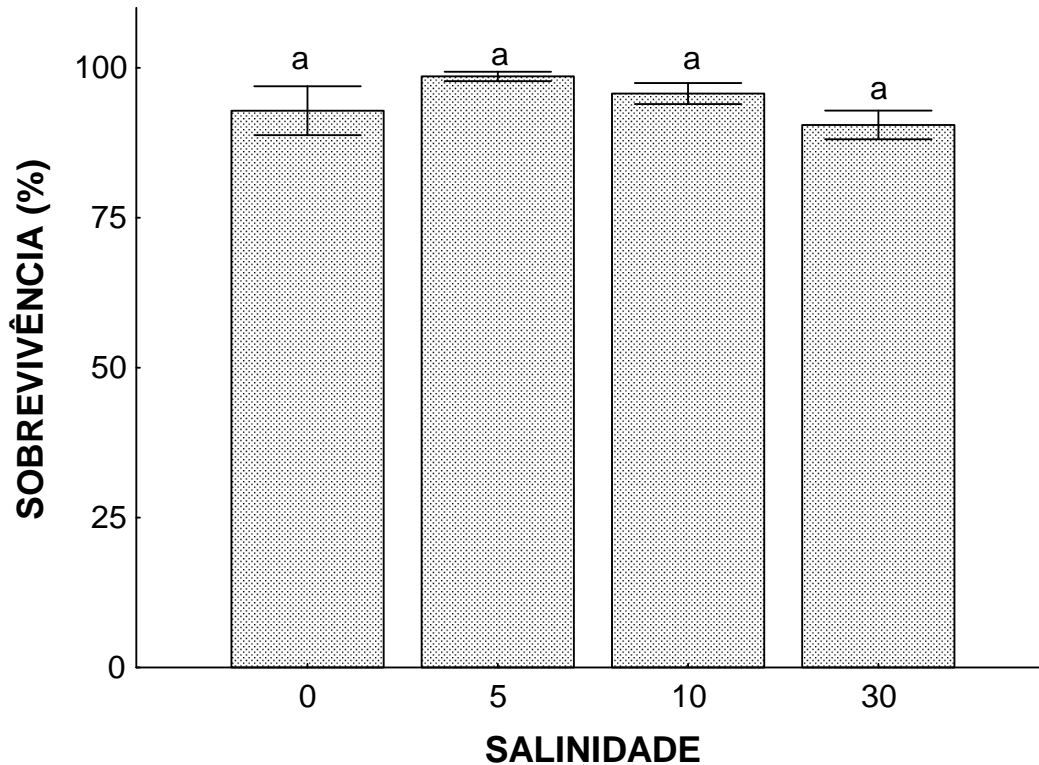


Figura 6. Sobrevivência (média \pm erro padrão; $n = 2$ para salinidade 0 e $n = 4$ para as demais salinidades) de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* após 42 dias de cultivo em diferentes salinidades. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as salinidades ($P < 0,05$).

Trinta e cinco dias após o início do experimento (80 d.a.e.), a média do comprimento total dos juvenis mantidos em água doce já era significativamente menor do que aquelas registradas nas demais salinidades ($P < 0,05$). Além disso, os juvenis

cultivados na salinidade 30 também já eram significativamente menores do que os indivíduos mantidos na salinidade 10 ($P < 0,05$). Ao final do experimento (87 d.a.e.), os juvenis mantidos na salinidade 10 atingiram um comprimento de $41,6 \pm 0,5$ mm, sendo significativamente maior do que aqueles obtidos nas demais salinidades ($P < 0,05$). O crescimento foi semelhante nas salinidades 5 e 30 ($P > 0,05$), mas significativamente maior do que aquele observado em água doce ($P < 0,05$) (Figura 7).

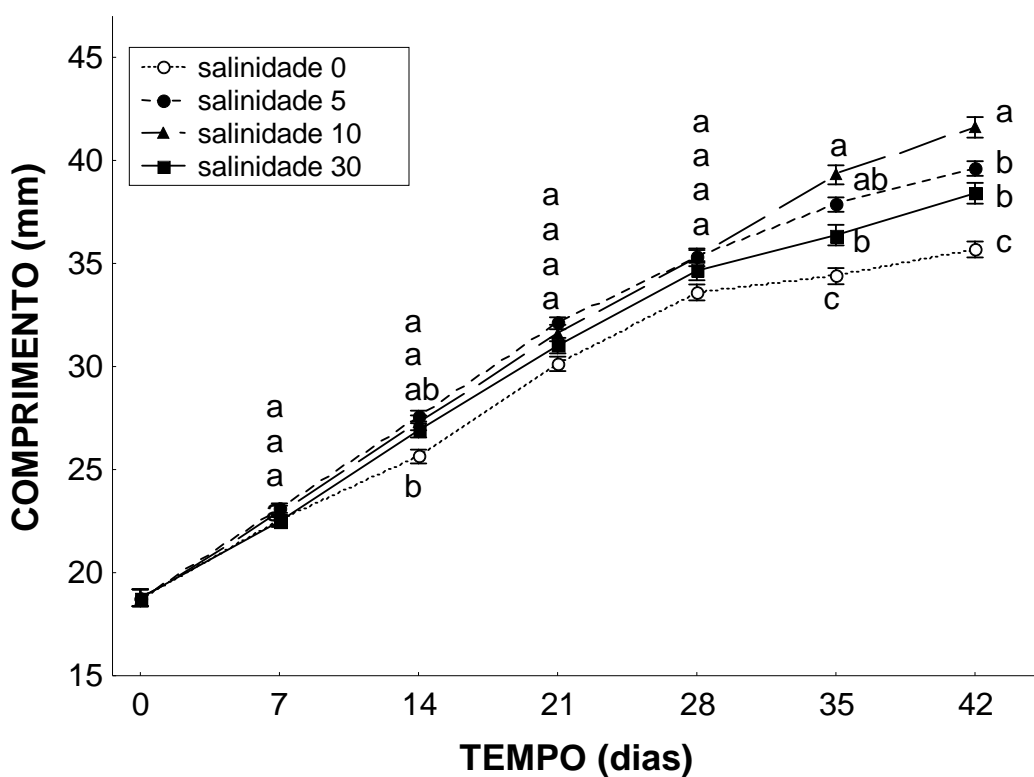


Figura 7. Comprimento (média \pm erro padrão; $n = 60$ para salinidade 0 e $n = 120$ para as demais salinidades) de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyana* cultivados por 42 dias em diferentes salinidades. Letras diferentes em um mesmo dia representam diferenças significativas entre as salinidades ($P < 0,05$).

O mesmo padrão de crescimento foi observado para o peso úmido. Ao final do experimento, juvenis significativamente mais leves ($P<0,05$) foram obtidos na salinidade 0, atingindo $526,4 \pm 17,9$ mg. Por outro lado, um maior peso foi detectado para os juvenis mantidos na salinidade 10 ($P<0,05$), alcançando $861,9 \pm 29,0$ mg. Os juvenis cultivados nas salinidades 5 e 30 também atingiram valores intermediários de peso ($742,3 \pm 20,8$ mg e $682,6 \pm 27,0$ mg, respectivamente), sendo considerados menores ($P<0,05$) que aqueles juvenis cultivados em salinidade 10 e maiores ($P<0,05$) aquele dos cultivados em salinidade 0 (Figura 8).

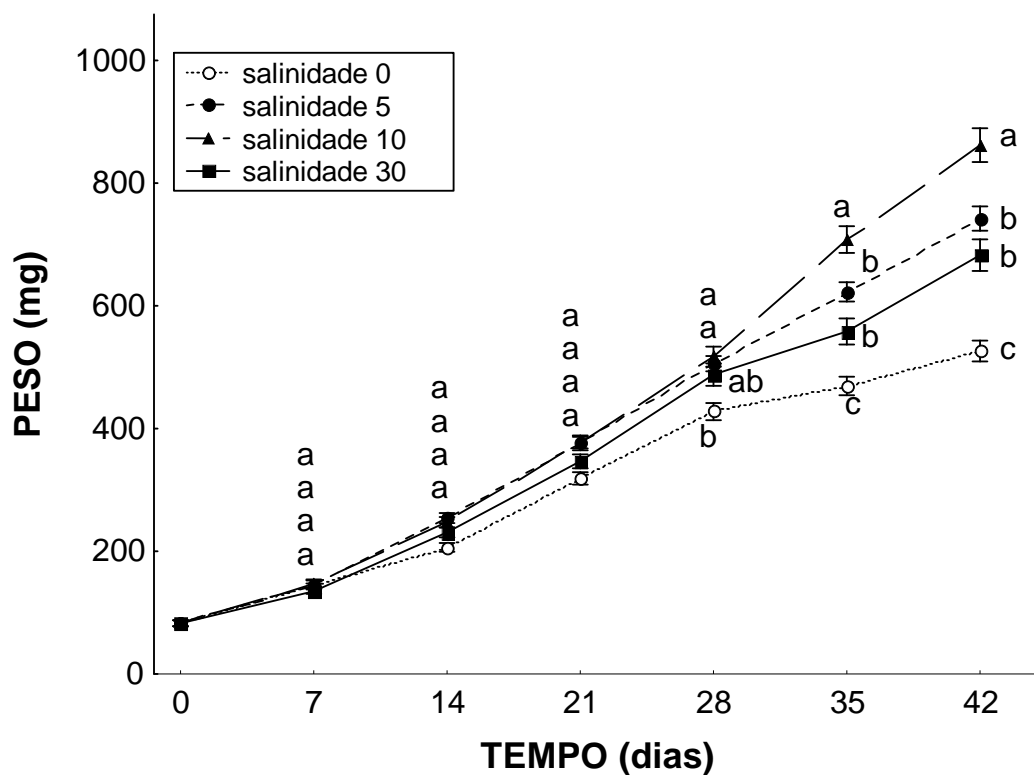


Figura 8. Peso úmido (média \pm erro padrão; $n = 60$ para salinidade 0 e $n = 120$ para as demais salinidades) de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivados por 42 dias em diferentes salinidades. Letras diferentes em um mesmo dia representam diferenças significativas entre as salinidades ($P<0,05$).

Os juvenis mantidos na salinidade 10 também tiveram uma taxa de crescimento específico (TCE) significativamente maior ($P < 0,05$) em relação aos juvenis submetidos às demais salinidades. No entanto, uma TCE significativamente mais baixa ($P < 0,05$) foi detectada para os juvenis mantidos em água doce, sendo de $4,41 \pm 0,03\%$. A TCE dos juvenis cultivados nas salinidades 5 e 30 foram semelhantes entre si e respectivamente iguais a $5,23 \pm 0,03\%$ e $5,02 \pm 0,15\%$ ($P > 0,05$) (Figura 9).

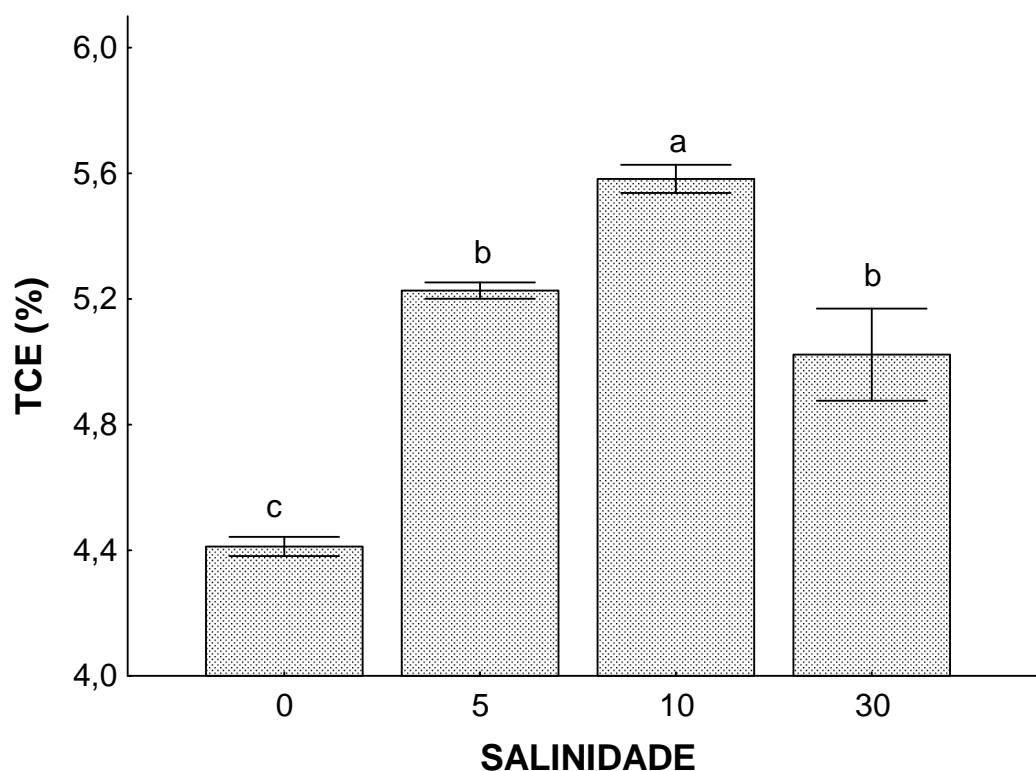


Figura 9. Taxa de crescimento específico diário (TCE) (média \pm erro padrão; $n = 2$ para salinidade 0 e $n = 4$ para as demais salinidades) de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivados por 42 dias em diferentes salinidades. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as salinidades ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os efeitos da salinidade sobre a reprodução, incubação, produção de larvas e juvenis de *P. orbignyanus* são dependentes da idade e/ou estágio de desenvolvimento, tendo sido observada uma maior tolerância a baixas salinidades com o aumento da idade e com a transformação das larvas em juvenis.

Foi verificado neste estudo que os óvulos de *P. orbignyanus* não foram fertilizados na salinidade 10. Nas salinidades mais elevadas testadas neste trabalho o percentual de fertilização foi inversamente proporcional à salinidade, pois apenas 15% dos óvulos foram fertilizados na salinidade 15, contra 75% na salinidade 35. Esse resultado se assemelha aos encontrados para *Gadus morhua*, *Odontesthes argentinensis* e *R. tapirina* (Westing & Nissling, 1991; Sampaio, 1992; Hart & Purser, 1995), onde o percentual de óvulos fertilizados também diminui a medida que a salinidade é reduzida.

Quando o sêmen de *P. orbignyanus* é exposto à salinidade 10 ou menor, os espermatozóides não são ativados e, portanto não teriam capacidade de fertilizar os óvulos. Em salinidades mais altas (15 a 35) o tempo de ativação é similar, o que sugere uma capacidade semelhante de fertilização (Pisseti, 2002). Os resultados do presente estudo estão de acordo com este fato, pois na salinidade 10 os óvulos não foram fertilizados e a partir da salinidade 15 sempre foram observados óvulos fertilizados, mesmo que tenha sido observada uma relação diretamente proporcional entre a salinidade e o percentual de fertilização.

Bush & Weis (1983) verificaram o fechamento da micrópila dos óvulos de *Fundulus heteroclitus*, quando submetidos a um estresse osmótico no momento da fertilização, impedindo assim a penetração do espermatozóide no óvulo. As fêmeas de

P. orbignyanus utilizadas neste trabalho foram capturadas no mar (salinidade 35) e mantidas no laboratório nesta mesma condição salina por até 36 h. A exposição dos óvulos às salinidades 10, 15 e 25 pode ter causado um choque hipo-osmótico, que resultou nos baixos percentuais de fertilização obtidos nas salinidades 15 e 25. Com relação aos óvulos na salinidade 10, é difícil afirmar se a inexistência da fertilização foi devida exclusivamente ao choque hipo-osmótico nos óvulos, pois se sabe que nesta salinidade os espermatozóides não são ativados (Pisseti, 2002).

A salinidade de aclimação dos reprodutores também pode influenciar o sucesso da reprodução, como foi verificado para *Acanthopagrus butcheri* (Haddy & Pankhurst, 2000). Essa espécie apresenta taxas de fertilização mais altas em salinidades semelhantes às salinidades em que os reprodutores foram aclimatados, portanto as baixas taxas de fertilização em salinidades reduzidas também podem ser resultado da influência da salinidade de aclimação dos reprodutores do linguado.

A salinidade também afetou a flutuabilidade dos ovos do linguado. Os ovos de *P. orbignyanus* são pelágicos e ao serem fertilizados em salinidade 35, apresentaram flutuabilidade positiva. O mesmo não ocorreu nas salinidades mais baixas, visto que todos os ovos sedimentaram logo após a fertilização, mesmo aqueles que apresentaram segmentação. Em espécies com ovos pelágicos, sua flutuabilidade varia conforme a densidade do ovo em relação ao meio externo, em função das transformações internas decorrentes da fertilização (Hempel, 1979).

Ovos de *P. lethostigma* flutuam em salinidades a partir de 31, sendo que salinidades inferiores a 10 durante a incubação afetam negativamente as taxas de eclosão (Smith *et al.*, 1999). Um resultado parecido foi obtido para *Centropomus parallelus*, visto que seus ovos flutuam em salinidades superiores ou iguais a 30, e que as taxas de eclosão se reduzem em salinidades mais baixas (Araújo, 2000). Os ovos da

garoupa *Mycteroperca rosacea* afundam em salinidades inferiores a 34, mas mesmo assim, as maiores taxas de eclosão são obtidas em salinidades inferiores a essa (Gracia-López *et al.*, 2004). Liu *et al.* (1994) obtiveram maior taxa de eclosão quando os ovos de *Hippoglossus stenolepis* foram incubados em salinidades onde flutuavam, nas salinidades abaixo de 30 os ovos sedimentaram e sua mortalidade foi total. O mesmo ocorreu durante a incubação dos ovos de *P. orbignyanus* nas salinidades 15 e 25. Após 1 h decorrente da fertilização foi observada a clivagem das células nas salinidades 15, 25 e 35, sendo registrados ovos com até quatro células. Contudo, após 24 h, todos os ovos estavam mortos nas salinidades 15 e 25. Apesar de não ter sido determinado o estágio em que os ovos morreram, nenhum deles atingiu a fase de nêurula.

Os ovos de *H. stenolepis* incubados sem aeração nas salinidades abaixo de 30, permaneceram junto ao fundo, sendo possível que a mortalidade dos embriões não tenha sido causada exclusivamente pela salinidade, mas também pela baixa qualidade da água junto ao fundo (Liu *et al.*, 1994). Por outro lado, Gracia-López (2004) obtiveram taxas de eclosão elevadas em salinidades onde os ovos não flutuam, mas nesse caso a água foi aerada, propiciando que os ovos se mantivessem suspensos na coluna d'água. É provável que a mortalidade dos ovos de *P. orbignyanus* em baixas salinidades também tenha relação com a questão da qualidade da água junto ao fundo, portanto novos experimentos deveriam ser realizados para avaliar este problema.

No presente trabalho, larvas com 6 dias de vida morreram em salinidades próximas a 0 e as larvas com 16 dias de vida tiveram sua sobrevivência reduzida em água doce, enquanto que os juvenis (J30, J45 e J60) podem ser expostos á água doce sem que haja prejuízo de sua sobrevivência, quando a redução de salinidade é realizada de forma gradual.

Muitos teleósteos marinhos dependem de áreas que apresentam amplas

variações de salinidade em alguma fase da vida, como mangues e estuários. Nesses ambientes, o sucesso dos indivíduos mais jovens depende de sua tolerância à salinidade (Wootton, 1996). Os Pleuronectiformes possuem pelo menos três famílias com representantes eurialinos: Pleuronectidae, Scophthalmidae e Paralichthyidae.

Entre os Pleuronectidae, juvenis de *Rhombosolea tapirina* apresentam crescimento semelhante em salinidades entre 15 e 35, mas sua sobrevivência é reduzida na salinidade 15 (Hart *et al*, 1996). *Platichthys flesus* apresenta tolerância à água doce na fase adulta (Arnold-Reed & Balment, 1991) e *Colistium nudipinnis* apresenta eurialinidade limitada, pois o crescimento de juvenis na salinidade 18 é menor do que em salinidades mais altas (Hickman *et al*, 2002).

Juvenis de *Psetta maxima* (Scophthalmidae) apresentam maior crescimento quando cultivados em salinidades intermediárias (10 e 19) do que em salinidade mais elevada (35) (Gaumet *et al*, 1995).

Entre os Paralichthyidae, além de *P. orbignyanus* (Wasielesky *et al*, 1995; Sampaio & Bianchini, 2002) são encontradas várias espécies com tolerância à água de baixa salinidade. *Paralichthys dentatus* e *Paralichthys lethostigma* freqüentam os estuários do Atlântico Norte ocidental em diferentes fases do seu desenvolvimento (Able *et al*, 1990; Smith *et al*, 1999) e demonstrações de tolerância a baixas salinidades foram registradas experimentalmente para larvas e juvenis destas espécies (Malloy & Targett, 1991; Daniels *et al*, 1996). O crescimento e a sobrevivência de juvenis de *Paralichthys californicus* é semelhante entre as salinidades 8 e 34 (Madon, 2002).

A tolerância do linguado determinada no presente trabalho pode estar relacionada com o habitat natural da espécie. No Rio Grande do Sul, adultos e subadultos da espécie podem ser encontrados na Lagoa dos Patos e na região costeira adjacente (Carneiro, 1995; Figueiredo & Menezes, 2000). Por outro lado, ovos e larvas

são encontrados somente em regiões da Lagoa que apresentem salinidades elevadas (Muelbert & Weiss, 1991). Uma vez que os juvenis do linguado demonstraram uma alta tolerância a salinidades reduzidas, incluindo a água doce, pode se esperar que na natureza, estes indivíduos migrem para o interior do estuário, utilizando-o como berçário, voltando para o mar para realizar a desova, a exemplo de outras espécies de teleósteos estuarinos (Dando, 1989).

O aumento da tolerância a diferentes salinidades à medida que os indivíduos crescem pode estar relacionado com o desenvolvimento das brânquias, o que já foi demonstrado para *Lutjanus argentimaculatus* (Estudillo *et al*, 2000). Silveira (1999) mostrou que as larvas de *P. orbignyanus* apresentam o início da diferenciação dos arcos branquiais aos 3 d.a.e., e que ao atingirem 12 d.a.e. podem ser observados filamentos e lamelas, mesmo que ainda rudimentares, mas já com sinais de funcionabilidade do órgão. A mortalidade total das larvas de *P. orbignyanus* do grupo L6 pode estar associada à pequena diferenciação das brânquias, sendo que a medida que as larvas crescem e as brânquias se desenvolvem, a sua sobrevivência em água doce aumenta. Além das brânquias, a pele e o intestino também estão envolvidos nos mecanismos de íon e osmorregulação, sendo observadas mudanças drásticas nestes órgãos durante o processo de metamorfose de Pleuronectiformes, o que resulta em mudanças na fisiologia da osmorregulação e conseqüentemente na tolerância à salinidade (Schreiber, 2001).

Assim como foi verificado no presente trabalho para *P. orbignyanus*, outras espécies de teleósteos também apresentam uma mudança na tolerância à salinidade em função da idade (Banks *et al*, 1991, Estudillo *et al.*, 2000; Caberoy & Quintio, 2000). Larvas de *Cynoscion nebulosus* aos 3 d.a.e. suportam salinidades compreendidas entre 6 e 43. Entretanto, aos 9 d.a.e., a amplitude de sua tolerância a salinidade aumenta,

sobrevivendo entre as salinidades 2 e 50 (Banks *et al.*, 1991). Ao contrário das larvas de *P. orbignyana*, as larvas recém-eclodidas de *L. argentimaculatus* apresentam uma maior tolerância a variações de salinidade do que larvas de 7, 14 e 21 d.a.e.. Entretanto, essa situação se reverte aos 28 d.a.e., quando essas larvas tornam-se mais tolerantes que as recém-eclodidas (Estudillo *et al.*, 2000).

As larvas do linguado *P. orbignyana* não estão adaptadas a baixas salinidades, pois foi verificada a mortalidade total das larvas em até 8 d.a.e. quando essas foram expostas por longo prazo à salinidade 5. Nas salinidades 20 e 30, nenhum efeito deletério foi detectado, o que demonstra que as larvas são tolerantes a essas salinidades. Ao final da larvicultura, a sobrevivência foi considerada baixa em todos os tratamentos. As mortalidades ocorreram, na maior parte, durante os primeiros dias de cultivo (3-8 d.a.e.), coincidindo com o período de primeira alimentação da espécie. Este é um período crítico durante a larvicultura dos linguados, ocorrendo altas taxas de mortalidade, como foi verificado para *P. dentatus* (Smigielsky, 1975). A mortalidade elevada observada durante estes primeiros dias não deve ser creditada ao efeito da salinidade e sim aos problemas comuns à primeira alimentação, visto que em todas as salinidades testadas a mortalidade foi semelhante. Entretanto, ao final da larvicultura, foi observado que as salinidades reduzidas, como a salinidade 10, afetam negativamente a sobrevivência dessas larvas, pois aquelas cultivadas nas salinidades 20 e 30 atingiram uma sobrevivência mais elevada.

As larvas de *Hippoglossus hippoglossus*, estão menos suscetíveis a mortalidades em salinidades que variam entre 27 e 32 (Lein *et al.*, 1997). Entretanto, quando as larvas são transferidas de salinidade 34 para salinidades inferiores a 30, ocorrem reduções significativas em sua sobrevivência (Opstad & Rurst, 2004). As larvas de *P. lethostigma*, por sua vez, apresentam uma menor tolerância à salinidade 25, quando

comparada com a salinidade 34 (Moustakas *et al.*, 2004). Entretanto, Daniels *et al.* (1996) não encontraram diferença na sobrevivência dessas larvas nas salinidades 20 e 33. No caso de *R. tapirina*, Hart *et al.* (1996) verificaram que a sobrevivência das larvas na salinidade 15 é mais baixa que em 25 e 35 de salinidade.

Além da sobrevivência, foi observado que a salinidade também exerce uma influência significativa no crescimento das larvas de *P. orbignyanus*, pois o seu cultivo na salinidade 10 resulta em indivíduos menores do que aqueles produzidos nas salinidades 20 ou 30. Na verdade não existe um padrão de resposta para o efeito da salinidade sobre o crescimento de larvas de peixes eurialinos. Larvas de *Pagrus auratus* não têm seu crescimento afetado pela salinidade quando cultivadas em salinidades que variam entre 10 e 35, mas em salinidades superiores a 35 as larvas são menores (Fielder *et al.*, 2005). No caso de larvas de *P. lethostigma* foi observado um efeito negativo da salinidade 25 no crescimento das larvas, quando comparado à salinidade 34 (Moustakas *et al.*, 2004). Por outro lado, as larvas de *Mugil cephalus* apresentam um melhor crescimento em água salobra (salinidades 22 e 23) do que em água salgada (salinidade 32 a 35) (Murashige *et al.*, 1991).

O crescimento reduzido na salinidade 10 se manteve até o período de assentamento das larvas. Esse período coincide com o processo de metamorfose, que é considerada uma etapa crítica durante o cultivo de linguados por ocorrer reduções de tolerância quanto às variações de salinidade (Schreiber, 2001). Entretanto, nenhum efeito da salinidade quanto à tolerância das larvas foi detectada nesse período. O início do processo de assentamento de *P. orbignyanus* ocorreu no mesmo dia em todas as salinidades, mas foi observada uma maior proporção de indivíduos assentados nas salinidades mais elevadas. Isto, associado ao menor comprimento das larvas na salinidade 10 pode sugerir que o início do processo de assentamento esteja mais

relacionado com o comprimento do que com a idade. O comprimento dos juvenis de *P. orbignyana* no final do processo de assentamento variou entre 11 e 12 mm, em conformidade com o comprimento de outros Paralicthyidae ao completarem a metamorfose (7-15 mm) (Ahlstrom *et al.*, 1983). A salinidade também poderia influenciar o assentamento, visto que fatores ambientais podem funcionar como gatilhos para disparar este processo. Um choque hipoosmótico foi sugerido para ajudar a sincronizar o assentamento de *P. dentatus*, entretanto isso não foi comprovado experimentalmente (Gavlik & Specker, 2004).

Após a metamorfose, os juvenis do linguado respondem de forma diferente das larvas quando expostos em longo prazo a diferentes salinidades. No experimento realizado com os juvenis, nenhum efeito da salinidade sobre a sobrevivência foi observado, demonstrando que os juvenis do linguado apresentam uma ampla tolerância a salinidades que variam desde a água do mar (salinidade 35) até a água doce (salinidade 0). Entretanto, em água doce ocorreu a mortalidade em massa em uma das repetições, onde o surgimento de um muco esbranquiçado nos tanques de cultivo indicou a presença de um agente patogênico. O surgimento de agentes patogênicos em água doce é comum na piscicultura. Na larvicultura de *Chirostoma estor estor*, a infecção pelo fungo *Saprolegnia* sp. é reduzida significativamente em salinidade 10, o que aponta para o benefício da utilização de água salobra em seu cultivo (Martinez-Palacios *et al.*, 2004). O mesmo pode ser válido para o cultivo de juvenis *P. orbignyana*, uma vez que não foi detectado o surgimento de patógenos em salinidades a partir de 5. Entretanto, é importante observar que o surgimento de patógenos no cultivo do linguado não ocorre exclusivamente na água doce, pois Abreu *et al.* (2005) observaram a infestação do protozoário *Amyloodinium ocellatus* em linguados cultivados em água salgada.

A salinidade afeta diretamente o metabolismo dos teleósteos (Jarvis & Ballantyne, 2003; Rocha *et al*, 2005; Laiz-Carrión *et al.*, 2005). Quando os indivíduos se encontram em salinidades desfavoráveis, suas atividades iônicas e osmorregulatórias podem ser alteradas, modificando o balanço energético do animal (Wuenschel *et al.*, 2004), e conseqüentemente prejudicando seu crescimento.

Vários autores se baseiam na hipótese de que um melhor crescimento é obtido em ambientes isosmóticos. Nesse caso, a otimização do crescimento é obtida pelo fato que a energia que seria utilizada para a iônica e osmorregulação é direcionada para o crescimento do animal (Woo & Kelly, 1995; Boeuf & Payan, 2001; Immsland *et al.*, 2003; Duston *et al.*, 2004).

O crescimento das larvas de *P. orbignyanus* é prejudicado na salinidade 10 e o maior crescimento é observado em salinidades mais elevadas. Entretanto, após completarem a metamorfose o crescimento dos juvenis (80 mg) é maior na salinidade 10. Sampaio *et al.* (2001b) observaram um crescimento semelhante para os juvenis (3 a 150 g) cultivados em salinidades 11 e 30, demonstrando uma maior tolerância dos indivíduos mais velhos a salinidade.

O crescimento mais acelerado dos juvenis mantidos na salinidade 10 coincide com a hipótese de que um melhor crescimento é obtido em salinidades próximas ao ponto isosmótico, uma vez que o ponto isomótico de *P. orbignyanus* corresponde à salinidade 10,9 (Sampaio & Bianchini, 2002), entretanto o crescimento das larvas do linguado cultivadas na salinidade 10 foi menor do que em 20 ou 30.

A hipótese de que um melhor crescimento é obtido em salinidades próximas ao ponto isosmótico é confirmada, mas não necessariamente isso quer dizer que o maior crescimento tem que ser observado exclusivamente nessa salinidade, pois em algumas espécies são observados valores máximos de crescimento em um amplo intervalo de

salinidade, como é o caso de *P. lethostigma* (Moustakas *et al.*, 2004) e até mesmo de indivíduos mais velhos de *P. orbignyanus* (Sampaio *et al.*, 2001). Por outro lado, para *G. morhua* (Lambert *et al.*, 1994), *Scophthalmus maximus* (Imsland *et al.*, 2001), *Anarhichas lupus* (François *et al.*, 2004) e *Sparus aurata* (Laiz-Carrión, 2005) um melhor crescimento é obtido exclusivamente na salinidade isosmótica.

O cultivo de peixes marinhos é limitado pela produção de alevinos de qualidade, mas a disponibilidade e o custo de terras costeiras também inibem o desenvolvimento da piscicultura marinha. Ao constatar a eurialinidade de *P. lethostigma*, Smith *et al.* (1999) sugeriram que seu cultivo possa ser feito em água doce ou de baixa salinidade. A tolerância de *P. orbignyanus* à água doce também pode permitir que seu cultivo seja realizado em águas interiores, mas de acordo com os resultados deste trabalho, apenas as fases de alevinagem e engorda poderiam ser realizadas em água doce, pois a reprodução necessita de água oceânica e a larvicultura pelo menos de água salobra, com salinidade igual ou superior a 20. Larvas de *P. lethostigma* podem ser cultivadas desde a primeira alimentação em viveiros de água salobra com água de salinidade 20 (Daniels *et al.*, 1996), do mesmo modo, as larvas de *P. orbignyanus* também poderiam ser submetidas ao mesmo manejo, pois sua sobrevivência e crescimento na salinidade 20 são similares as das larvas cultivadas em água salgada.

Comparando a eurialinidade de *P. lethostigma* com *P. orbignyanus*, pode-se dizer que este último desenvolve tolerância a baixas salinidades mais cedo do que o primeiro. Juvenis de *P. orbignyanus* com apenas 30 dias de vida apresentam 100% de sobrevivência em água doce, enquanto que *P. lethostigma* com 25 dias de vida sofre 100% de mortalidade em água doce (Daniels *et al.*, 1996), os juvenis dessa espécie com 50 dias de idade sofrem 80% de mortalidade e apenas indivíduos com 220 dias de vida sobrevivem em água doce (Smith *et al.*, 1999).

Uma vez que a salinidade limita a distribuição dos linguados no ambiente e que esse efeito varia conforme o estágio de desenvolvimento que o indivíduo se encontra (Schreiber, 2001), a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se estabelecer um paralelo entre o ambiente de cultivo e o habitat natural de *P. orbignyana*. Os ovos fertilizados do linguado estão ajustados às salinidades da zona costeira, sedimentando em água salobra, o que pode acarretar a mortalidade dos ovos. As larvas, por sua vez, podem ser encontradas na desembocadura do estuário da Lagoa dos Patos (Muelbert & Weiss, 1991), o que explica a tolerância das larvas às salinidades a partir da salinidade 20. Essa tolerância aumenta em função da idade do linguado, demonstrando que os juvenis são capazes de utilizar áreas estuarinas como berçário, podendo permanecer nessas áreas até estágios intermediários de maturação gonadal das fêmeas. A partir daí, o linguado parte em direção ao mar para completar a maturação e se reproduzir.

CONCLUSÕES

- A reprodução artificial do linguado é favorecida em salinidade 35;
- Juvenis toleram a exposição à água doce a partir de 30 dias;
- As larvas devem ser cultivadas em salinidades a partir de 20;
- A salinidade não afetou o tempo de assentamento dos juvenis;
- A salinidade 10 favorece o crescimento dos juvenis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Able, K. W., Matheson, R. E., Morse, W. W., Fahay, M. P. & Shepherd, G., 1990. Patterns in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) early life history in the Mid-Atlantic Bight and New Jersey estuaries. Fish. Bull., 88: 1-12.
- Abreu, P. C., Robaldo, R. B., Sampaio, L. A., Bianchini, A. & Odebrecht, C., 2005. Recurrent amyloidinosis on broodstock of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*: dinospore monitoring and prophylactic measures. J. World Aquacult. Soc., 36: 42-50.
- Ahlstrom, E. H., Amaoka, K., Hensley, D. A., Moser, H. G. & Sumida, B. Y., 1984. Pleuronectiformes: development. In: Ontogeny and systematics of fishes. Am. Soc. Ichthyol. Herpec. Special Publication, 1: 640-670.
- Araújo, J., 2000. Influência da salinidade na incubação e larvicultura do robalo-peva *Centropomus parallelus* (POEY, 1860). Florianópolis, UFSC. 62p. (Dissertação de mestrado).
- Arnold-Reed, D. E. & Balment, R. J., 1991. Salinity tolerance and its seasonal variation in the flounder, *Platichthys flesus*. Comp. Biochem. Physiol., 99A: 145-149p.
- Banks, M. A., Holt, G. J. & Wakeman, J. M., 1991. Age-linked changes in salinity tolerance of larval spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*, Cuvier). Journal of Fish Biology, 39: 505-514.
- Blaxter, J. H. S. & Hempel, G., 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). Journal du Conseil International, 28: 211-240.
- Bianchini, A.; Wasielesky, W. & Miranda, K. C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 56:453-459.

- Boeuf, G. & Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130C: 411-423.
- Bórquez, A. & Cerqueira, V. R., 1998. Feeding behavior in juvenile snook, *Centropomus undecimallis* I. Individual effect of some chemical substances. *Aquaculture*, 169:25-35p.
- Bush, C. P. & Weis, J. S., 1983. Effects of salinity on fertilization success in two populations of *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.*, 164: 406-417.
- Caberoy, N. B. & Quintio, G. F., 2000. Changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23: 83-94.
- Carneiro, M. H., 1995. Reprodução e alimentação dos linguados *Paralichthys patagonicus* e *Paralichthys orbignyanus* (Pleuronectiformes: Bothidae), no Rio Grande do Sul, Brasil. Rio Grande, FURG, 80p. (dissertação de mestrado).
- Cerqueira, V. R.; Mioso, R.; Macchiavello, J. A. G. & Brügger, A. M. 1997. Ensaio de indução de desova do linguado (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). *B.Inst. Pesca*. 24 (especial): 247-254.
- Chao, L. N., Pereira, L. E., Vieira, J. P., Bemvenuti, M. A. & Cunha, L. P. R., 1982. Relação preliminar dos peixes estuarinos da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, Rio Grande do Sul, Brasil. *Atlântica*, 5: 67-75.
- Dando, P. R., 1989. Reproduction in estuarine fish. In: Potts, G., Wootton, R. J. (Eds.). *Fish Reproduction – Strategies and Tactics*. Londres, Academic Press, 155-167.
- Daniels, H. V., Berlinsky, D. L., Hodson, R. G. & Sullivan, C. V., 1996. Effects of stock density, salinity, and light intensity on growth and survival of southern flounder *Paralichthys lethostigma* larvae. *J. World Aquac. Soc.*, 27: 153-159.

- Duston, J., Astatkie, T. & MacIsaac, P. F., 2004. Effect of body size on growth and food conversion of juvenile striped bass reared at 16-28 °C in freshwater and seawater. *Aquaculture*, 234: 589-600.
- Estudillo, C. B., Duray, M. N., Marasigan, E. T. & Emata, A. C., 2000. Salinity tolerance of the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) during ontogeny. *Aquaculture*, 190: 155-167.
- FAO, 2003. The state of world fisheries and aquaculture 2002. Disponível em http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm. Acesso em 3 de abril de 2003.
- Fielder, D. S., Bardsley, W. J., Allan, G. L. & Pankhurst, P. M., 2005. The effects of salinity and temperature on growth and survival of Australian snapper, *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture*, no prelo.
- Figueiredo, J. L. & Menezes, N. A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 116p.
- François, N. R. L., Lamarre, S. G. & Blier, P. U., 2004. Tolerance, growth and haloplasticity of the atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities. *Aquaculture*, 236: 659-675.
- Gaumet, F., Boeuf, G., Severe, A., Le Roux, A. & Mayer-Gostant, N., 1995. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. *J. Fish Biol.*, 47: 865-876.
- Gavlik, S. & Specker, J. L., 2004. Metamorphosis in summer flounder: manipulation of rearing salinity to synchronize settling behavior, growth and development. *Aquaculture*, 240: 543-555.
- Gracia-López, V., Martínez, M. K-. & García, M. M., 2004. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture*, 237: 485-498.

- Haddy, J. A. & Pankhurst, N. W., 2000. The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilisation and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquaculture*, 188: 115-131.
- Hart, P. R. & Purser, G. L., 1995. Effects of salinity and temperature on eggs and yolk sac larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Gunther, 1862). *Aquaculture*, 136: 221-230.
- Hart, P. R., Hutchinson, W. G. & Purser, G. J., 1996. Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862). *Aquaculture*, 144: 303-311.
- Hempel, G., 1979. Early life history of marine fish. University of Washington Press. Seattle. 70p.
- Hickman, R. W., Redfearn, P. & Tait, M. J., 2002. Novel effects of salinity and water reuse on growth of juvenile New Zealand turbot, *Colistium nudipinnis* (Waite 1910), a potential aquaculture species. *Aquaculture Research*, 33: 1009-1018.
- Hu, F. & Liao, I.-C., 1981. The effect of salinity on the eggs and larvae of grey mullet, *Mugil cephalus*. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explr. Mer.*, 178: 460-466.
- Imsland, A. K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M. H. G., FitzGerald, R., Bonga, S. W., Ham, E. V., Nævdal, G. & Stefansson, S. O., 2001. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 198: 353-367.
- Imsland, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A. & Stefansson, S. O., 2003. Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*, 218: 671-683.

- Jarvis, P. L. & Ballantyne, J. S., 2003. Metabolic responses to salinity acclimation in juvenile shortnose *Acipenser brevirostrum*. *Aquaculture*, 219: 891-909.
- Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J. M., Ríó, M. P. M., Soengas, J. L. & Mancera, J. M., 2005. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*, no prelo.
- Lambert, Y., Dutil, J. -D. & Munro, J., 1994. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1569-1576.
- Lein, I., Tveite, S., Gjerde, B. & Holmeford, I., 1997. Effects of salinity on yolk sac larvae of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 156: 291-303.
- Liu, H. U., Stickney, R. R., Dickhorf, W. W. & McCaughran, D. A., 1994. Effects of environmental factors on egg development and hatching of pacific halibut *Hippoglossus stenolepis*. *J. World Aquacult. Soc.*, 25: 317-321.
- Louzada, L. R., 2004. Efeito do fotoperíodo na sobrevivência e crescimento de larvas e juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*. FURG. 33p. (Dissertação de mestrado).
- Madon, S. P., 2002. Ecophysiology of juvenile Califórnia halibut *Paralichthys californicus* in relation to body size, water temperature and salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 243: 235-249.
- Malloy, K. D. & Targett, T. E., 1991. Feeding, growth and survival of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*: experimental analysis of the effects of temperature and salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72: 123-223.

- Martinez-Palacios, C. A., Morte, J. C., Tello-Ballinas, J. A., Toledo-Cuevas, M. & Ross, L. G., 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture*, 238: 509-522.
- Méier, K. M. 2005. Estudos genético-fisiológicos da osmorregulação do linguado *Paralichthys orbignyanus*. FURG. 48p. (Dissertação de mestrado).
- Moustakas, C. T., Watanable, W. O. & Copeland, K. A., 2004. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival, and osmoregulatory ability of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture*, 229: 159-179.
- Muelbert, J. H. & Weiss, G., 1991. Abundance and distribution of fish larvae in the channel area of the Patos Lagoon estuary, Brazil. In: Hoyt, D. (Ed.). Larval fish recruitment and research in the Americas. 13^o Annual Fish Conference. NOAA Technical Report NMFS 95, 43-54.
- Murashige, R., Bass, P., Wallace, L., Molnar, A., Eastham, B., Sato, V., Tamaru, C. & Lee, C., 1991. The effect of salinity on the survival and growth of striped mullet (*Mugil cephalus*) larvae in the hatchery. *Aquaculture*, 96: 249-254.
- Okamoto, M., 2004. Efeitos da temperatura sobre ovos e larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus*. FURG. 27p. (Dissertação de mestrado).
- Opstad, I. & Rurst, M. B., 2004. Effect of recovery salinity on survival of acutely stressed halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L) larvae. *Aquaculture Research*, 35: 1286-1291.
- Partridge, G. J. & Jenkins, G. I., 2002. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Aquaculture*, 210: 219-230.

- Phonlor, G. & Vinagre, L.E.C., 1989. Efeito do retarde da primeira alimentação sobre o crescimento e a sobrevivência da larva de *Odontesthes argentinensis* (Cuv. & Val., 1835). *Atlântica*, 11: 63-75.
- Pisseti, T. L., 2002. Efeito da salinidade sobre a motilidade dos espermatozóides do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae). Rio Grande, FURG, 20p. (Monografia de graduação).
- Ricker, W. E., 1979. Growth rates and models. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., Brett, J. R. (Eds.). *Fish Physiology*, vol. VIII. Bioenergetics and Growth. Academic Press, New York. 677-743.
- Robaldo, R., Pereira, J. Jr., Sampaio, L. A., Kütter, V. & Bianchini, A., 2002. Ovoposição e desenvolvimento inicial de *Caligus* sp. (Copepoda: Caligidae) parasita de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) em cativeiro. *Atlântica*, 24: 85-88.
- Robaldo, R.B., 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) no ambiente e em cativeiro. FURG, 200p. (Tese de Doutorado).
- Rocha, A. J. S., Gomes, V., Ngan, P. V., Passos, M. J. A. C. & Fúria, R. F., 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316: 157-165.
- Sampaio, L. A., 1992. Fertilização artificial, incubação e crescimento larval de *Odontesthes* sp. e *O. argentinensis*: efeitos da salinidade e densidade de estocagem. FURG, 58p. (Dissertação de Mestrado).
- Sampaio, L. A., Burkert, D. & Tesser, M. B., 1998. Análise do custo de diferentes produtos (MS-222, benzocaína e fenoxietanol) para anestésiar o linguado *Paralichthys orbignyanus*. XI Semana Nacional de Oceanografia. Resumos

Expandidos. 564p.

- Sampaio, L. A.; Ferreira, A. H. & Tesser, M. B. 2001a. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Scientiarum*, 23(2): 471-475.
- Sampaio, L. A., Bianchini, A. & Cerqueira, V. R., 2001b. Growth of juvenile Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *Journal of Applied Aquaculture*, 11: 67-75.
- Sampaio, L. A. & Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269: 187-196.
- Sampaio, L. A.; Tesser, M. B. & Burquert, D., 2003. Efeito agudo da salinidade sobre a sobrevivência de juvenis de pampo *Trachinotus marginatus* (Pisces: Carangidae) em laboratório. *Ciência Rural*, 33.
- Schreiber, A. M., 2001. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129B: 587-595.
- Silveira, M. P. M., Cousin, J. C. & Haimovici, M., 1995. Estrutura ovárica e testicular do linguado *Paralichthys orbignyanus* (valenciennes, 1839). *Atlântica*, 17: 137-152.
- Silveira, M. P. M., 1999. Ciclo reprodutivo e desenvolvimento ontogenético do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) do sul do Brasil. FURG. 122p. (Tese de doutorado).
- Smigielsky, A. S., 1975. Hormonal-induced ovulation of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Fish. Bull.*, 73: 431-438.

- Smith, T. I. J., Denson, M. R., Heyward, L. D., Jenkins, W. E. & Carter, L. M., 1999. Salinity effects on early life stages of southern flounder *Paralichthys lethostigma*. J. World Aquac. Soc., 30: 236-244.
- Swanson, C., 1996. Early development of milkfish: effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth. Journal of Fish Biology, 48: 405-421.
- Tandler, A., Anay, F. A. & Choshniak, I., 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilted seabream, *Sparus aurata*, larvae. Aquaculture, 135: 343-353.
- Velloso, A. L., 2004. *Therodamas fluviatilis* (Ergasilidae) - parasita de *Paralichthys orbignyanus* (Paralichthyidae): sistemática, distribuição e histopatologia. FURG. (Dissertação de mestrado).
- Wasielesky, W., Miranda, K.C. & Bianchini, A., 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. Arq. Biol. Tecnol., 38: 385-395.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Santos, M. H. S. & Poersh, L. H., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. J. World Aquac. Soc., 28: 202-204.
- Wasielesky, W., Bianchini, A. & Miranda, K.C., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de linguado *Paralichthys orbignyanus*. Frente Maritimo, 17 (A): 43-48.
- Westing, L. & Nissling, A., 1991. Effects of salinity on spermatozoa motility, percentage of fertilized eggs and egg development of Baltic cod (*Gadus morhua*), and implications for cod stock fluctuations in the Baltic. Marine Biology, 108: 5-9.
- Woo, N. Y. S. & Kelly, S. P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. Aquaculture, 135: 229-238.

Wootton, R. J., 1996. Fish Ecology. Thompson Press. New Delhi. 212p.

Wuenschel, M. J., Jugovich, A. R. & Hare, J. A., 2004. Effect of temperature and salinity on the energetics of juvenile gray snapper (*Lutjanus griseus*): implications for nursery habitat value. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 312: 333-347.