

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

MARCELO HIDEO OKAMOTO

**EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE OVOS E LARVAS DO
LINGUADO *Paralichthys orbignyanus***

**RIO GRANDE, RS
2004**

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

**EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE OVOS E LARVAS DO
LINGUADO *Paralichthys orbignyanus***

MARCELO HIDEO OKAMOTO

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

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

**RIO GRANDE, RS, BRASIL
JUNHO, 2004**

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1 - Introdução	1
1.1 - Produção de linguado	2
1.2 - Trabalhos realizados com <i>P. orbignyanus</i>	3
1.3 - Influência da temperatura sobre o desenvolvimento inicial de peixes	3
2 - Objetivo	5
2.1 - Objetivos específicos	5
3 - Material e métodos	6
3.1 - Efeitos da temperatura durante a incubação dos ovos	7
3.2 - Efeitos da temperatura durante a larvicultura	7
3.3 - Análise dos resultados	8
4 - Resultados	9
4.1 - Efeitos da temperatura durante a incubação dos ovos	9
4.2 - Efeitos da temperatura durante a larvicultura	13
5 - Discussão	18
6 - Conclusão	22
7 - Referências bibliográficas	23

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luís André Sampaio, que foi um orientador paciente e me ajudou bastante durante o período que estive na EMA.

Aos membros da comissão examinadora, Dr. Juvêncio Luís Osório Fernandes Pouey, Dr. Ronaldo Olivera Cavalli e Dr. Ricardo Berteaux Robaldo, pela revisão deste trabalho, críticas e sugestões.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Lisiane, Mauren Andréa, Luiz, Carioca, Tati, Jaqueline, Tito, Luciano e Eduardo, que ajudaram não só nas funções do dia-a-dia, mas também tornaram o ambiente de trabalho muito mais alegre.

Aos estagiários Ricardo, Emmeline, Sônia, Marcel, Lisa, Michele e Diana, que estão dando uma força na manutenção do laboratório, tornando possível a realização de trabalhos como este.

Ao Prof. Armino Pinho Maçada, que depois de me orientar durante a graduação, esteve sempre por perto dando sugestões para o bom andamento do trabalho.

Aos funcionários Santa Casa, Seu Hermes, Dona Enilda, Linamara, Sandro, Marcos, Fabiano e Aline que, de uma forma ou outra, estão sempre ajudando no que for preciso.

Aos amigos que conquistei durante estes anos de Cassino, alguns mais antigos, outros mais recentes. Entre eles estão o Luiz Henrique, Luciano Hermmans, Dani Maranhão, Fernanda Piedras, Paula, Ester, Dariano, Dona Helô, Crisiane, Jerusa e Maíra.

À amiga Karina, que está agüentando morar comigo (não sei se ficou arrependida) e que ficou mais nervosa do que eu nos dias que antecederam a apresentação desta dissertação. Aos outros dois moradores da casa Murilo e Bernadeth, que entre um miado e outro, deixam a Karina mais feliz, e isso faz com que eu os tolere.

Aos meus irmãos Leonardo e Aline, pelo incentivo recebido.

E principalmente aos meus pais, o meu MUITO OBRIGADO! Amo vocês!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da temperatura sobre ovos e larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Os ovos foram expostos às temperaturas de 14, 17, 20, 23, 26 e 29°C. Após a eclosão foi medido o comprimento padrão das larvas, calculado o volume do saco vitelino e o seu consumo, determinado o percentual de indivíduos mal-formados e a resistência das larvas ao jejum em cada temperatura. As larvas foram cultivadas nas temperaturas 17, 20, 23 e 26°C, sendo que 500 larvas foram distribuídas em tanques de 10 L e alimentadas com rotíferos e náuplios de *Artemia* sp. A cada cinco dias foi registrado o comprimento padrão das larvas e diariamente foi anotado o número de indivíduos mortos. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$), foi aplicado o Teste de Tukey. O tempo para eclosão foi inversamente proporcional à temperatura, mas o percentual de larvas mal-formadas foi mais elevado nas temperaturas extremas, diminuindo nas temperaturas 20, 23 e 26 °C. O comprimento padrão das larvas recém-eclodidas foi semelhante ($P > 0,05$) entre 17 e 29°C (1,76-1,81mm), mas foi significativamente menor ($P < 0,05$) a 14°C (1,58 mm). O volume do saco vitelino foi inversamente proporcional a temperatura, com exceção das larvas eclodidas a 14°C, cujo volume foi inferior ao de 17°C. As larvas sobreviveram por mais tempo em jejum quando mantidas a 23°C. Houve 100% de mortalidade das larvas mantidas a 17°C no 12º dia após a eclosão, a sobrevivência foi significativamente menor ($P < 0,05$) a 20°C (2,1%) do que a 23°C (11,7%) e 26°C (11,7%). O comprimento ao final da metamorfose foi semelhante a 20 e 26°C, $9,29 \pm 0,15$ mm e $9,02 \pm 0,11$ mm respectivamente, mas significativamente maior que o das larvas de 23°C, $8,23 \pm 0,07$ mm ($P < 0,05$). A metamorfose foi completada mais rapidamente a 23 e 26°C (20 dias), do que a 20°C (35 dias). O índice de juvenis mal-formados após a metamorfose foi de 59% a 26°C, superior aos 21 e 17% obtidos a 20 e 23°C, respectivamente. Os resultados deste trabalho sugerem que ovos e larvas de linguado sejam mantidos a 23°C, pois apesar de nesta temperatura o crescimento ser menor, há uma boa sobrevivência e o índice de indivíduos mal-formados é baixo.

ABSTRACT

This work aimed to determine the effects of temperature on eggs and larvae of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Eggs were exposed to 14, 17, 20, 23, 26 and 29°C and after hatching, the standard length, the yolk-sac volume and its consumption, the percentage of abnormal larvae and time to starvation at each temperature were registered. Larviculture was done at 17, 20, 23 and 26°C, 500 larvae were transferred to 10 L tanks and fed on rotifer and *Artemia* sp. nauplii. Mortality was registered daily, and every five days standard length was measured. All statistical analyses were carried out using one-way ANOVA and Tukey's Test at 95% confidence level. Time to hatch was inversely proportional to the temperature, but the percentage of abnormal larvae was higher at extreme temperatures, decreasing at 20, 23, and 26°C. Standard length at hatching was similar ($P>0.05$) between 17 and 29°C (1.76 – 1.81mm), but significantly smaller ($P<0.05$) at 14°C (1.58mm). The yolk-sac volume was inversely proportional to temperature, except at 14°C, where the volume was smaller than at 17°C. Time to starvation was higher (six days) at 23°C. There was 100% of mortality at 17°C 12 days after hatching, survival was significantly lower ($P<0.05$) at 20°C (2.1%) when compared to 23°C (11.7%) and 26°C (11.7%). Standard length at metamorphosis was similar at 20 and 26°C, $9.29\pm 0.15\text{mm}$ and $9.02\pm 0.11\text{mm}$ respectively, but significantly larger than at 23°C $8.23\pm 0.07\text{mm}$ ($P< 0.05$). Metamorphose was completed faster at 23 and 26°C (20 days) than at 20°C (35 days). The percentage of abnormal juvenile after metamorphosis was 59% at 26°C, higher than at 20 and 23°C (21 and 17% respectively). The results of this study suggest that eggs and larvae can be reared at 23°C, because despite of smaller growth at this temperature, the survival rate is good and the rate of abnormal larvae is low.

1 - INTRODUÇÃO

Os linguados são conhecidos pelo seu formato plano e assimétrico, resultado de uma metamorfose bastante marcante durante o estágio larval (Ahlstron *et al.*, 1984). Estes autores citam que, durante a metamorfose, o olho direito migra para o lado esquerdo do corpo em espécies sinistras, enquanto em espécies destras o olho esquerdo migra para o lado direito do corpo, ficando os dois olhos do mesmo lado da cabeça.

Estes peixes pertencem à ordem Pleuronectiformes, onde se encontra a família Paralichthyidae, a qual pertence o linguado *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839 (Figueiredo & Menezes, 2000).

Esta espécie possui uma boca grande e dentes bem desenvolvidos, exibindo hábito alimentar carnívoro. Geralmente encontram-se enterrados na areia ou camuflados ao ambiente. É uma espécie sinistra, e o lado esquerdo do corpo é pigmentado com manchas negras e arredondadas de tamanhos variados ao longo do corpo e nadadeiras, enquanto que o lado direito é desprovido de pigmento (Figueiredo & Menezes, 2000). Os exemplares maiores podem chegar a 1 m de comprimento total e pesar aproximadamente de 10 Kg (Robaldo, 2003).

O período reprodutivo de *P. orbignyanus* na costa gaúcha tem início em outubro e segue até abril (Silveira *et al.*, 1995; Carneiro, 1995), sendo fortemente influenciado pelo aumento do fotoperíodo e da temperatura (Robaldo, 2003).

Os ovos desta espécie são pelágicos, pequenos (diâmetro por volta de 1,0 mm), possuem um formato esférico e uma única gota de óleo, gerando larvas que, ao eclodirem, possuem comprimento médio de 1,82 mm (Cerqueira, 1997).

Esta espécie é encontrada desde o estado do Rio de Janeiro até Mar del Plata, na Argentina, habitando águas estuarinas e costeiras, chegando até pouco mais de 20 m de profundidade (Figueiredo & Menezes, 2000). Dentro desta área, a temperatura superficial da água pode chegar a 10°C mais ao sul e a 30°C mais ao norte, entre as estações de primavera e verão, que correspondem ao seu período reprodutivo (Andrade, 1996).

Ao longo da região costeira adjacente ao Estuário da Lagoa dos Patos ocorrem mais duas espécies de Paralichthyidae, *Paralichthys patagonicus* e *Paralichthys*

isocetes (Figueiredo & Menezes, 2000). Estas duas espécies, porém, são essencialmente marinhas e apresentam um porte menor que *P. orbignyanus* (Haimovici *et al.*, 1996).

Devido à característica de habitar águas rasas, o linguado *P. orbignyanus* é explorado principalmente pela pesca artesanal (Carneiro, 1995), e apesar do seu volume de desembarque ser relativamente pequeno, isto é compensado pelo seu elevado valor comercial (Robaldo, 2003).

1.1. Produção de Linguado

No Japão, o linguado *Paralichthys olivaceus* é um dos principais peixes cultivados em larga escala, sendo destinado tanto para o comércio, como para o repovoamento de estoques naturais (Fukuda *et al.*, 2002). Estão sendo produzidos atualmente mais de 30 milhões de juvenis por ano, o que resulta na produção de cerca de 7.300 ton/ano (Fushimi, 2001).

O sucesso do cultivo de *P. olivaceus* despertou o interesse em outras espécies de *Paralichthys*, que estão sendo estudadas com o objetivo de serem cultivadas em diferentes países. Por exemplo, nos Estados Unidos *Paralichthys dentatus* (Watanabe *et al.*, 1998) e *Paralichthys lethostigma* (Jenkins *et al.*, 1997), no Equador *Paralichthys woolmani* (Benetti *et al.*, 1994) e no Chile *Paralichthys microps* e *Paralichthys adspersus* (Silva, 2001).

No Brasil, o linguado *P. orbignyanus* vem sendo considerado um bom candidato à piscicultura, devido a sua tolerância à uma ampla faixa de salinidade e temperatura (Wasielesky *et al.*, 1995; Wasielesky *et al.*, 1998), baixos valores de pH (Wasielesky *et al.*, 1997) e altas concentrações de amônia e nitrito (Bianchini *et al.*, 1996), além de ter uma carne muito apreciada pelo consumidor e um alto preço no mercado (Figueiredo & Menezes, 2000).

Um fato positivo enfatizado por Robaldo (2003), foi a adaptação da espécie ao cativeiro. Este autor diz que linguados capturados no ambiente demoram um pouco para se alimentarem, porém com o tempo, estes passam a se deslocar em busca do alimento oferecido.

1.2. Trabalhos realizados com *P. orbignyanus*

Vários estudos que abordam a biologia e o potencial do cultivo de *P. orbignyanus* já foram feitos com juvenis e adultos, os quais estão relacionados com a tolerância a parâmetros físico-químicos (Wasielesky, 1994; Bianchini *et al.*, 1996), alimentação e reprodução na natureza (Carneiro, 1995; Silveira *et al.*, 1995; Silveira, 1999), ensaios de indução a desova (Cerqueira *et al.*, 1997; Sampaio *et al.*, 2001, Robaldo, 2003), uso de anestésicos (Sampaio *et al.*, 1998) e íono e osmoregulação (Sampaio & Bianchini, 2002). Porém, estudos relacionados aos estádios embrionário e larval desta espécie são escassos. Testes realizados sobre o crescimento e a sobrevivência de larvas em diferentes salinidades (Okamoto *et al.*, 2003) e em diferentes fotoperíodos (Louzada *et al.*, 2002) são alguns exemplos.

1.3. Influência da temperatura sobre o desenvolvimento inicial de peixes

Embrões e larvas de peixes são muito vulneráveis às mudanças dos parâmetros físico-químicos que ocorrem no ambiente (Laurence & Howell, 1981). Estas mudanças exercem grande influência sobre os processos metabólicos, podendo afetar diretamente a sobrevivência dos peixes durante os estádios de desenvolvimento inicial (Laurence, 1975), sendo a temperatura da água considerada a variável que mais afeta o desenvolvimento destes organismos (Rogers & Westin, 1981).

A duração do período embrionário é fortemente influenciada pela temperatura. As larvas de *P. lethostigma* eclodem 58 horas após a fertilização a 17°C e 30 horas a 25°C, entretanto o comprimento dessas larvas ao eclodir não é afetado pela temperatura (van Maaren & Daniels, 2001). O tempo de incubação dos ovos também é inversamente proporcional para o linguado *Rhombosolea tapirina* entre as temperaturas 9 e 18°C, sendo que entre 9 e 12°C ocorrem as melhores taxas de eclosão (Hart & Purser, 1995).

Dependendo da espécie, a temperatura exerce uma maior ou menor influência sobre o desenvolvimento larval. Ao submeterem larvas do linguado *R. tapirina* a diferentes temperaturas, Hart & Purser (1995) concluíram que a 15°C o vitelo é convertido em tecido com maior eficiência, resultando em larvas maiores quando comparadas com aquelas que foram expostas a outras temperaturas. Entretanto, para

outras espécies foi observado que não existe uma temperatura ótima, pois a eficiência de conversão de vitelo em tecido não é afetada dentro de uma determinada faixa de temperatura, como *P. dentatus* (Johns & Howell, 1980) e *Limanda ferruginea* (Howell, 1980).

Seikai *et al.* (1986) observaram que larvas de *P. olivaceus* mantidas em temperaturas consideradas elevadas para a espécie atingiram o final da metamorfose antes que as demais, porém o comprimento do corpo foi relativamente menor. O tempo para completar a metamorfose também foi menor em temperaturas elevadas para *Pseudopleuronectes americanus* (Laurence, 1975).

2 - OBJETIVO

Avaliar os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento inicial do linguado *P. orbignyanus*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os efeitos da temperatura sobre ovos de *P. orbignyanus*, avaliando o tempo para eclosão, a ocorrência de larvas mal-formadas, o comprimento das larvas e o volume do saco vitelino logo após a eclosão e o tempo de sobrevivência destas larvas quando mantidas em inanição.

Estudar os efeitos da temperatura sobre o tempo de consumo de vitelo, a sobrevivência ao final da metamorfose, o crescimento e a ocorrência de juvenis mal-formados de *P. orbignyanus*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Reprodutores de linguado capturados na Praia do Cassino (Rio Grande – RS) por pescadores artesanais, através de redes de arrasto, foram levados para a Estação Marinha de Aquacultura – EMA (FURG), onde foram mantidos em tanques de 500 L a 21°C e aeração constante.

Para a obtenção das larvas, foram coletados gametas de dois machos e uma fêmea através de pressão abdominal. Antes, porém, a fêmea foi submetida a uma biópsia para a determinação do estágio de desenvolvimento gonadal e, ao serem verificados oócitos maiores que 350 µm, esta foi induzida à ovulação com uma única injeção do hormônio HCG na dose de 250 UI/Kg (Robaldo *et al.*, 2003). Os espermatozóides foram ativados com água do mar e misturados aos óvulos para a realização da fertilização artificial que aconteceu a 21°C.

A partir do momento em que foram observadas segmentações de duas a quatro células, os ovos foram distribuídos em doze vasilhas de dois litros contendo água na mesma temperatura da água utilizada no processo de fertilização com aeração constante. Estas vasilhas foram colocadas em banho termostatizado em tanques de 100 L e transferidas sucessivamente para temperaturas inferiores ou superiores (3°C por hora) até atingirem as temperaturas desejadas: 14, 17, 20, 23, 26 e 29°C. No final da transferência ficaram duas vasilhas em cada tanque de 100 L. Para a manutenção das temperaturas de 14 e 17°C foi adicionado gelo, sempre que necessário, à água utilizada para o banho. As temperaturas de 20 a 29°C foram mantidas através de aquecedores submersíveis (300 Watts) equipados com termostato.

Para ajudar a manter as temperaturas dos tanques constantes, os testes foram realizados em uma sala com a temperatura controlada por ar-condicionado ajustado a aproximadamente 17°C. O fotoperíodo durante o experimento foi de 24 h de luz e a água utilizada durante todo o experimento foi previamente filtrada (5 µm) e armazenada em dois reservatórios de 200 L, uma sem e outra com aquecimento (29°C) para a preparação da água nas diferentes temperaturas.

3.1 - Efeitos da temperatura sobre ovos de *P. orbignyanus*

O período entre a fertilização e o início da eclosão das larvas em cada temperatura foi anotado e considerado como o tempo de eclosão.

Após a eclosão, foram coletadas amostras de 50 larvas para a determinação do percentual de indivíduos mal-formados em cada temperatura. Esta verificação foi feita através de lupa e foram consideradas defeituosas aquelas larvas que apresentaram deformidades na notocorda e/ou nadadeiras.

Imagens capturadas de 15 larvas com o auxílio de lupa, micro-câmera e vídeo foram digitalizadas pelo software “Pro Media” e utilizadas para as medições do comprimento padrão (desde a ponta do focinho até o final da notocorda) e do comprimento e da altura do saco vitelino e da gota de óleo através do software “Image Tool”, que foi calibrado por meio de fotos de um papel milimetrado. Tanto o saco vitelino como a gota de óleo desta espécie apresentaram um formato elíptico, assim para o cálculo de seus volumes, utilizou-se a fórmula de volume de uma elipsóide proposta por Blaxter & Hempel (1963):

$$V = \frac{\pi c a^2}{6}$$

onde “c” é o comprimento e “a” é a altura do saco vitelino ou da gota de óleo.

A qualidade das larvas também foi estimada pelo tempo em que 50% destas se mantiveram vivas em jejum. Para isto, 50 larvas recém-eclodidas nas diferentes temperaturas testadas foram distribuídas em pequenos potes plásticos contendo 500 ml de água com a mesma temperatura de origem das larvas, todos com três repetições, dispostos em banho termostaticado. Os potes ficaram desprovidos de aeração, porém cerca de 1/3 do volume foi trocado diariamente com água na mesma temperatura após a contagem dos indivíduos mortos.

3.2 - Efeitos da temperatura sobre larvas de *P. orbignyanus*

Para os testes de larvicultura, 500 larvas recém-eclodidas nas temperaturas 17, 20, 23 e 26°C foram distribuídas em tanques de 10 L com água na mesma temperatura providos de aeração constante, todos com quatro repetições, dispostos em banho

termostatizado. Foi utilizado o mesmo procedimento adotado nos tanques de 100 L para a manutenção das temperaturas.

Através do método citado anteriormente, foram feitas medidas do comprimento e da altura do saco vitelino a cada 12 horas em seis larvas de cada tanque para a determinação do volume do vitelo. Estas larvas foram devolvidas a seus tanques após as medições.

O acompanhamento do crescimento das larvas foi feito através da medida do comprimento padrão de 15 larvas a cada cinco dias até que todas atingissem o final da metamorfose. Após as medições, as larvas foram devolvidas a seus respectivos tanques.

No momento em que foi verificada a pigmentação dos olhos e a abertura da boca, ofereceu-se rotífero *Brachionus plicatilis* (10 – 20 rotíferos/ml) como alimentação. A cada seis horas as larvas foram monitoradas através de lupa para a observação de presas no trato digestivo e determinar o momento da primeira alimentação. Com o crescimento das larvas, passou-se a oferecer náuplio recém-eclodidos de *Artemia* sp. (2 – 4 *Artemia*/ml) no momento em que foi verificado que as larvas poderiam ingerir presas maiores. Foi adicionado aos tanques fitoplâncton (*Tetraselmis tetrathele*) na concentração de 20×10^4 células/ml para a alimentação dos rotíferos e a manutenção da qualidade da água.

A estimativa do percentual de juvenis em que não ocorreu a migração completa do olho direito em cada temperatura foi feita com imagens digitais.

Diariamente foi contado o número de rotíferos e/ou *Artemia* residual e o número de larvas mortas, sendo posteriormente o fundo dos tanques limpos com o uso de sifão. Após essa rotina, cerca de 50% do volume de água foi renovado com água na mesma temperatura e ajustado a densidade de rotífero, *Artemia* e fitoplâncton.

3.3 - Análise dos resultados

Para demonstrar os efeitos da temperatura sobre a incubação dos ovos, foi feito um ajuste com modelo quadrático.

O tratamento estatístico dos resultados foi feito através de Análise de Variância (Anova) ao nível de significância de 95% e quando houveram diferenças significativas foi aplicado o Teste de Tukey. Os dados estão apresentados como média e erro padrão.

4 - RESULTADOS

As temperaturas médias de cada tratamento ao longo do experimento, mantiveram-se próximas das temperaturas pré-determinadas: 14,3 ($\pm 0,3$), 17,4 ($\pm 0,1$), 19,8 ($\pm 0,1$), 23,4 ($\pm 0,1$), 26,4 ($\pm 0,1$) e 29,0°C ($\pm 0,1$).

4.1 - Efeitos da temperatura sobre ovos de *P. orbignyanus*

O tempo de eclosão foi inversamente proporcional à temperatura a que os ovos foram submetidos durante a incubação. A 29°C as larvas eclodiram 24 h após a fertilização, enquanto que a 14°C levaram 96 h. A equação quadrática descreve adequadamente a relação entre o tempo para eclosão e a temperatura (Figura 1).

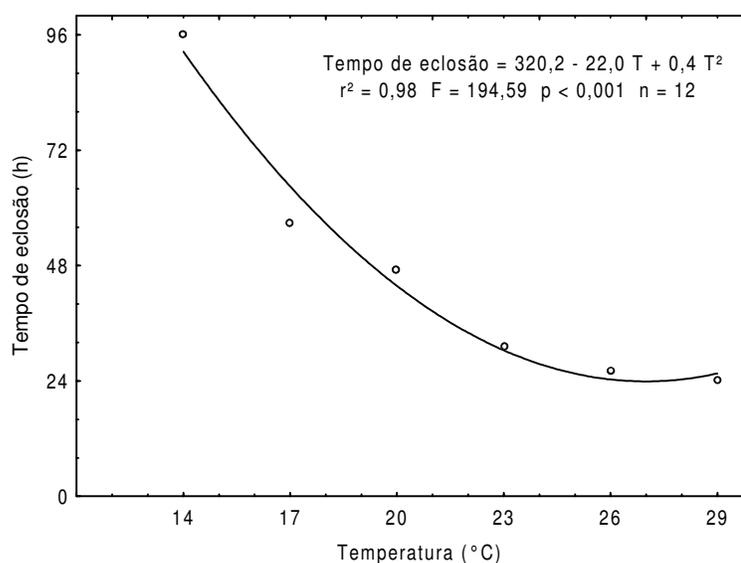


Figura 1. Efeito da temperatura sobre o tempo de eclosão das larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus*, incluindo o modelo de regressão quadrática, onde T = temperatura (°C).

Foi observado o efeito da temperatura sobre a incidência de larvas mal-formadas, especialmente sobre as larvas cujos ovos foram incubados nas temperaturas extremas (14,17 e 29°C). A ocorrência de larvas mal-formadas foi especialmente elevada a 14°C, onde todas as larvas eclodiram com má-formação nas nadadeiras e/ou na notocorda (Figura 2). A diferença entre uma larva recém-eclodida normal e uma mal-formada está apresentada na Figura 3.

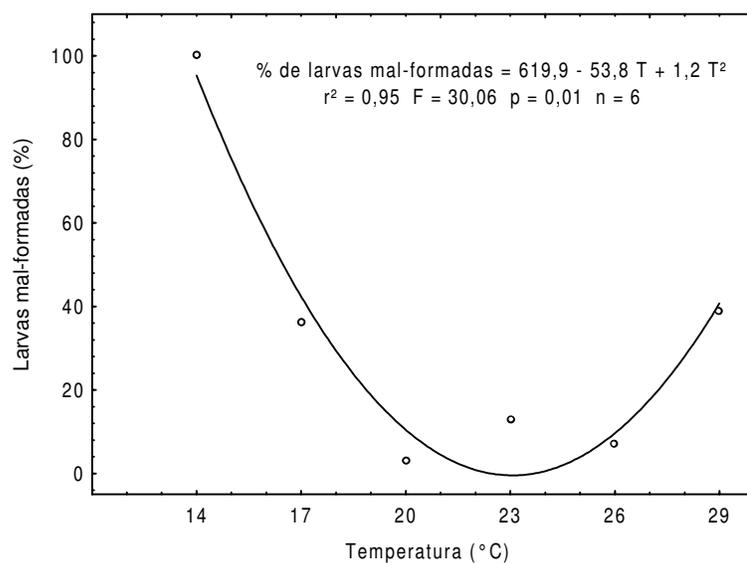


Figura 2. Efeito da temperatura durante a incubação sobre o percentual de larvas mal-formadas do linguado *Paralichthys orbignyanus*, incluindo o modelo de regressão quadrática, onde T = temperatura (°C).

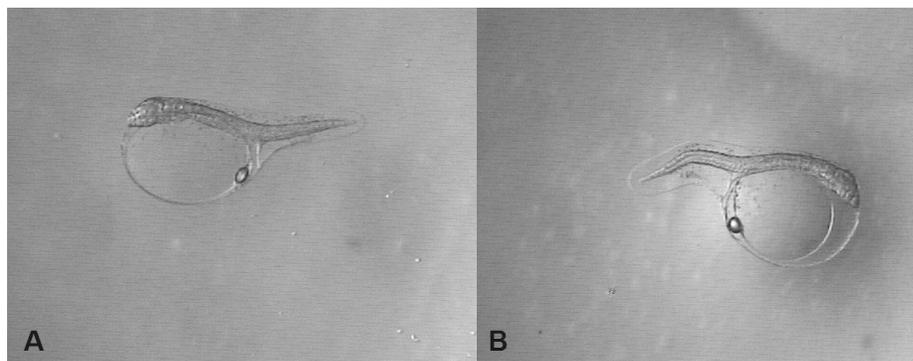


Figura 3. Larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* recém-eclodidas: larva normal (A) e larva com má-formação da notocorda (B).

Não foram observadas diferenças significativas do comprimento padrão das larvas eclodidas entre 17 e 29°C ($P>0,05$), oscilando entre 1,76 mm ($\pm 0,03$) a 29°C e 1,81 mm ($\pm 0,02$) a 26°C. Entretanto, quando os ovos foram incubados a 14°C, as larvas eclodiram significativamente menores do que todas as outras ($1,58 \pm 0,04$ mm) ($P<0,05$). A grande variação entre o comprimento das larvas em uma mesma temperatura não permitiu que fosse observado um fator de correlação elevado para o modelo quadrático, mas de qualquer maneira, o valor elevado de F fez com que o modelo fosse significativo ($P<0,001$) (Figura 4).

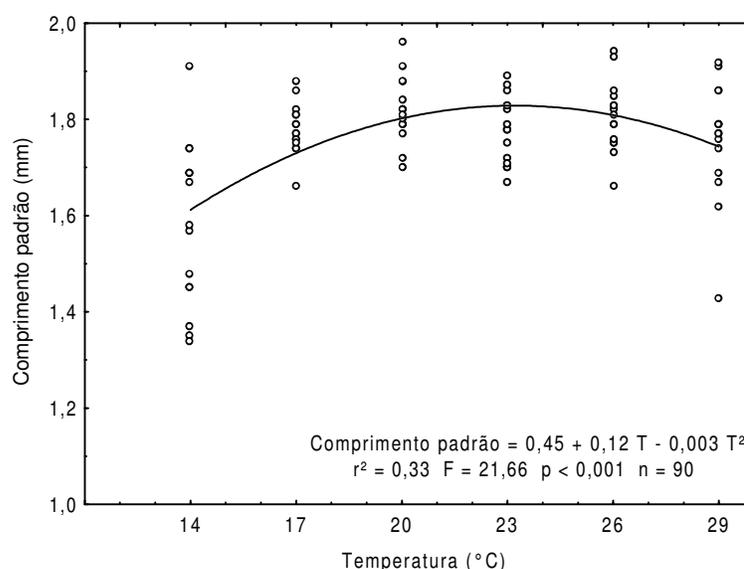


Figura 4. Comprimento padrão das larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* eclodidas em diferentes temperaturas, incluindo o modelo de regressão quadrática, onde T = temperatura (°C).

Não foi observada diferença significativa entre o volume do saco vitelino das larvas eclodidas a 14 e 17°C ($P>0,05$), mas para as temperaturas mais elevadas foi observada uma relação inversamente proporcional com o volume do saco vitelino. A relação entre o volume do vitelo e a temperatura foi descrita por um modelo quadrático (Figura 5).

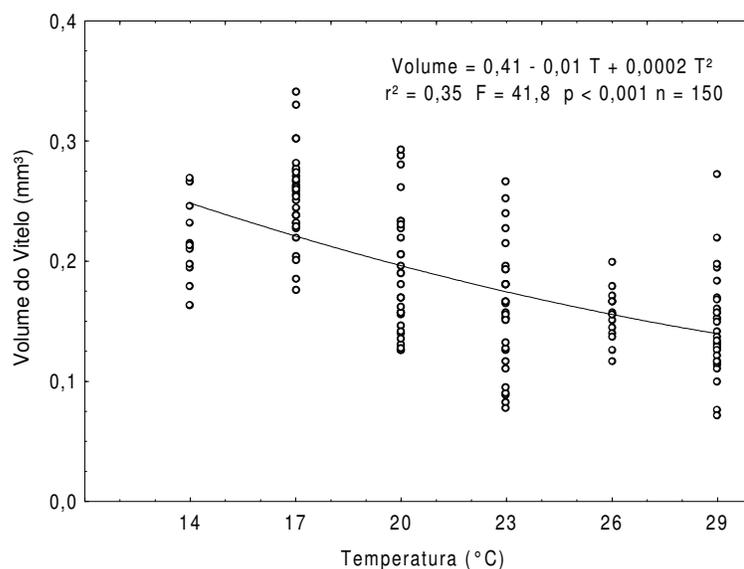


Figura 5. Volume do saco vitelino das larvas de linguado *Paralichthys orbignyanus* eclodidas em diferentes temperaturas, incluindo o modelo de regressão quadrática, onde T = temperatura (°C).

O volume médio da gota de óleo das larvas recém-eclodidas ficou em torno de 0,001 mm³ ($\pm 0,000$) em todos os tratamentos, não ocorrendo diferença significativa entre eles ($P > 0,05$).

Logo no primeiro dia houve uma mortalidade de 50% das larvas mantidas em inanição nos tratamentos de 14 e 29°C. Este percentual de mortalidade foi atingido no terceiro dia de cultivo a 17°C e no quarto dia a 20 e 26°C. As larvas mantidas a 23°C foram as que suportaram por mais tempo as condições de inanição, sendo apenas no sexto dia observada uma mortalidade de 50% (Figura 6).

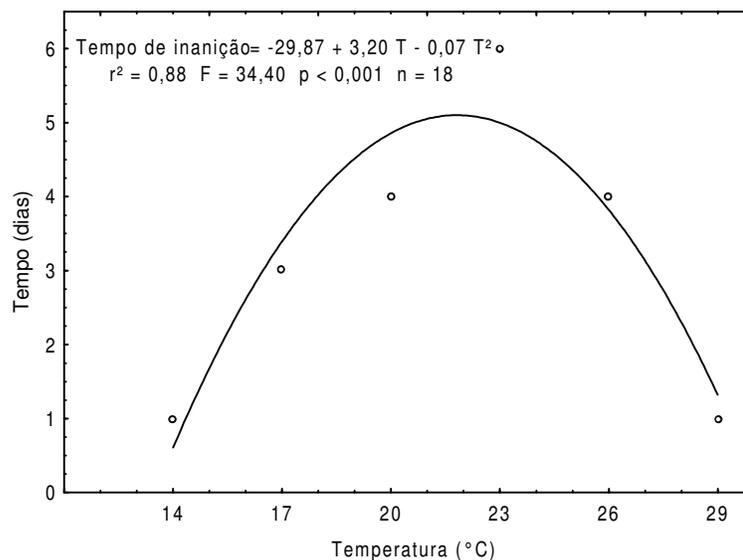


Figura 6. Tempo para 50% de mortalidade das larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* mantidas em inanição em diferentes temperaturas, incluindo o modelo de regressão quadrática, onde T = temperatura (°C).

4.2 - Efeitos da temperatura sobre larvas de *P. orbignyanus*

Como foi visto anteriormente, as larvas em temperaturas mais elevadas eclodiram com o volume de vitelo menor (Figura 5). A absorção do vitelo continuou mais acelerada após a eclosão em temperaturas elevadas (Figura 7). Não houve diferença significativa no volume de vitelo nas temperaturas 26 e 23°C ao longo do experimento ($P > 0,05$), porém foi constatado que o vitelo se esgotou em 48 h na primeira e em 60 h na segunda. A absorção total do vitelo a 20°C ocorreu 72 h após a eclosão e 96 h a 17°C.

Foi observado que o desenvolvimento larval foi mais acelerado nas temperaturas mais elevadas (Tabela 1). O comprimento padrão das larvas no momento da exaustão do vitelo foi significativamente menor a 17°C do que nos demais tratamentos (Tabela 2).

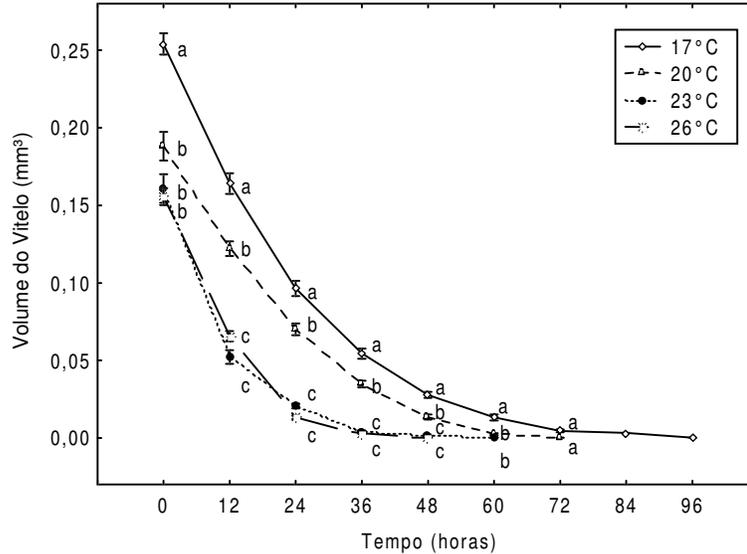


Figura 7. Volume do vitelo (média \pm EP) após a eclosão em larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivados em diferentes temperaturas (n = 18).

Tabela 1. Período de tempo (dias) entre a eclosão e a ocorrência de diferentes fases durante o desenvolvimento larval do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivado em diferentes temperaturas.

Desenvolvimento larval	Temperatura (°C)			
	17	20	23	26
Pigmentação dos olhos e abertura da boca *	4	3	2	2
Exaustão do vitelo **	4	3	2	2
Ingestão de rotífero *	8	6	4	4
Ingestão de náuplio de <i>Artemia</i> *	—	19	15	11
Assentamento das larvas	—	26	16	15
Final da metamorfose	—	35	20	20

*(n = 10); **(n = 18)

No décimo segundo dia de cultivo foi observado 100% de mortalidade das larvas mantidas a 17°C. A sobrevivência obtida ao final da metamorfose a 20°C foi de 2,1% ($\pm 0,4$), significativamente menor ($P < 0,05$) que as sobrevivências obtidas a 23 e 26°C, 11,7 ($\pm 0,9$) e 11,7 ($\pm 1,0$), respectivamente (Figura 8).

O comprimento das larvas mantidas a 26°C, ao atingirem o final da metamorfose, foi de 9,02 mm ($\pm 0,11$), significativamente maior ($P < 0,05$) que o daquelas mantidas a 23°C, 8,23 mm ($\pm 0,07$) (Figura 9). As larvas mantidas a 20°C chegaram a 9,29 mm ($\pm 0,15$) no final da metamorfose, não havendo diferença significativa com o tratamento a 26°C ($P > 0,05$) (Tabela 2), porém na temperatura mais baixa o desenvolvimento larval foi muito mais lento (Tabela 1).

Tabela 2. Média (\pm EP) do comprimento padrão (mm) das larvas de *Paralichthys orbignyana* durante diferentes fases de desenvolvimento em diferentes temperaturas.

Fases	Temperatura (°C)			
	17	20	23	26
Eclosão*	1,78 \pm 0,01 ^a	1,81 \pm 0,02 ^a	1,78 \pm 0,02 ^a	1,81 \pm 0,02 ^a
Exaustão do Vitelo**	2,63 \pm 0,05 ^b	2,78 \pm 0,04 ^a	2,77 \pm 0,02 ^a	2,69 \pm 0,02 ^{ab}
Final da metamorfose	—	9,29 \pm 0,15 ^a	8,23 \pm 0,07 ^b	9,02 \pm 0,11 ^a

Letras diferentes indicam diferenças significativas em cada estágio larval. *(n = 15); ***(n = 18).

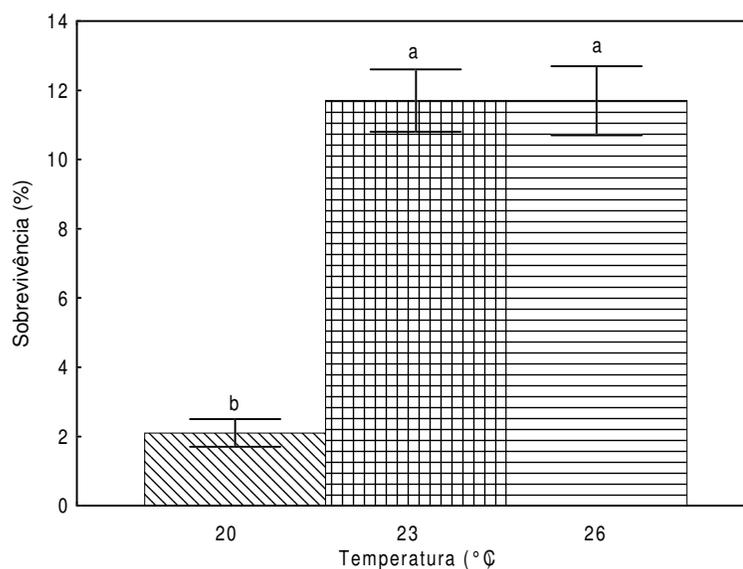


Figura 8. Sobrevivência (média \pm EP, n = 4) de larvas do linguado *Paralichthys orbignyana* ao atingirem o final da metamorfose em diferentes temperaturas.

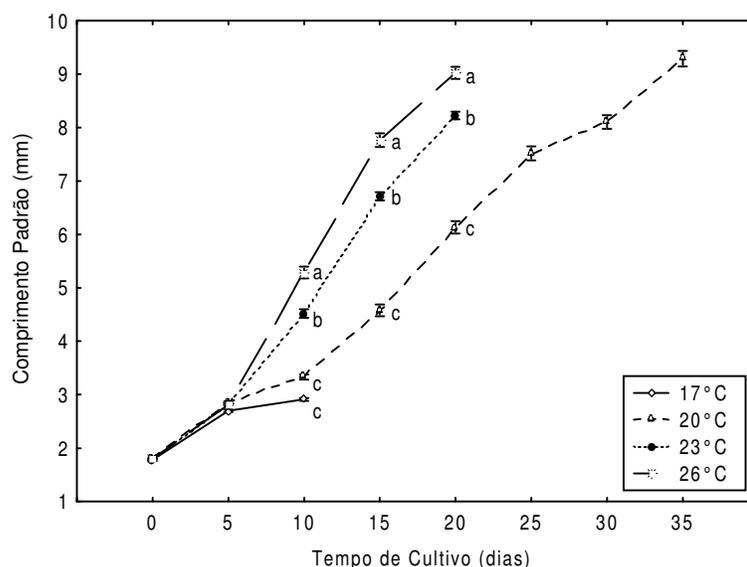


Figura 9. Comprimento padrão (média \pm EP, n = 60) de larvas do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivados em diferentes temperaturas.

O percentual de indivíduos em que o olho direito não migrou totalmente para o lado esquerdo da cabeça durante a metamorfose, resultando em juvenis defeituosos, foi significativamente maior a 26°C ($P < 0,05$) quando comparado com os outros tratamentos, chegando a 59%. No tratamento a 20°C este índice foi de 21%, e a 23°C foi de 17% (Figura 10). Também foi notada a presença de indivíduos em que o olho esquerdo migrou para o lado direito da cabeça, o percentual de indivíduos destros foi de 14% a 23 e 26°C e 31% a 20°C. A Figura 11 mostra o aspecto de um juvenil normal, um destro e um mal-formado.

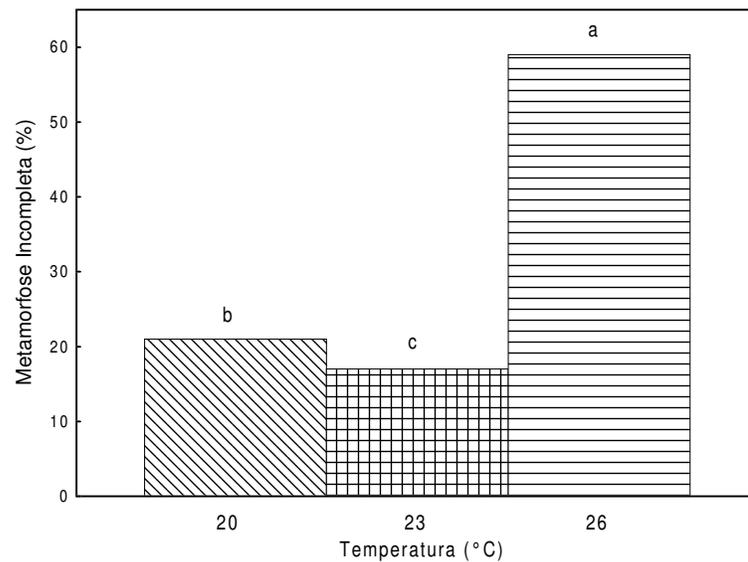


Figura 10. Percentual de metamorfose incompleta em *Paralichthys orbignyanus* ocorrida durante a passagem do estágio larval para juvenil (20°C n = 29; 23°C n = 42; 26°C n = 59).



Figura 11. Juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*: (A) normal; (B) destro; (C) com migração incompleta do olho.

5 - DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram a influência da temperatura sobre o desenvolvimento de ovos e de larvas de *P. orbignyanus*.

Desde que os ovos sejam incubados dentro dos limites ecológicos para a espécie, temperaturas elevadas aceleram os processos biológicos, resultando em um período de incubação menor que os observados em temperaturas mais baixas (Lasker, 1964). De fato, o período de incubação dos ovos neste trabalho foi menor em temperaturas elevadas. Isto também foi observado em outras espécies de linguado como *P. americanus* (Rogers, 1976), *L. ferruginea* (Laurence e Howell, 1981) e *P. olivaceus* (Cavalli *et al.*, 1997).

Independentemente da temperatura, as larvas recém-eclodidas apresentaram as características descritas por Cerqueira (1997) para esta espécie: uma única nadadeira envolvendo o tronco e a cauda, olhos não-pigmentados, ausência de boca e trato digestivo não-funcional. Cavalli *et al.* (1997) observaram estas mesmas características para larvas recém-eclodidas do linguado *P. olivaceus*. Estes autores mencionam que a eclosão de larvas com seus órgãos ainda em formação é uma característica de muitos peixes marinhos que liberam ovos pelágicos.

Com exceção das larvas cujos ovos foram incubados a 14°C, o comprimento de *P. orbignyanus* após a eclosão é independente da temperatura, sugerindo uma independência na eficiência de conversão de vitelo em tecido, conforme já foi observado para *P. dentatus* (Johns & Howell, 1980) e *P. lethostigma* (van Maaren & Daniels, 2001), provavelmente como resultado de uma compensação fisiológica onde a quantidade de vitelo necessária para o metabolismo total, em relação à quantidade de vitelo convertida em tecido permanece constante, na faixa de temperatura considerada. Por outro lado, Cavalli *et al.* (1997) observaram diferenças no comprimento das larvas de *P. olivaceus* no momento da eclosão e na exaustão do vitelo.

Todas as larvas eclodidas a 14°C apresentaram grandes deformações pelo corpo, mostrando-se incapazes de sobreviver por mais tempo. Também foram observados altos percentuais de larvas mal-formadas nas temperaturas 17 e 29°C. Robaldo (2003) também constatou um alto índice de larvas com má-formação quando ovos de *P.*

orbignyanus foram incubados a 29°C. Nas temperaturas de incubação entre 20 e 26°C foram registrados os menores percentuais de larvas mal-formadas.

A maior tolerância à inanição permite inferir que as larvas eclodidas a 23°C possuíam uma melhor qualidade que as demais, pois suas reservas se extinguíram em 60 h (Figura 6) e apenas no sexto dia de cultivo é que houve 50% de mortalidade das larvas mantidas em inanição. Johns *et al.* (1981) afirmam que dentro de uma faixa de tolerância, geralmente o vitelo é convertido em tecido com maior eficiência em temperaturas intermediárias, gerando larvas mais fortes e capazes de tolerar o jejum por mais tempo (Blaxter & Hempel, 1963). As larvas que eclodiram nas duas temperaturas extremas apresentaram 50% de mortalidade logo no primeiro dia após a eclosão, mesmo com o vitelo não sendo totalmente consumido. A mortalidade das larvas antes da absorção do vitelo provavelmente se deve a problemas de desenvolvimento relacionados com a qualidade dos ovos (Burke *et al.*, 1999) ou pelo efeito deletério direto provocado por estas temperaturas extremas (14 e 29°C).

Assim como no desenvolvimento embrionário, a temperatura teve influência sobre o desenvolvimento larval, sendo mais acelerado em temperaturas elevadas. O desenvolvimento larval até o final da metamorfose também foi mais acelerado em temperaturas mais elevadas em *P. olivaceus* (Seikai *et al.*, 1986) e *P. americanus* (Laurence, 1975). Isto pode ser interessante em sistemas de cultivo, desde que não influa na qualidade das larvas, pois a redução do período de larvicultura poderia diminuir os custos de produção, além de proporcionar um melhor aproveitamento das instalações.

Houve uma elevada mortalidade das larvas durante o experimento. As larvas mantidas a 17°C não atingiram o final da metamorfose e a 20°C a sobrevivência foi de 2,1% durante este estágio. A sobrevivência ao final da metamorfose foi melhor em 23 e 26°C, sendo de 11,7%. A elevada mortalidade observada no cultivo de *P. orbignyanus* até atingir a metamorfose não é exclusiva desta espécie, pois nos primeiros ensaios para o cultivo de *P. dentatus*, Smigielski (1975) observou mortalidade de 90 a 95% durante a fase de primeira alimentação. Benetti (1997) também observou elevada mortalidade (95%) na produção de juvenis de *P. woolmani*, que pode ser reflexo da baixa qualidade dos ovos e da condição nutricional dos reprodutores.

A exemplo de *P. olivaceus* (Seikai *et al.*, 1986), temperaturas elevadas aceleram o desenvolvimento de *P. orbignyanus*. Entretanto, apesar do tempo para completar a metamorfose ser igual em 23 e 26°C, existe um efeito diretamente proporcional da temperatura sobre o comprimento dos juvenis nestas duas temperaturas.

A temperatura mais elevada pode ter prejudicado a metamorfose das larvas. Isto pôde ser constatado pelo alto índice de juvenis em que a migração do olho direito a 26°C não foi completa. Esta proporção foi bastante baixa nas temperaturas 20 e 23°C. Ao contrário, Burke *et al.* (1999) verificaram que a temperatura não influi sobre a incidência de anormalidades na migração do olho de *P. dentatus*, que variou entre 0 e 3,5%.

O percentual de juvenis destros a 20°C foi praticamente o dobro das outras temperaturas. Observações posteriores nos permitem supor que, sob condições de cultivo, tanto indivíduos destros como mal-formados crescem como os linguados normais. Porém, os linguados defeituosos poderiam sofrer rejeição por parte do consumidor, nesse caso teriam que ser comercializados na forma de filé.

Os resultados destes estudos mostram que a faixa de temperatura testada extrapola o intervalo ótimo para a incubação de ovos de *P. orbignyanus*. Foi verificada uma elevada incidência de deformidades para larvas recém-eclodidas nas temperaturas extremas testadas (14, 17 e 29°C). Entretanto, Cerqueira *et al.* (1997) obtiveram taxas de eclosão entre 10 e 90% trabalhando com temperaturas entre 16 e 19°C, portanto seria interessante avaliar o efeito da temperatura a que os reprodutores estão expostos durante a maturação dos gametas sobre a temperatura ideal para o desenvolvimento inicial de *P. orbignyanus*. Buckley *et al.* (1990) sugerem um efeito da temperatura de aclimação dos reprodutores sobre o comprimento das larvas de *P. americanus* ao eclodir.

A temperatura de 17°C também deve ser evitada durante a larvicultura de *P. orbignyanus*, já que as larvas morreram apenas 12 dias após a eclosão. Mortalidade elevada também é observada na temperatura de 20°C e esta temperatura também deve ser desconsiderada para a larvicultura. A temperatura de 23°C parece ser mais adequada para a produção de larvas, pois apesar dos juvenis serem menores do que aqueles cultivados a 26°C, o tempo que eles levam para completar a metamorfose é o mesmo e sua sobrevivência é semelhante, e mais importante, a incidência de deformidades após a metamorfose é bem menor a 23°C. Observações complementares feitas após o

encerramento deste experimento mostraram que ao completarem a metamorfose os juvenis podem ser cultivados a 26°C sem problema.

Robaldo (2003) obteve desovas naturais de *P. orbignyana* a 23°C e Sampaio *et al.* (2003) obtiveram boas taxas de sobrevivência e crescimento das larvas oriundas destas desovas.

6 - CONCLUSÃO

Levando em consideração a capacidade de obter desovas naturais e a boa performance de ovos e larvas a 23°C, sugere-se que esta temperatura seja utilizada para o desenvolvimento inicial de *P. orbignyana*. Desse modo, é possível padronizar a temperatura da água do laboratório para a produção de alevinos de linguado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ANDRADE, H. A. 1996. Distribuição, Abundância Relativa e Migração do *Katsuwonus pelamis* (Scombridae) em Relação à Temperatura Superficial do Mar e à Dinâmica Oceanográfica na Costa Sudeste-Sul do Brasil. Rio Grande, FURG. 148p. (Dissertação de Mestrado).
- BENETTI, D. D. 1997. Spawning and Larval Husbandry of Flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific Yellowtail (*Seriola mazatlana*), New Candidate Species for Aquaculture. *Aquaculture*, **155**: 307-318.
- BENETTI, D. D.; VENIZELOS, A. & ACOSTA, C. 1994. Finfish Aquaculture Development in Ecuador. *World Aquaculture*, **25**: 18-25.
- BIANCHINI, A.; WASIELESKY, W. JR. & MIRANDA, K. C. 1996. Toxicity of Nitrogenous Compounds to Juveniles of Flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**: 453-459.
- 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.
- BUCKLEY, L. J.; SMIGIELSKI, A. S.; HALAVIK, T. A. & LAURENCE, G. C. 1990. Effects of Water Temperature on Size and Biochemical Composition of Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus* at Feeding Initiation. *Fish. Bull.*, **88**: 419-428.
- BURKE, J. S.; SEIKAI, T.; TANAKA, Y. & TANAKA, M. 1999. Experimental Intensive Culture of Summer Flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*, **176**: 135-144.
- 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).

- CAVALLI, R. O.; KASHIWAGI, M. & IWAI, T. 1997. Yolk Utilization and Growth of Larvae of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* at Different Temperatures. *Bulletin of Faculty of Bioresources*, **19**: 13-20.
- CERQUEIRA, V. R. 1997. Desenvolvimento do Ovo e da Larva do Linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) em Cultivo. Manuscrito, 32p.
- CERQUEIRA, V. R.; MIOSO, R.; MACCHIAVELLO, J. A. G. & BRUGGER, A. M. 1997. Ensaio de Indução de Desova do Linguado (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). *B. Inst. Pesca*, **24 (especial)**: 247-254.
- FIGUEIREDO, J. L. & MENEZES, N. A. 2000. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. *Museu de Zoologia / USP*. São Paulo, 116p.
- FUKUDA, M.; SAKO, H.; SHIGETA, T. & SHIBATA, R. 2002. Effects of Body Size and Temperature on the Relationship between Growth and Ration of Young Japanese Flounder, Based on Laboratory Experiments. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **4**: 11-18.
- FUSHIMI, H. 2001. Production of Juvenile Marine Finfish for Stock Enhancement in Japan. *Aquaculture*, **200**: 33-53.
- HAIMOVICI, M.; MARTINS, A. S. & VIEIRA, P. C. 1996. Distribuição e Abundância de Teleosteos Demersais sobre a Plataforma Continental do Sul do Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, **56**: 27-50.
- HART, P. R. & PURSER, G. J. 1995. Effects of Salinity and Temperature on Eggs and Yolk Sac Larvae of the Greenback Flounder (*Rhombosolea tapirina* Günter, 1862). *Aquaculture*, **136**: 221-230.
- HOWELL, W. H. 1980. Temperature Effects on Growth and Yolk Utilization in Yellowtail Flounder, *Limanda ferruginea*, Yolk-Sac Larvae. *Fish. Bull.*, **78 (3)**: 731-739.
- JENKINS, W. E.; SMITH, T. I. J.; SULLIVAN, C. V. & BERLINSKY, D. L. 1997. Production of Southern Flounder *Paralichthys lethostigma* Juveniles in an Outdoor Nursery Pond. *Journal of the Aquaculture Society*, **28**: 211-214.

- JOHNS, D. M. & HOWELL, W. H. 1980. Yolk Utilization in Summer Flounder (*Paralichthys dentatus*) Embryos and Larvae Reared at Two Temperatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **2**: 1-8.
- JOHNS, D. M.; HOWELL, W. H. & KLEIN-MACPHEE, G. 1981. Yolk Utilization and Growth to Yolk-Sac Absorption in Summer Flounder (*Paralichthys dentatus*) Larvae at Constant and Cyclic Temperatures. *Marine Biology*, **63**: 301-308.
- LASKER, R. 1964. An Experimental Study of the Effects of Temperature on the Incubation Time, Development, and Growth of Pacific Sardine Embryos and Larvae. *Copeia* 1964, 399-405.
- LAURENCE, G. C. 1975. Laboratory Growth and Metabolism of the Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus* from Hatching through Metamorphosis at Three Temperatures. *Marine Biology*, **32**: 223-229.
- LAURENCE, G. C. & HOWELL, W. H. 1981. Embryology and Influence of Temperature and Salinity on Early Development and Survival of Yellowtail Flounder *Limanda ferruginea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **6**: 11-18.
- LOUZADA, L. R.; SAMPAIO, L. A.; OKAMOTO, M. & ROBALDO, R. 2002. Crescimento e Sobrevivência Larval do Linguado *Paralichthys orbignyanus* Cultivado em Diferentes Fotoperíodos. In: *XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Goiânia, GO. Resumos. p. 51.
- OKAMOTO, M.; SAMPAIO, A. L.; ROBALDO, R. B. & LOUZADA, L. R. 2003. Effects of Salinity on Survival and Growth of Larvae of Brazilian Flounder *Paralichthys orbignyanus*. In: *World Aquaculture 2003*, Salvador, BA. Resumos. p. 676.
- ROBALDO, R. 2003. Estudo Comparativo da Reprodução do Linguado *Paralichthys orbignyanus* (VALENCIENNES, 1839) no Ambiente e em Cativeiro. Rio Grande, FURG. 200p. (Tese de Doutorado).
- ROBALDO, R.; SAMPAIO, L. A. & BIANCHINI, A. 2003. Induced Spawning of Brazilian Flounder *Paralichthys orbignyanus* Using Human Chorionic Gonadotropin – HCG. In: *World Aquaculture 2003*, Salvador, BA. Resumos. p. 634.

- ROGERS, B. A. & WESTIN, D. T. 1981. Laboratory Studies on Effects of Temperature and Delayed Initial Feeding on Development of Striped Bass Larvae. *American Fisheries Society*, **110**: 100-110.
- ROGERS, C. A. 1976. Effects of Temperature and Salinity on the Survival of Winter Flounder Embryos. *Fishery Bulletin*, **74**: 52-58.
- 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.; ROBALDO, R.; LOUZADA, L. R. & BIANCHINI, A. 2003. Natural Spawning and Larviculture of Brazilian Flounder *Paralichthys orbignyanus*. In: *World Aquaculture 2003*, Salvador, BA. Resumos. p. 675.
- SAMPAIO, L. A.; ROBALDO, R.; LOUZADA, L. R.; NAGATA, N. & BIANCHINI, A. 2001. Primeira Desova Induzida do Linguado *Paralichthys orbignyanus* no Rio Grande do Sul. In: *XIV Semana Nacional de Oceanografia*, Rio Grande, RS. Resumos. CD Rom.
- SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B.; BURKERT, D & BIANCHINI, A. 1998. Análise do Custo de Diferentes Anestésicos para o Linguado *Paralichthys orbignyanus*. In: *X Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Recife, PE. Resumos. p. 117.
- SEIKAI, T.; TANANGONAN, J. B. & TANAKA, M. 1986. Temperature Influence on Larval Growth and Metamorphosis of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in the Laboratory. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **52**: 977-982.
- SILVA, A. 2001. Advance in the Culture Research of Small-Eye Flounder, *Paralichthys microps*, and Chilean Flounder, *P. adspersus*, in Chile. *J. Appl. Aquaculture*, **11**: 147-164.
- SILVEIRA, M. P. M. 1999. Ciclo Reprodutivo e Desenvolvimento Ontogenético do Linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) do Sul do Brasil. Rio Grande, FURG. 122p. (Tese de Doutorado).
- SILVEIRA, M. P. M.; COUSIN, J. C. B. & HAIMOVICI, H. 1995. Estrutura Ovária e Testicular do Linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Atlântica*, **17**: 135-152.
- SMIGIELSKI, A. S. 1975. Hormonal-Induced Ovulation of Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Fish. Bull.*, **73**: 431-438.

- VAN MAAREN, C. C. & DANIELS, H. V. 2001. Effects of Temperature on Egg Hatch, Larval Growth and Metamorphosis for Hatchery-Cultured Southern Flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Journal of Applied Aquaculture*, **11**: 21-33.
- WASIELESKY JR., W. 1994. Tolerância do Linguado *Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes, 1839, (PLEURONECTIFORMES – PARALICHTHYIDAE), à Parâmetros Físico-Químicos. Rio Grande, FURG. 102p. (Dissertação de Mestrado).
- WASIELESKY JR., W.; BIANCHINI, A.; SANTOS, M. H. S. & POERSCH, L. H. 1997. Tolerance of Juvenile Flatfish *Paralichthys orbignyanus* to Acid Stress. *J. World Aquac. Soc.*, **28**: 202-204.
- WASIELESKY JR., W.; BIANCHINI, A. & MIRANDA, K. 1998. Tolerancia a la Temperatura de Juveniles de Lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Maritimo*, **17 (A)**: 43-48.
- WASIELESKY JR., W.; MIRANDA, K. & BIANCHINI, A. 1995. Tolerância do Linguado *Paralichthys orbignyanus* à Salinidade. *Arq. Biol. Tecnol.*, **38**: 385-395.
- WATANABE, W. O.; ELLIS, E. P.; ELLIS, S. & FEELEY, M. W. 1998. Progress in Controlled Maturation and Spawning of Summer Flounder *Paralichthys dentatus* Broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society*, **29**: 393-404.