



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE INDUÇÃO À DESOVA DO MARISCO
BRANCO *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854)**

NATHÁLIA BYRRO GAUTHIER

RIO GRANDE, RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE INDUÇÃO À DESOVA DO MARISCO BRANCO
Amarilladesma mactroides (Reeve, 1854)

NATHÁLIA BYRRO GAUTHIER

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: Dr. Ronaldo Olivera Cavalli

RIO GRANDE, RS

Fevereiro de 2020

Ficha Catalográfica

G276a Gauthier, Nathália Byrro.
Avaliação de técnicas de indução à desova do marisco branco
Amarilladesma mactroides (Reeve, 1854) / Nathália Byrro Gauthier. –
2020.
91 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS,
2020.
Orientador: Dr. Ronaldo Olivera Cavalli.

1. *Amarilladesma mactroides* 2. Reprodução 3. Aquicultura
I. Cavalli, Ronaldo Olivera II. Título.

CDU 591.613:594.1

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA 02/2020

DE DEFESA DA 189ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia dezessete de fevereiro de dois mil e vinte, às quinze horas, no Auditório da Estação Marinha de Aquacultura da FURG, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, da **NATHALIA BYRRO GAUTHIER**, orientada pelo Prof. Dr. Ronaldo Olivera Cavalli, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ronaldo Olivera Cavalli (orientador – IO/FURG), Prof. Dr. Luis Alberto Romano (IO/FURG), e o Prof. Dr. Gilberto Caetano Manzoni (UNIVALI - ITAJAÍ). Título da dissertação: “**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE INDUÇÃO À DESOVA DO MARISCO BRANCO *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854)**”. Dando início à defesa, o Coordenador Adjunto do PPGAq Prof. Dr. Geraldo Kipper Fóes, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Ronaldo Olivera Cavalli, que na qualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador em Exercício. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata a **NATHALIA BYRRO GAUTHIER** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pela candidata e pelo Coordenador do PPGAq.



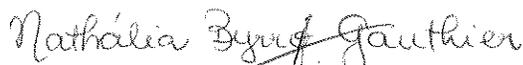
PROF. DR. RONALDO OLIVERA CAVALLI (ORIENTADOR – IO/FURG)



PROF. DR. LUIS ALBERTO ROMANO (IO/FURG)



PROF. DR. GILBERTO CAETANO MANZONI (UNIVALI- ITAJAÍ)



NATHALIA BYRRO GAUTHIER



PROF. DR. GERALDO KIPPER FÓES (Coordenador Adjunto do PPGAq)

ÍNDICE

Dedicatória	vi
Agradecimentos.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
Introdução.....	18
Objetivos.....	27
Material e métodos.....	27
Resultados.....	49
Discussão.....	70
Considerações Finais.....	79
Referências bibliográficas.....	80

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos três pilares da minha vida, aos meus pais Silvana e Cleber por terem abdicados dos seus sonhos para que eu realizasse os meus e por me apoiarem incondicionalmente nos momentos mais críticos desse processo, e ao meu marido Tory por ouvir minhas frustrações, pelas inúmeras vezes em que largou tudo para me ajudar a realizar esse sonho e por entender a minha ausência nesses últimos dois anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me amparado nos momentos difíceis e me dado forças para realizar esse trabalho, mesmo quando tudo parecia ir contra.

A minha família, em especial meus pais, Silvana e Cleber, por me amarem, apoiarem, acreditarem em mim e entenderem que a distância e ausência eram necessárias, e ao meu marido Tory Gauthier, por seu companheirismo, amor e por indiretamente ter mergulhado de cabeça comigo nesse trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG), aos órgãos de financiamento CNPQ e CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura pela acolhida e inúmeras oportunidades concedidas durante esses dois anos. Ao Projeto Camarão como um todo, aos laboratórios de Piscicultura Marinha, de Produção de Microalgas e de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos e seus respectivos professores por abrirem suas portas e cederem desde espaço físico a equipamentos para que essa dissertação acontecesse.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Olivera Cavalli, pela orientação, pela paciência, amizade, apoio e confiança.

Aos todos os professores do programa, uma eterna gratidão pela troca de conhecimento, seja em aula ou no corredor.

Aos amigos que fiz na famosa EMA, Joel, Stefani, Lídia, Daniel, Ane, Virgínia, Rafa e demais que ajudaram enormemente para que algumas das etapas fossem realizadas e fizeram dos meus dias mais alegres. Em especial, agradeço ao Juan Jethro, precursor desse desafio, pelo *insight* no trabalho, apoio e confiança.

Aos meus amigos (as) de vida Naiara, Kátia, Jones, Gleidson, Aura, Jamiri, Katiúscia, Aline Anjos, Bárbara, Lilian, Pâmela, Quinha, Christin e Andrej que perto ou longe deram apoio e contribuíram para a finalização desta etapa da minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Aquicultura de Bivalves, Filipe Scavone e Lucas Quaresma pela ajuda nas horas críticas e por terem compartilhado as alegrias e até as frustrações durante as coletas.

A todos e todas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, ouvindo as minhas reclamações, dando conselhos, rindo ou chorando, obrigada por acreditarem em mim.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia interna do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> (Coscarón, 1959).	26
Figura 2: Modelos de unidades experimentais testados para a manutenção em laboratório de exemplares do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) previamente ao início dos experimentos.	29
Figura 3: Disposição do sedimento arenoso na unidade experimental (A) e duas unidades experimentais estocadas com indivíduos do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no interior do tanque de manutenção (B).	30
Figura 4: Posição dos mariscos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no sedimento arenoso das unidades experimentais (A e B) e condição do sedimento após 14 dias de manutenção em laboratório (C).	32
Figura 5: Mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) com diferentes tipos de marcação: com caneta piloto permanente (A) e após 4 dias (B); com caneta piloto para retroprojektor (C) e após 4 dias (D); com esmalte de unhas (E) e após 2 dias (F), 7 dias (G) e 10 dias (H).	34
Figura 6: Figura 6: Mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) submetidos à diferentes tipos de marcação: (A) com caneta piloto permanente ou esmalte de unhas cobertos com adesivo bicomponente à base de resina epóxi (Araldite) no dia da marcação (imagens à esquerda) e após 7 dias (direita); e (B) com caneta piloto permanente ou esmalte de unhas com cobertura de cola instantânea à base de cianoacrilato (Super Bonder) no dia da marcação (esquerda) e após 7 dias (imagem superior à direita).	35
Figura 7: Exemplares do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) dispostos diretamente sobre o fundo do tanque e inseridos em tubos de PVC de 40 mm de diâmetro mantidos verticalmente em contato com o tanque.	36
Figura 8: Medidas de comprimento total (Lt) e altura total (Ht) coletadas de indivíduos do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>).	37
Figura 9: Tanque de manutenção e disposição das unidades experimentais utilizadas nos experimentos de condicionamento do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>). A direita da imagem pode se observar o resfriador utilizado para manter a temperatura em torno de em torno de 20,0°C.	40
Figura 10: Exemplares do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> do Experimento V (A) e VI (B) submetidos a diferentes tratamentos de indução à desova.	47

Figura 11: Tanque de 1.000 L utilizado para a manutenção dos baldes com mariscos branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) mantidos durante a noite (overnight) após as tentativas de indução à desova nos experimentos V e VI.....	47
Figura 12: Média do consumo total diário da dieta bialgal (<i>Isochrysis galbana</i> e <i>Chaetoceros muelleri</i>) estimado para cada indivíduo (cél.mL ⁻¹ .indivíduo ⁻¹) do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) durante os 14 dias do experimento I.	51
Figura 13: Média de consumo diário de <i>Chaetoceros muelleri</i> (cél.mL ⁻¹ .indivíduo ⁻¹) do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) durante o período experimental de 17 dias do experimento II.....	51
Figura 14: Média do consumo diário de <i>Chaetoceros muelleri</i> (cél.mL ⁻¹ .indivíduo ⁻¹) do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) durante o período experimental de 14 dias do experimento III.	51
Figura 15: Coleta de tecidos do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> realizada antes do condicionamento dos indivíduos no experimento II, onde verifica-se a presença de melanina na borda do manto.	54
Figura 16: Curva cumulativa de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando os grupos de mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) utilizados nos experimentos I, II e III em relação à duração do período experimental (dias).	56
Figura 17: Curva cumulativa de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando os grupos de mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) submetidos as temperaturas de 23, 25, 26, 27 ou 29°C nos experimentos I, II e III em relação à duração do período experimental (dias).	56
Figura 18: Secção histológica da gônada de um macho do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) do experimento I após 14 dias de condicionamento.	57
Figura 19: Secções histológicas de tecidos do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) amostrados no início do experimento II: (A) gônada de uma fêmea com ovócitos residuais e imaturos no estágio 6, ou de desova total e (B) macho no estágio 7, ou de repouso sexual.....	57
Figura 20: Secção histológica da gônada de fêmea do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) após o período de condicionamento no experimento II, onde podem ser observados ovócitos imaturos de formato peduncular e aderidos à parede (OI), alguns ovócitos maduros poligonais (OPM) e ovócitos residuais (OR).	58
Figura 21: Secções histológicas de machos do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no estágio 5 de maturação sexual após o período de condicionamento (14	

dias) no experimento II, onde podem ser observadas espermatogônias e espermátides maduras.....	58
Figura 22: Secção histológica de macho do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no estágio 5 de maturação sexual após o período de condicionamento (14 dias) no experimento II, onde podem ser observados espermatozoides maduros, espermátides e espermatogônias maduras.....	59
Figura 23: Secção histológica da gônada de fêmea do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no estágio 3 no início do experimento III, onde podem ser observados ovócitos imaturos (OI) e vários ovócitos maduros poligonais (OPM).	60
Figura 24: Secção histológica de macho do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no estágio 3 de maturação sexual amostrados no início do experimento III, onde podem ser observados espermatozoides radiais (spz) dentro do folículo e ninhos de espermátócitos (ns).	60
Figura 25: Secção histológica de fêmea de marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no estágio 4 de maturação sexual após 14 dias de condicionamento em laboratório e antes da exposição ao choque térmico no experimento III.	61
Figura 26: Presença de zigotos fertilizados no tanque de manutenção após 18 h dos mariscos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) terem sido expostos ao estímulo de variação abrupta de temperatura associado à adição de extrato de espermatozoides.	63
Figura 27: Presença de larva véliger (tipo “D”) no tanque de manutenção das larvas 48 h após os adultos de <i>Amarilladesma mactroides</i> terem sido expostos a variação abrupta de temperatura associado à adição de extrato de espermatozoides.	63
Figura 28: Estágio de desova parcial (Estágio 5) com ovócitos maduros poligonais livres (OM) e ovócitos em degradação (OD) de uma fêmea do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> do Experimento IV sem condicionamento expostos ao choque térmico associado a adição extrato de espermatozoides.	63
Figura 29: Estágio de desova parcial de macho de <i>Amarilladesma mactroides</i> do Experimento IV sem condicionamento expostos ao choque térmico associado a adição de extrato de espermatozoides.....	64
Figura 30: Sobrevivência (%) de <i>Amarilladesma mactroides</i> 18 h após a indução à desova utilizando os tratamentos Temp (choque de temperatura de 22 para 25,5°C), Esperm (choque de temperatura associado à adição de extrato de espermatozoides); Salin (choques de temperatura e de salinidade 28 para 35); e pH+perox (choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado).	65

Figura 31: Proporção (%) de diferentes estágios larvais do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) cerca de 66 h após a fertilização no tratamento de temperatura associada a pH alcalino e adição de peróxido de hidrogênio (5,5mμ) no experimento V.....	66
Figura 32: Estágio de desova parcial (Estágio 5) com ovócitos maduros poligonais livres (OPM) e ovócitos arredondados residuais (OR) de uma fêmea de <i>Amarilladesma mactroides</i> antes de ser exposta a um dos tratamentos de indução à desova do experimento V.....	67
Figura 33: Secção histológica de macho do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> no estágio de desova parcial (estágio 5) do experimento V antes de ser exposto a um dos tratamentos de indução à desova.	67
Figura 34: Taxa de sobrevivência (%) de exemplares de <i>Amarilladesma mactroides</i> do experimento VI 18 h após a exposição aos tratamentos de indução à desova (Temp = choque de temperatura de 22 para 26°C; pH = idem ao anterior associado ao aumento do pH para 9,15; H ₂ O ₂ = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio; pH+ H ₂ O ₂ = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado).....	68
Figura 35: Densidade (indivíduos.L ⁻¹) de ovócitos liberados por fêmeas de <i>Amarilladesma mactroides</i> submetidas a diferentes tratamentos de indução à desova: choque de temperatura de 22°C para 26°C (“Temp”); choque de temperatura de 22 para 26°C associada ao pH 9,13 (“pH”); choque de temperatura associado peróxido de hidrogênio (“H ₂ O ₂ ”); e ao choque de temperatura associado à exposição ao peróxido de hidrogênio em pH alcalino (“pH + H ₂ O ₂ ”).	69
Figura 36: Secção histológica de fêmea de <i>Amarilladesma mactroides</i> em estágio de desova parcial (Estágio 5) com poucos ovócitos maduros poligonais livres e maior quantidade de ovócitos arredondados antes de ser exposta a um dos tratamentos de indução à desova do experimento V.	70
Figura 37: Secção histológica de macho do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> no estágio de desova parcial (estágio 5) do experimento VI antes de ser exposto a um dos tratamentos de indução à desova.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de microalgas com resultados mais consistentes no condicionamento e maturação sexual de reprodutores de moluscos bivalves.....	21
Tabela 2: Médias (\pm DP) iniciais e finais de peso úmido (g), comprimento total (mm) e largura total (mm) dos mariscos brancos <i>Amarilladesma mactroides</i> utilizados no pré-teste que avaliou a adaptação dos mesmos às unidades experimentais durante 14 dias. 31	
Tabela 3: Variação da temperatura ($^{\circ}$ C) da água dos baldes e no interior do sedimento arenoso a cada intervalo de 5 min durante 30 min em três unidades experimentais (UE).	33
Tabela 4: Data e local das coletas, número de indivíduos coletados (n), comprimento total médio (\pm DP; mm), temperatura ($^{\circ}$ C) e salinidade da água nas coletas de marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) nas praias do Cassino, Rio Grande, RS, e Mar Grosso, São José do Norte, RS, para utilização nos seis experimentos de indução à desova com condicionamento (Experimentos I, II e III) e sem condicionamento em laboratório (Experimentos IV, V e VI).	39
Tabela 5: Classificação dos estágios de desenvolvimento das gônadas do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) adaptada de Masello (1987) e Hermann et al. (2009).....	43
Tabela 6: Médias (\pm DP) das variáveis de qualidade de água nos três experimentos com condicionamento do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> com duração de 14 a 18 dias.	50
Tabela 7: Médias (\pm DP) de comprimento inicial (CTi) e final (CTf), peso úmido inicial (PUi) e final (PUf), largura inicial (Li) e final (Lf) e peso seco final (PSf) dos exemplares de marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) mantidos a 20° C por 14 dias e expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 26 ou 29° C) no experimento I.	52
Tabela 8: Média (\pm DP) do comprimento total inicial (CTi) e final (CTf), peso úmido inicial (PUi) e final (PUf), largura inicial (Li) e final (Lf) e peso seco final (PSf) dos mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 26 ou 29° C) no experimento II.	53
Tabela 9: Médias (\pm DP) do comprimento total inicial (CTi) e final (CTf), peso úmido inicial (PUi) e final (PUf), largura inicial (Li) e final (Lf) e peso seco final (PSf) dos mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 25 e 27° C) no experimento III.	54
Tabela 10: Taxas de sobrevivência (S; %) e médias (\pm DP) do peso úmido inicial e final (PUi e PUf; g), comprimento total inicial e final (CTi e CTf; mm), largura inicial e final	

(Li e Lf; mm), peso seco inicial e final (PSi e PSf; g), índice de condição final (Cif) e fator de condição inicial e final (CFi e CFf) dos mariscos brancos (<i>Amarilladesma mactroides</i>) mantidos em laboratório por, pelo menos, 14 dias e expostos à choques de diferentes temperaturas nos experimentos I, II e III.	55
Tabela 11: Médias (\pm DP) dos diâmetros maiores (DM) e menores (dm) dos ovócitos das fêmeas do marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) no início e fim dos 14 dias de condicionamento nos experimentos II e III. Letras superscritas maiúsculas indicam diferenças significativas entre experimentos (Teste t-Student), enquanto as minúsculas indicam diferenças significativas entre DM ou dm em um mesmo experimento (ANOVA uma via).	61
Tabela 12: Médias (\pm DP) de comprimento total (CT), peso total (PT), largura total (LT), peso seco (PS) e fator de condição (CF) de exemplares de marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) sem serem condicionados e expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 25 ou 27°C) no Experimento IV.	62
Tabela 13: Médias (\pm DP) de comprimento total (CT), peso total (PT), largura total (LT), peso seco (PS) e fator de condição (CF) dos exemplares de marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) sem serem condicionados em laboratório e expostos à diferentes tratamentos (T = choque de temperatura de 22 para 25,5°C; T+E = idem ao anterior associado à adição de extrato de espermatozoides; T+S = choque de temperatura e de salinidade; T+P = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio) no Experimento V.	65
Tabela 14: Médias (\pm DP) de comprimento total (CT), peso total (PT), largura total (LT), peso seco (PS) e fator de condição (CF) dos exemplares de marisco branco (<i>Amarilladesma mactroides</i>) sem serem condicionados em laboratório e expostos à diferentes tratamentos (T = choque de temperatura de 22 para 26°C; T+pH = idem ao anterior associado ao aumento do pH para 9,15; T+P = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio; T+pH+P = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado no experimento VI.	67
Tabela 15: Médias (\pm DP) dos diâmetros maior (DM) e menor (dm) de ovócitos de fêmeas de <i>Amarilladesma mactroides</i> dos experimentos IV, V e VI antes de serem submetidas aos diferentes métodos de indução à desova. Letras superscritas indicam diferenças significativas em cada coluna (ANOVA uma via).	70

Resumo

O marisco branco é um bivalve marinho distribuído nas praias atlânticas do sul da América do Sul cuja população vem sendo impactada nas últimas décadas pela sobrepesca, por eventos de mortalidade maciça, fenômenos climáticos e pela ação antropogênica. Uma possível solução para este problema seria a produção de juvenis em cativeiro. Portanto, há a necessidade do estabelecimento de um protocolo de manutenção e maturação gonadal dos mariscos em cativeiro. Desse modo, esta dissertação avaliou métodos não-invasivos de indução à desova do marisco branco. Indivíduos com mais de 50 mm de comprimento foram coletados nas praias de Rio Grande e São José do Norte, RS, selecionados e medidos (comprimento, altura e peso). Uma série de experimentos de indução à desova com ou sem condicionamento em laboratório foi realizada. Nos experimentos com condicionamento (denominados experimentos I, II e III), os mariscos foram submetidos a indução à desova através apenas da manipulação de temperatura com tempo de exposição de 60 a 120 min. Nos experimentos sem condicionamento (IV, V e VI), os mariscos foram mantidos no laboratório por 45 min e posteriormente expostos à diferentes tratamentos (manipulação de temperatura e/ou associada adição de extrato de espermatozoides, salinidade 35, pH alcalino, adição de peróxido de hidrogênio) por períodos de 60 a 210 min. Havendo desova, a quantidade de ovócitos, zigotos e larvas foram estimadas. Em cada experimento, o estágio das gônadas, o tamanho dos ovócitos e a sobrevivência foram avaliadas. Os dados foram testados quanto as premissas necessárias para o uso da análise de variância e, quando não atendiam essas premissas, eram transformados. As análises foram efetuadas ao nível de significância de 0,05. Não houveram desovas nos experimentos com condicionamento. A histologia indicou que os mariscos desses experimentos não estavam maduros, mas os diâmetros dos ovócitos do experimento II aumentaram significativamente após o condicionamento. Nos experimentos sem condicionamento também foram detectadas diferenças significativas nas dimensões dos ovócitos. Os mariscos do experimento IV estavam mais maduros que os dos experimentos V e VI. Por outro lado, houveram desovas nos experimentos IV, V e VI e houve diferenças nas dimensões dos ovócitos, indicando que os mariscos do experimento IV se encontravam mais maduros que os do experimento V e VI. No entanto, apenas no experimento IV e V foram observadas a presença de larvas D. A sobrevivência dos reprodutores nos experimentos I, II, e III foram superiores a 70% e nos experimentos IV, V e VI foram superiores a 80%, exceto no experimento VI nos tratamentos envolvendo peróxido de hidrogênio. Esses resultados demonstram que houve um aumento

nos ovócitos dos mariscos dos experimentos II condicionados em laboratório, mas a duração não foi suficiente para total maturação dos gametas. Nos experimentos sem condicionamento, a desova pode ter ocorrido devido a presença de ovócitos e espermatozoides maduros livres no lúmen. Mais estudos são necessários para avaliar isoladamente os fatores que promoveram a indução e devido a maioria das desovas terem sido observadas após o *overnight*, é necessário avaliar também a influência do fotoperíodo.

Palavras-chave: *Amarilladesma mactroides*, reprodução, aquicultura.

Abstract

The yellow clam is a marine bivalve distributed on the Brazilian South Atlantic beaches whose population has been negatively impacted in the last decades by overfishing, events of massive mortality, climate change and anthropogenic activities. One solution for this problem is to control the production of juvenile and adult clams in laboratory. Therefore, there is a need to establish a protocol for the maintenance and the gonadal maturation of the yellow clam in captivity. Thus, this dissertation evaluated non-invasive techniques of spawning induction of the yellow clam. Specimens with a minimum length of 50mm were collected on the beaches of Rio Grande and São José do Norte, southern Brazil, and after were selected and measured (length, height and weight). A series of spawning induction experiments, with or without broodstock conditioning, were carried out. In the experiments with conditioning (experiments I, II and III), the clams were submitted to spawning induction through temperature manipulation with an exposure time of 60 to 120 minutes. In the experiments without conditioning (IV, V and VI), the clams were kept in the laboratory for 45 min and subsequently exposed to different treatments (temperature manipulation and/or addition of sperm extract, increased salinity, alkaline pH, addition of peroxide hydrogen) for periods of 60 to 210 minutes. In the case of a spawning event occurring, the number of oocytes, zygotes and D-larvae were estimated. The gonad stage and oocyte size were evaluated through histology. The data was tested for the premises necessary to use analysis of variance (ANOVA), and when these were not met the premises, data transformation was performed. Analyses were performed at the level of significance of 0.05. There were no spawning events in the experiments I, II and III. The histological analyses indicated that the clams in these experiments were not mature, but the diameter of the oocytes in experiment II increased significantly after conditioning. In the experiments without conditioning significant differences in the dimensions of the oocytes were also detected. The clams in experiment IV were more mature than those in experiments V and VI. On the other hand, there were spawning events in experiments IV, V and VI and there were differences in the size of the oocytes, indicating that the clams in experiment IV were more mature than those in experiment V and VI. However, only in experiments IV and V the presence of D larvae was observed. Broodstock survival rates in experiments I, II, and III were greater than 70%, and in experiments IV, V and VI the rates were greater than 80%, with the exception of experiment VI, in which the treatments involved hydrogen peroxide. These results show that there was an increase in the oocyte size of the yellow clams that were raised in laboratory-conditions from

experiment II, but the duration of the conditioning period was not enough for the full maturation of the gametes. In the experiments without conditioning, spawning may have occurred due to the presence of free mature oocytes and sperm in the lumen of the follicle. Further studies are necessary to assess the individual factors that promoted the spawning induction of the yellow clam, and the influence of photoperiod.

Keywords: *Amarilladesma mactroides*, reproduction, aquaculture.

Introdução

A aquicultura vem desempenhando um papel cada vez mais importante na produção mundial de pescado. Na década de 1950, a produção aquícola mundial era inferior a um milhão de toneladas, enquanto em 2016 alcançou 80,0 milhões de toneladas (FAO, 2018). Embora desde o ano de 2000 a aquicultura mundial já não apresente as altas taxas de crescimento anuais observadas nas décadas de 1980 e 1990, quando alcançou 10,8 e 9,5%, respectivamente, ela continua a crescer mais rapidamente do que outros setores de produção de alimentos. Para o período 2001-2016, a taxa de crescimento anual da aquicultura global foi estimada em 5,8% (FAO, 2018).

Nos últimos anos, a produção mundial de moluscos pela aquicultura cresceu consideravelmente, tendo passado de 1 milhão de toneladas em 1950 para 17,1 milhões em 2016 (FAO, 2018). Os quatro principais grupos de espécies de moluscos produzidos pela aquicultura mundial são bivalves: ostras, mexilhões, vieiras e os moluscos de areia. Entre os gastrópodos, as únicas espécies de relevância em termos de produção pela aquicultura são os abalones. Embora tradicionalmente a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) seja a espécie com maior volume de produção a nível mundial, recentemente duas espécies de moluscos de areia passaram a ter um volume de produção maior: o berbigão ou vôngole japonês *Ruditapes philippinarum* e o molusco de areia *Sinonovacula constricta* (FishStat J, 2018). Além dessas, espécies com grandes volumes de produção são o “blood cockle” (*Anadara granosa*), os mexilhões do Mediterrâneo (*Mytilus galloprovincialis*), azul (*Mytilus edulis*), chileno (*Mytilus chilensis*) e o verde (*Perna viridis*), e a vieira japonesa (*Patinopecten yessoensis*).

Entre os vários fatores que explicam o crescimento da produção de moluscos pela aquicultura, podemos destacar que os moluscos se alimentam de microalgas ou material em suspensão, ou seja, não há a necessidade de se fornecer dietas para sua alimentação; que o cultivo é relativamente fácil, demanda relativamente pouca mão-de-obra e pode ser associado à produção de outras espécies aquáticas, uma estratégia que vem sendo amplamente incentivada nos últimos anos; e que muitas espécies de moluscos tem ampla tolerância à variações ambientais (Helm & Bourne, 2004; FAO, 2018).

Grande parte do crescimento da produção mundial de moluscos se baseou na coleta de formas jovens no ambiente natural, popularmente chamadas de “sementes”, as quais são transferidas para estruturas de crescimento ou engorda (Helm & Bourne, 2004; Wisjman *et al.*, 2018). Contudo, a redução dos estoques naturais devido à sobrepesca,

degradação ambiental e aos fenômenos climáticos, além da crescente demanda de sementes pela própria aquicultura, fez com que se intensificasse a necessidade de produção de sementes em laboratório (Gosling, 2015). Logo, o controle e a manipulação do ciclo reprodutivo, e a consequente produção em laboratório, traz como vantagens uma maior disponibilidade de sementes de moluscos, além do controle sobre o número e época de ocorrência das desovas (Costa *et al.*, 2013). O desenvolvimento de técnicas de produção de sementes de moluscos bivalves em laboratório, porém, só passou a ocorrer no século XX (Gosling, 2015), quando se verificou que, para algumas espécies, o período de reprodução de populações naturais era relativamente curto (Ojea *et al.*, 2008). Desse modo, o entendimento dos processos relacionados à reprodução é primordial para o sucesso da aquicultura da espécie de molusco bivalve desejada.

A reprodução na maioria dos bivalves marinhos e estuarinos é um processo cíclico regulado por uma complexidade de fatores exógenos (*e.g.*, temperatura, salinidade, disponibilidade de alimento e fotoperíodo) e endógenos (ciclos neuroendócrinos e genótipos) que influenciam na maturação das gônadas (Bayne, 1976; Gosling, 2004). A temperatura e a disponibilidade de alimento são um dos principais fatores exógenos que afetam o ciclo reprodutivo dos bivalves (Costa *et al.*, 2013; Gosling, 2015). A temperatura influencia duplamente na reprodução de espécies de águas temperadas, pois atua diretamente na maturação das gônadas e é também um fator ativador da liberação de material reprodutivo (Gosling, 2015). Por outro lado, em espécies de águas tropicais, onde a temperatura da água é relativamente mais estável, a flutuação da salinidade também parece ter um papel sobre a ocorrência das desovas (Gosling, 2015). A manipulação da temperatura pode ser uma ferramenta eficaz na gametogênese e consequentemente na maturação dos animais mantidos em cativeiro (Marshall *et al.*, 2012). Diversos autores (Sastry, 1963; Bayne, 1976; Utting & Millican, 1997; Helm & Bourne, 2004; Gosling, 2015) citam a temperatura como o principal fator que influencia a sincronização e o desenvolvimento do ciclo reprodutivo. Apesar de cada espécie possuir uma faixa de temperatura ideal para maturação e desova, o conhecimento dessa faixa é extremamente importante para aprimorar o condicionamento e o processo de maturação dos animais em laboratório (Utting, 1993).

O ciclo reprodutivo dos bivalves está fortemente relacionado não só à temperatura, mas também à disponibilidade de alimento, e ao uso e armazenamento dos nutrientes (Bayne, 1976; Yan *et al.*, 2010). Assim, a disponibilidade de alimento também é reconhecida como fator determinante na reprodução de vários bivalves (Gosling, 2004;

2015). A reprodução é um processo que demanda grande quantidade de energia e, conseqüentemente, o desenvolvimento das gônadas depende da quantidade e qualidade do alimento ingerido e/ou das reservas energéticas estocadas previamente (Bayne, 1976; Delgado & Camacho, 2005). A demanda por microalgas varia entre espécies de moluscos (Muller-Fuega *et al.*, 2003). Em laboratório, a manutenção dos reprodutores depende, portanto, da disponibilização de grandes quantidades de microalgas com alto valor nutricional (Mamat & Alfaro, 2014). Os laboratórios devem manter cultivos de diferentes microalgas a fim de poder ofertar dietas mistas, ou seja, misturas de diferentes espécies de microalgas. A disponibilização de células com diferentes tamanhos e perfis nutricionais distintos é essencial para atender as exigências nutricionais nos diferentes estágios de vida dos bivalves e, conseqüentemente, para a produção de ovos e larvas em quantidade e de qualidade (Muller-Fuega *et al.*, 2003; Helm & Bourne, 2004; Rheault, 2012).

O alimento mais frequentemente utilizado na manutenção e condicionamento de reprodutores de bivalves em laboratório é a associação de microalgas diatomáceas e flageladas (Helm & Bourne, 2004). Entre as mais utilizadas estão as diatomáceas (*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana* e *Skeletonema costatum*) e as flageladas *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* (T-ISO) e *Pavlova lutherii* (Helm & Bourne, 2004; Gosling, 2015). A Tabela 1 enumera as microalgas mais utilizadas e que tem apresentado resultados mais consistentes em termos de condicionamento e maturação de reprodutores em laboratório.

Para o sucesso da reprodução de bivalves em laboratório, há uma série de etapas e processos a serem observados. A fim de garantir um estoque de animais saudáveis e reprodutivamente maduros, a seleção de reprodutores e o condicionamento dos mesmos em laboratório são etapas fundamentais (Sarkis & Lovatelli, 2007). O processo de condicionamento do estoque reprodutor é bastante similar para a maioria dos bivalves de interesse da aquicultura (Gosling, 2015). Nessa etapa, indivíduos adultos são confinados a 16-24°C, salinidade acima de 25, com reposição total e diária da água e o fornecimento de microalgas de qualidade e em grande quantidade por dias ou semanas antes de serem induzidos a desovar (Utting & Millican, 1997; Muller-Fuega *et al.*, 2003, Gosling, 2015). Esse período de condicionamento permite o desenvolvimento gonadal dos indivíduos para que, quando estimulados, possam efetivamente liberar os gametas (Castagna, 1983). A duração do período de condicionamento pode variar entre espécies, e também depende

da temperatura em que os animais são mantidos e da alimentação fornecida (Utting & Millican, 1997; Gosling, 2015), por isso, é fundamental o conhecimento sobre a biologia das espécies a serem cultivadas.

Tabela 1: Espécies de microalgas com resultados mais consistentes no condicionamento e maturação sexual de reprodutores de moluscos bivalves.

Espécie de bivalve	Duração do condicionamento	Microalga(s)	Referência
<i>Crassostrea angulata</i>	- x -	<i>Skeletonema costatum</i> + <i>Chaetoceros calcitrans</i> e <i>Skeletonema costatum</i> + <i>Chaetoceros calcitrans</i> + <i>Pavlova lutherii</i>	Anjos <i>et al.</i> (2016)
<i>Mesodesma donacium</i>	54 dias	<i>Isochrysis galbana</i> + <i>Chaetoceros gracilis</i> + <i>Pavlova lutheri</i>	Zevallos & Peredo (2017)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	42 dias	<i>Isochrysis galbana</i> e <i>Isochrysis galbana</i> + <i>Chaetoceros gracilis</i>	Martínez-Pita <i>et al.</i> (2016)
<i>Panopea generosa</i>	155 dias	<i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Isochrysis galbana (T-ISO)</i>	Marshall <i>et al.</i> (2012)
<i>Ruditapes decussatus</i>	48 dias	<i>Chaetoceros calcitrans</i> e <i>C. calcitrans</i> + <i>Tetraselmis suecica</i>	Abbas <i>et al.</i> (2018)
<i>R. decussatus</i>	56 dias	<i>Isochrysis galbana (T-ISO)</i> + <i>Chaetoceros calcitrans</i>	Matías <i>et al.</i> (2016)

Após o período de condicionamento, pode-se dar início ao processo de indução à desova, no qual indivíduos adultos, em resposta à exposição a um ou mais estímulos, liberam espontaneamente os gametas (Utting & Spencer, 1991). Há uma diversidade de técnicas de indução à desova utilizadas em bivalves (Marshall *et al.*, 2012; Gosling, 2015; Lagreze-Squella *et al.*, 2018). Estas normalmente resumem-se na manipulação de um ou mais estímulos, sejam eles físicos (temperatura e salinidade), químicos (injeção de hormônios ou neurotransmissores, e adição de substâncias químicas, como peróxido de

hidrogênio), ou biológicos (adição de microalgas e/ou de gametas maduros na água) (López-Sánchez *et al.*, 2009; Aji, 2011; Arguello-Guevara *et al.*, 2013).

O choque térmico é o estímulo mais comumente empregado por ser econômico e de fácil utilização, consistindo na aplicação de ciclos de temperatura quentes e frias (Matías *et al.*, 2009; Mamat *et al.*, 2014; Gadomski *et al.*, 2015; Trigos *et al.*, 2018). O choque térmico pode ser associado à adição de gametas (preferencialmente espermatozoides) e microalgas, aumentando assim as chances de desova (Redfearn, 1982; Hooker 1997; Costa & Patino, 2009; Costa *et al.*, 2010; Arguello-Guevara *et al.*, 2013; Joaquim *et al.*, 2014; Trigos *et al.*, 2018). Bivalves tendem a desovar na natureza não só quando a temperatura é favorável, mas também quando há abundância de alimento (Aji, 2011). Por exemplo, Joaquim *et al.* (2014) demonstraram que a adição de microalgas funcionou como um estímulo adicional ao choque térmico na indução à desova de *Chamelea gallina* e *Spidula solida*. Arguello-Guevara *et al.* (2013) obtiveram resultados superiores na desova de *Striostrea prismatica* quando o choque térmico foi aplicado isoladamente ou associado à adição de microalgas.

Como mencionado anteriormente, a adição de gametas maduros ou o extrato de gônadas maduras na água também tem um papel positivo na indução à desova de bivalves (Aji, 2011). De acordo com Heslinga *et al.* (1990), gametas maduros contêm feromônios, os quais, ao serem adicionados na água, induzem a desova dos moluscos. Muitos destes, por sua vez, liberam gametas induzindo os demais a desovar, ou seja, pode ocorrer o que se chama de “desova epidêmica”.

Estímulos químicos também podem ser aplicados na indução à desova em bivalves, principalmente por meio de injeções de hormônios ou de neurotransmissores na gônada ou na cavidade do manto (Aji, 2011), e inoculação de substâncias químicas no meio, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O emprego de H₂O₂ na indução à desova se deve ao papel regulador desse composto químico na catalisação de uma enzima que ativa a síntese de prostaglandinas. Desse modo, a exposição a baixas concentrações de H₂O₂ ativa a enzima, aumentando a síntese de prostaglandina e, conseqüentemente, induzindo a desova de alguns bivalves que se encontram maduros (Morse *et al.*, 1977; Rose, 1990; Areias, 2012; Bantoto, 2016; Vosloo e Vosloo, 2017; Ferranti *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2018).

Caso nenhum estímulo tenha efeito na indução à desova, a extrusão dos gametas (ou *stripping*) é a técnica mais comumente utilizada (Castagna, 1983; Velasco *et al.*,

2007; Tanyaros & Tarangkoon, 2016; Ayerbe *et al.*, 2017). O *stripping* consiste na abertura e separação das valvas com uma faca ou lâmina de metal, a qual é utilizada para cortar as gônadas, extraíndo-se assim os gametas. Esta técnica é, portanto, invasiva e implica no sacrifício dos reprodutores (Costa *et al.*, 2013).

O marisco branco

O marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) é um bivalve marinho de importância ecológica e econômica na costa Atlântica da América do Sul (Coscarón, 1959; Defeo & Scarabino, 1990; McLachlan, 2018; WoRMS, 2020), onde habita as zonas entre marés de praias arenosas do Brasil à Argentina (Coscarón, 1959; Olivier & Penchaszadeh, 1971; Fiori & Defeo, 2006). No Brasil, sua distribuição concentra-se no extremo sul do Rio Grande do Sul, enquanto na Argentina estão distribuídos na costa norte (Olivier & Penchaszadeh, 1971; Fiori & Morsan, 2004; Lepore, 2008). Fatores abióticos como temperatura e granulometria do sedimento estabelecem a sua distribuição geográfica (Defeo *et al.*, 1986; Cledon & Nuñez, 2010).

O antigo nome científico atribuído ao marisco branco era *Mesodesma mactroides*. No entanto, após Marins & Levy (1999) evidenciarem que há uma grande distância genética entre essa espécie e a “macha” (*Mesodesma donacium*), Huber (2010) descreveu um novo gênero que melhor definia as espécies do sudoeste do Atlântico. Este autor também considerou as diferenças morfológicas do gênero *Mesodesma*, renomeando o marisco branco de *Amarilladesma mactroides*.

As valvas de *A. mactroides* são frágeis, finas e alongadas, sendo que a pigmentação externa da concha varia de um tom esbranquiçado em exemplares jovens ao amarelado nos adultos (Coscarón, 1959; Fiori *et al.*, 2019). Possui um pé desenvolvido, de grande mobilidade e que se expande a fim de permitir o enterramento no sedimento (Coscarón 1959). O marisco branco pode ser encontrado de 1 a 40 cm de profundidade, sendo que indivíduos maiores estão enterrados mais ao fundo (Coscarón, 1959; McLachlan *et al.*, 1996). Os adultos apresentam um comportamento migratório distinto na fase adulta, regulado pela sazonalidade (Fiori *et al.*, 2004). Nos meses frios habitam áreas mais próximas a linha de rebentação das ondas, e quando chegam os meses quentes se encontram na zona entre marés e margens da praia (Chiaradia *et al.*, 2011). Essa migração maciça dos mariscos para a zona entre marés ocorre na primavera, quando o estoque se reproduz (Coscarón, 1959; Fiori & Cazzaniga, 1999; Fiori & Carcedo, 2015).

Assim como os demais bivalves, o crescimento do marisco branco é regulado pela qualidade e disponibilidade de alimento (Gosling, 2004; Arapov *et al.*, 2010). Apesar de ser um filtrador suspensívoro com preferência por microalgas, *A. mactroides* também pode consumir detritos orgânicos presentes no sedimento (Coscarón, 1959; Defeo & Scarabino, 1990). Seu sifão inalante aspira água trazendo o alimento, e os produtos da excreção são expelidos pelo sifão exalante (Coscarón, 1959).

O marisco branco é considerado um dos principais elementos da estrutura da comunidade de praias Atlânticas da América do Sul (Coscarón, 1959; Fiori & Cazzaniga, 1999), sendo, na maioria dos casos, a espécie que apresenta a maior biomassa (Coscarón, 1959; Defeo *et al.*, 1986; Herrmann *et al.*, 2011). Em vista dessa abundância, essa espécie vem sendo coletada ao longo de praticamente toda a sua faixa de distribuição para ser comercializada como isca para a pesca esportiva ou, mais importante, para o consumo humano (Coscarón, 1959; Defeo, 1989). A exploração de *A. mactroides* como recurso alimentar é uma prática antiga. Rosa (2006) relata que os povos indígenas que se estabeleceram no litoral do Rio Grande do Sul há cerca de 4.000 anos atrás utilizavam essa espécie com uma das suas principais fontes de alimento. Infelizmente, a captura excessiva ao longo dos anos fez com que muitas populações entrassem em colapso (Coscarón, 1959; Olivier *et al.*, 1971; Defeo, 1989; Herrmann *et al.*, 2011). Na Argentina, o máximo de captura (1.319 toneladas) foi atingido no ano de 1953 (Coscarón, 1959; Fiori & Cazzaniga, 1999; Chiaradia *et al.*, 2011), enquanto no Uruguai o pico de captura ocorreu em 1985 com 219 toneladas. Em vista da brusca redução dos estoques, a Argentina e o Uruguai proibiram a captura comercial em 1954 e entre os anos de 1987-1989, respectivamente (Coscarón, 1959; Defeo, 1998; Dadon *et al.*, 2001). No Brasil, a captura da espécie nas praias do extremo sul do país é tradicionalmente realizada de forma artesanal, porém, se desconhece a existência de dados estimando os volumes de captura.

Eventos de mortalidade em massa também afetaram as populações de espécies da família Mesodesmatidae. O primeiro relato de mortalidade em massa de *A. mactroides* ocorreu em 1993 no Brasil (Odebrecht *et al.*, 1995) e, posteriormente, eventos similares também foram relatados na Argentina (Fiori & Cazzaniga, 1999) e no Uruguai (Ortega *et al.*, 2012). A “macha” *Mesodesma donacium* quase desapareceu das costas peruanas nos anos de 1997-1998 devido às oscilações do El Niño e, até hoje, o estoque não conseguiu se recuperar (Ortega *et al.*, 2012; Defeo *et al.*, 2018). De forma similar, Defeo *et al.* (2018) e McLachlan (2018) reiteraram que, mesmo que o estoque de *A. mactroides* no Uruguai tenha se recuperado após o período de proibição da captura, nunca alcançou os níveis de

abundância observados antes dos episódios de mortalidade em massa. Apesar das causas que levam a mortalidade maciça ainda não tenham sido totalmente esclarecidas (Carvalho *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016; Vasquez *et al.*, 2016), há indicações de que poderia estar relacionada à floração de algas nocivas (Odebrecht *et al.*, 1995), contaminação por metais pesados (Thompson & Sanches de Bock, 2007), ocorrências de parasitas (Cremonte & Figueras, 2004), vírus e/ou bactérias (Carvalho *et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2016), baixas concentrações de oxigênio dissolvido ou fatores climáticos (Fiori & Cazzaniga, 1999), ou a combinação desses fatores (Defeo *et al.*, 2018). Outro importante componente seriam as ações antropogênicas, as quais, associadas às variações ambientais, poderiam afetar o sistema imune do marisco branco e torná-lo mais vulnerável a infecções ou patógenos (Santos *et al.*, 2016). Nesse sentido, Carvalho *et al.* (2015) avaliaram a resposta do sistema imunológico do marisco branco após serem induzidos a uma inflamação aguda. Foram observadas anormalidade nas brânquias, rim e glândula digestiva, sendo que esta última teve diagnóstico positivo para apoptose. Por sua vez, Carvalho *et al.* (2016) verificaram a ausência de patologias, especialmente as de notificação obrigatórias junto a Organização Internacional de Epizootias (OIE), em indivíduos coletados em seis pontos ao longo da costa do Rio Grande do Sul, Brasil.

Como consequência da diminuição da abundância dessa espécie, Cledón & Nuñez (2009) sugerem que formas jovens (ou “sementes”) sejam produzidas em laboratório e, dessa forma, seja possível estudar a viabilidade do restabelecimento do estoque populacional nos ambientes naturais. Outras possibilidades de uso das sementes seriam a aquicultura deste molusco em viveiros em consórcio com camarões ou peixes, a produção extensiva nas zonas entre marés de praias arenosas, de modo similar ao realizado na Ásia com o molusco de areia *Ruditapes philippinarum*, cuja produção ultrapassou 4.010.702 t em 2016 (FishStatJ, 2018), ou ainda a sua utilização no tratamento de efluentes de fazendas de aquicultura em sistemas integrados.

Para que isso ocorra, porém, se faz necessário o desenvolvimento da tecnologia de produção de sementes de *A. mactroides* em laboratório. Embora membros da mesma família venham sendo criados experimentalmente (Gadomski *et al.*, 2015; Ayerbe *et al.*, 2017; Zevallos & Toledo, 2017), estudos que tratem especificamente da produção de sementes de *A. mactroides* são escassos, especialmente os relacionados à reprodução. Em uma revisão sobre o marisco branco, publicada no final da década de 1950, Coscarón (1959) indica que a espécie é dióica e não apresenta dimorfismo sexual externo. As

fêmeas têm alta fecundidade, produzindo 5 milhões de ovos/fêmea. A partir de 35 mm de comprimento podem apresentar óvulos maduros, mas é a partir dos 55 mm que se observa uma maior frequência de indivíduos maduros (Coscarón, 1959; McLachlan *et al.*, 1996; Defeo *et al.*, 2018). Masello (1987) estabeleceu que a primeira maturação sexual é atingida quando o comprimento dos indivíduos está entre 41,57 e 44,11 mm. Por sua vez, McLachlan (2018) estimou que a maturidade sexual seria alcançada aos 43 mm. A fertilização é externa, com as fêmeas expelindo ovúlos maduros e os machos, os espermatozoides, os quais seriam atraídos por estímulos químicos até o óvulo, fecundando-o (Coscarón, 1959). As gônadas do marisco branco ocupam boa parte da massa visceral (Figura 1), e estão localizadas entre o hepatopâncreas (porção superior) e o pé (porção inferior) (Coscarón, 1959). A porção posterior do hepatopâncreas envolve parcialmente as gônadas e juntos formam um conjunto anatomicamente ovóide (Christiansen, 1971).

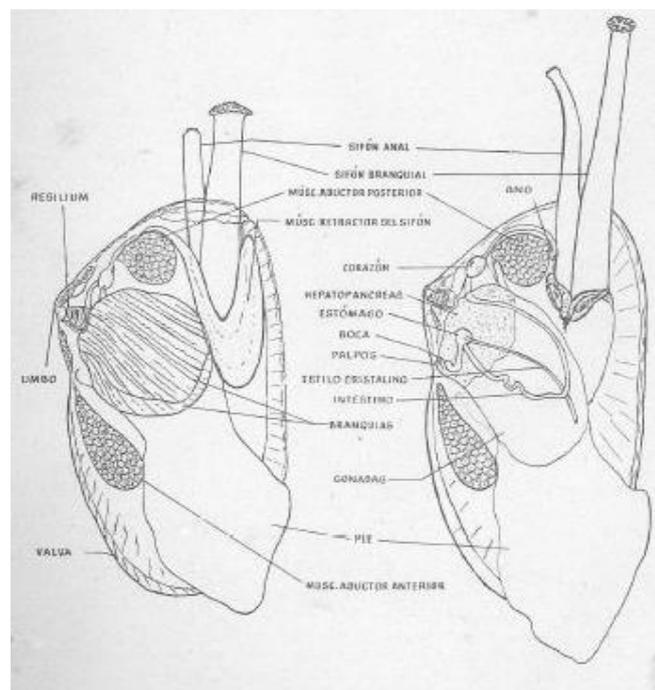


Figura 1: Anatomia interna do marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Coscarón, 1959).

Coscarón (1959) sustenta que, assim como outros moluscos, o desenvolvimento das gônadas é controlado principalmente pela temperatura, o que foi confirmado por Capezzani *et al.* (1971) e Hermann *et al.* (2009). Estes autores afirmaram que o

desenvolvimento das gônadas e as desovas dessa espécie são controlados pela temperatura. Para *M. donacium*, McLachlan (1996) comprovou que tanto a temperatura da água quanto a disponibilidade de alimento influenciam o ciclo reprodutivo, embora Riascos *et al.* (2009) relatem que mudanças sazonais da temperatura tem uma baixa correlação com o ciclo reprodutivo daquela espécie. A faixa de temperatura d'água em que *A. mactroides* é naturalmente encontrado na praia do Cassino, RS, varia de 12,9 a 26,0°C (Santos *et al.*, 2016). Por outro lado, adultos de marisco branco foram mantidos no laboratório em temperaturas entre 18 e 25°C (Carvalho *et al.*, 2015a, b). Coscarón (1959) relatou que a faixa de temperatura que *A. mactroides* é encontrado na costa da Argentina é comparativamente mais baixa, variando de 7,6 a 21,6°C. Ele também indica que, naquele país, as desovas ocorrem desde o fim de novembro até meados de março, quando a temperatura oscila entre 16,8 e 21,6°C. De modo similar, Capezzani *et al.* (1971) sugeriram a ocorrência de dois períodos reprodutivos bem definidos para essa espécie, um de maior escala na primavera e outro menos intenso no verão, mas ressaltaram que isso pode variar com a distribuição geográfica. Hermann *et al.* (2009) também relataram a existência de dois eventos reprodutivos anuais, mas o primeiro ocorreria no inverno e o segundo, na primavera.

A primeira tentativa de reprodução em cativeiro do marisco branco foi feita por Coscarón (1959). Este autor afirma que a reprodução é factível com a extrusão dos gametas, técnica conhecida como *stripping*. Este método, porém, prescinde do sacrifício dos reprodutores, visto que é necessário coletar gametas maduros da cavidade gonadal (Costa *et al.*, 2013). Mais recentemente, Santos (2019) não obteve sucesso ao induzir a desova em laboratório por meio de choques térmicos e da exposição ao ar. De modo similar, a reprodução em cativeiro da “macha” *M. donacium*, espécie da mesma família que o marisco branco e que é naturalmente encontrada no Oceano Pacífico, só tem sido possível utilizando-se o *stripping* (Ayerbe *et al.*, 2017). Até o momento, portanto, não se tem conhecimento de um protocolo não invasivo de reprodução em cativeiro para essa espécie que utilize estímulos para indução à desova.

Apesar de não lidar especificamente com questões relacionadas à reprodução do marisco branco, Proverbio *et al.* (2019) tiveram sucesso ao manter exemplares do marisco branco em cativeiro por 30 dias. Foram avaliados parâmetros como o fornecimento de diferentes dietas, métodos de marcação, flutuação dos parâmetros de qualidade de água durante período experimental e uso de substrato para a manutenção dos mariscos.

Objetivos

Geral

Avaliar os efeitos, associados ou não, da manipulação da temperatura, adição de extrato de gônadas masculinas e a exposição ao peróxido de hidrogênio como indutor à desova do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) em condições de laboratório.

Específicos

- Desenvolver um sistema de cultivo e práticas de manejo que permitam a manutenção do marisco branco em laboratório;
- Avaliar a sobrevivência e o crescimento dos mariscos em condições de laboratório;
- Determinar o desenvolvimento gonadal dos mariscos após o período de condicionamento;
- Analisar os efeitos, associados ou não, de diferentes estímulos (manipulação da temperatura, adição de extrato de gônadas masculinas e exposição ao peróxido de hidrogênio) na indução à desova.

Material e Métodos

Anterior à realização dos experimentos propriamente ditos, uma série de ensaios prévios foram realizados com os objetivos de definir um sistema de manutenção dos mariscos em condições de laboratório, metodologias de exposição dos mariscos aos choques de temperatura e um método de marcação dos mariscos.

Definição do modelo de unidade experimental

Como *A. mactroides* tem o hábito de permanecer enterrado na areia (Coscarón, 1959), todos os modelos de unidade experimental (UE) aqui testados contavam com uma camada de, pelo menos, 10 cm de sedimento arenoso. A areia foi obtida na região entre marés da praia do Cassino, município de Rio Grande, RS, nos mesmos locais de coleta dos mariscos. A areia foi previamente peneirada em peneiras granulométricas e somente a fração entre 250 e 500 μm foi utilizada, visto ser esta a faixa de granulometria em que a espécie é normalmente encontrada (Coscarón, 1959; Fiori & Carcedo, 2015). A areia era também lavada e esterilizada com hipoclorito de sódio na concentração de 12 ppm antes de ser utilizada.

Três modelos de UE foram confeccionados e testados (Figura 2). Os dois primeiros consistiram em baldes plásticos com capacidade de 10 ou 22 L. A porção circular do fundo dos baldes foi retirada e malhas com diferentes aberturas foram instaladas a fim de reter a camada de areia e permitir a passagem de água. Os baldes ficavam suspensos na coluna da água pelas alças. Cada modelo de UE contava com uma bomba de ar-água (“*airlift*”) acoplada à parede lateral, a qual bombeava água do fundo do tanque de manutenção. Dessa forma, o *airlift* garantia a circulação permanente da água pela camada de areia no sentido de cima para baixo (“*downwelling*”), facilitando a sua oxigenação e diminuindo a possibilidade de ocorrência de camadas hipoxicas ou anoxicas.

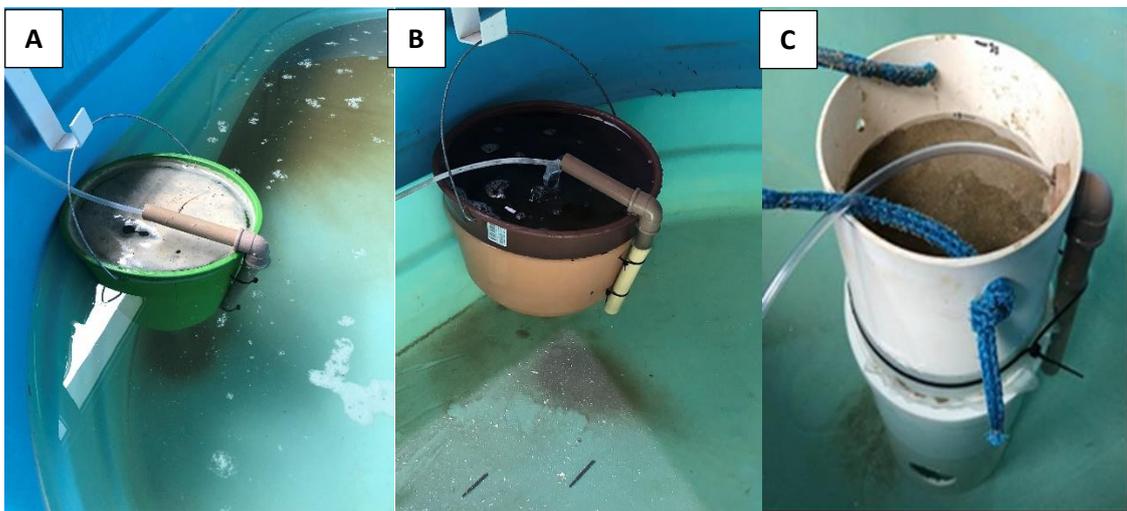


Figura 2: Modelos de unidades experimentais (A, B e C) testados para a manutenção em laboratório de exemplares do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) previamente ao início dos experimentos. As diferentes unidades estão inseridas no interior do tanque de manutenção.

As paredes dos baldes plásticos não resistiram ao manejo diário e, principalmente, à tensão causada pelo peso. Após alguns dias, estas UEs passaram a apresentar deformações que impediam sua utilização. Como alternativa, um modelo construído com tubo de PVC de 15 cm de diâmetro, 40 cm de altura e volume útil de 7 L (Figura 2C) foi testado. Este modelo conta com as mesmas estruturas que os baldes (alça, fundo com malha, camada de areia e *airlift*), mas, ao invés de ser suspenso na coluna da água, ele era colocado diretamente no fundo do tanque de manutenção. A cerca de 10 cm do fundo, uma malha com abertura de 200 μm foi instalada para reter a camada de areia. Como pode ser observado na Figura 2C, na porção inferior do modelo de UE foram feitos orifícios de cerca de 5 cm de diâmetro no tubo de PVC para permitir a livre passagem de água. Dos

três modelos testados, este não apresentou deformações e, portanto, foi escolhido para ser testado quanto à adaptação dos mariscos.

Adaptação dos mariscos às unidades experimentais

A partir da definição do modelo de UE, um pré-teste foi realizado, no período de 20/12/2018 a 03/01/2019, com o objetivo de avaliar a adaptação dos mariscos à UE e ao sistema de cultivo e manejo propostos. Foram observadas a sobrevivência dos animais, o consumo de microalgas, a presença/ausência de fezes e a ocorrência de manchas escuras no sedimento arenoso, o que poderia indicar baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Para esse pré-teste, 40 mariscos coletados na praia do Cassino foram transportados até a Estação Marinha de Aquacultura (EMA). Na EMA, os indivíduos com conchas quebradas e com a presença visível de epibiontes foram descartados. Dez mariscos foram então medidos (comprimento, largura e peso total) e acondicionados em duas UEs (Figura 3). As UEs foram colocadas em um tanque de fibra de vidro de 1.000 L com volume útil de 500 L de água salgada (“Tanque de manutenção”). Cada UE recebeu 5 mariscos, sendo que seis indivíduos de tamanho similar foram mantidos diretamente no fundo do tanque de manutenção (sem sedimento e, portanto, sem a possibilidade de se enterrar).



Figura 3: Disposição do sedimento arenoso na unidade experimental (A) e duas unidades experimentais estocadas com indivíduos do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no interior do tanque de manutenção (B).

Uma concentração média de $6,5 \times 10^4$ cél/mL de *I. galbana* e *C. muelleri* foi mantida no tanque de manutenção ao longo dos 14 dias de duração do pré-teste. A

temperatura, salinidade e a concentração de oxigênio dissolvido foram aferidas todas as manhãs, e as médias (\pm DP) foram 21,9°C (\pm 1,1), 31,3 (\pm 0,9) e 7,86 mg.L⁻¹ (\pm 0,19), respectivamente. Após 14 dias, os mariscos foram desenterrados, medidos (comprimento, largura e peso total) e o sedimento foi observado quanto à existência de manchas escuras.

As médias (\pm DP) iniciais e finais de comprimento, largura e peso total dos 10 indivíduos podem ser observadas na Tabela 2. Não foram observadas mortes nas UEs, mas a sobrevivência dos mariscos dispersos no fundo do tanque foi de apenas 16,7%. Essa baixa sobrevivência nos animais mantidos no fundo do tanque reforçou a opção por utilizar unidades experimentais que permitissem que os animais permanecessem enterrados no sedimento.

Tabela 2: Médias (\pm DP) iniciais e finais de peso úmido (g), comprimento total (mm) e largura total (mm) dos mariscos brancos *Amarilladesma mactroides* utilizados no pré-teste que avaliou a adaptação dos mesmos às unidades experimentais durante 14 dias.

	Inicial	Final
Peso úmido	11,36 \pm 1,62	13,67 \pm 1,18
Comprimento total	51,10 \pm 2,90	54,30 \pm 1,90
Largura total	29,10 \pm 1,90	31,20 \pm 0,80

No início do pré-teste observou-se que os mariscos, ao serem colocados sobre o sedimento, rapidamente se enterravam, o que difere do relatado por Fiori & Carcedo (2015). Estes autores tiveram que induzir o enterramento de indivíduos maiores que 40 mm utilizando a aeração/agitação da água. Ao serem desenterrados no 14º dia, pode-se observar que os animais em ambas as UEs se encontravam no fundo da camada de areia, abaixo dos 5 cm de profundidade, próximos a tela (Figuras 4A e 4B). Após o escoamento de toda água das UEs, a areia ainda se encontrava úmida, sem odor ou coloração escura. A ausência de pontos escuros no perfil do sedimento de cada unidade experimental indica que não houve ausência ou baixa oxigenação no sedimento (Figura 4C).

A sobrevivência de 100% dos mariscos mantidos nas UEs (em comparação com apenas 16,7% dos animais no fundo do tanque), somado ao crescimento relativamente alto dos indivíduos após 14 dias, indica que as condições ambientais foram adequadas e, portanto, que os mariscos se adaptaram às UEs e ao sistema de manutenção proposto.

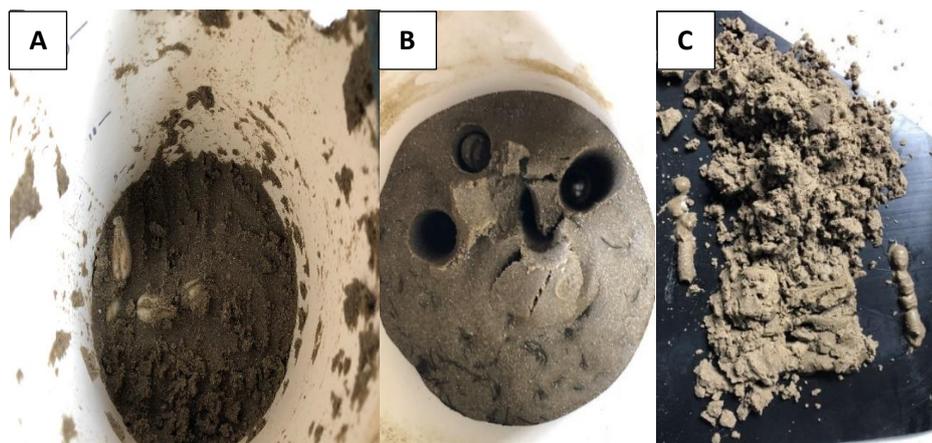


Figura 4: Posição dos mariscos (*Amarilladesma mactroides*) no sedimento arenoso das unidades experimentais (A e B) e condição do sedimento após 14 dias de manutenção em laboratório (C).

Variação da temperatura no interior do sedimento durante o choque térmico

Um dos métodos a ser investigado nessa dissertação é o choque térmico, o qual, como discutido anteriormente, é um dos estímulos mais comuns na indução à desova de moluscos (Matías *et al.*, 2009; Mamat *et al.*, 2014; Gadomski *et al.*, 2015; Trigos *et al.*, 2018). Para a realização do choque térmico, os moluscos são mantidos em águas com temperaturas geralmente baixas e são abruptamente transferidos para águas mais quentes. Entretanto, como *A. mactroides* se enterra no sedimento, se faz necessário avaliar quanto tempo levará para que a temperatura de choque efetivamente alcance o interior da camada de areia onde estão os mariscos.

Com esse objetivo, três UEs foram mantidas no tanque de manutenção contendo 500 L de água do mar. Uma bomba submersa (Sarlo SB 2700) levava a água do tanque de manutenção a um resfriador (*chiller* Gelaqua 1/3 HP) utilizado para manter a água do tanque de manutenção a 20°C. Cada UE contava com um termômetro inserido no sedimento para aferir a temperatura desde o início do choque térmico e, dessa forma, estimar quanto tempo levaria para se atingir a temperatura almejada.

Inicialmente, as UEs eram retiradas do tanque de manutenção e a água contida nas mesmas era escoada durante 1-2 min. As UEs eram então imediatamente transferidas para baldes de 30 L com água na temperatura desejada (no caso desse pré-teste, 23°C). A temperatura da água do balde e do sedimento foram monitoradas em intervalos de 5 min, durante 30 min (Tabela 3). Ao longo do pré-teste, as UEs permaneceram com o *airlift* ligado.

Tabela 3: Variação da temperatura (°C) da água dos baldes e no interior do sedimento arenoso a cada intervalo de 5 min durante 30 min em três unidades experimentais (UE).

Tempo (min)	Temperatura da água do balde			Temperatura do sedimento		
	UE 1	UE 2	UE 3	UE 1	UE 2	UE 3
0	23,0	23,0	23,0	20,5	20,5	20,5
5	23,0	23,0	22,5	21,5	21,5	21,5
10	23,0	23,0	23,0	22,0	22,5	21,5
15	23,0	23,0	23,0	22,5	22,5	22
20	23,0	23,0	23,0	22,5	22,5	22,5
25	23,0	23,0	23,0	23,0	22,5	22,5
30	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	22,5

Como pode ser observado na Tabela 3, embora a água nos baldes tenha sido mantida relativamente constante a 23,0°C, houve um gradativo aumento na temperatura da água no interior da camada de areia. Foram necessários de 25 a 30 min para que a temperatura da água no sedimento chegasse à temperatura almejada (23,0°C).

Marcação dos animais

A fim de individualizar os mariscos e, dessa forma, tornar possível a estimativa de crescimento durante o período de manutenção em laboratório, diferentes métodos de marcação, baseado nas metodologias propostas por Lonhart (1999) e Lemarié *et al.* (2000), foram testados. Assim, as conchas dos mariscos foram marcadas com:

- 1) caneta piloto para retroprojektor e caneta piloto permanente;
- 2) esmalte de unhas;
- 3) caneta piloto permanente coberta com adesivo bicomponente à base de resina epóxi (*Araldite*), caneta piloto para retroprojektor coberto com *Araldite*, e esmalte e cobertura de *Araldite*;
- 4) caneta piloto permanente coberto com cola instantânea à base de cianoacrilato (*Super Bonder*), caneta piloto para retroprojektor e cobertura de *Super Bonder*, e esmalte com cobertura de *Super Bonder*;
- 5) etiqueta plástica colada com *Super Bonder* ou *Araldite*.

UEs foram mantidas individualizadas em baldes com água do mar e aeração provida por pedra porosa e por um *airlift* acoplado na UE. A água dos baldes era renovada

diariamente. Sete mariscos foram marcados e mantidos em cada UE nessas condições por 30 dias.

Para os testes com *Araldite* ou *Super Bonder*, após as conchas serem marcadas com caneta ou esmalte, a cobertura foi aplicada e esperou-se 10 min para a secagem antes de transferir os mariscos para a UE. Após 2, 4, 7 e 10 dias, os mariscos eram retirados da UE para verificar a integridade da marcação. No caso de a marcação ter desaparecido ou estar ilegível, um novo tipo de marcação era testado. Em alguns casos, um mesmo indivíduo foi utilizado para testar dois tipos diferentes de marcação.

As combinações de marcação com caneta piloto com cobertura de *Araldite* e esmalte com *Araldite* foram as que persistiram por mais tempo e apresentaram maior visibilidade das marcas (Figuras 5 e 6). Desse modo, devido à maior facilidade, a marcação com caneta piloto e cobertura com *Araldite* foi o método de marcação escolhido para ser utilizado nos experimentos. Proverbio *et al.* (2019) utilizaram etiquetas de nylon numeradas como método de marcação para o marisco branco. Embora elas tenham permanecido intactas após 6 dias, os mariscos do referido estudo foram mantidos sem substrato.

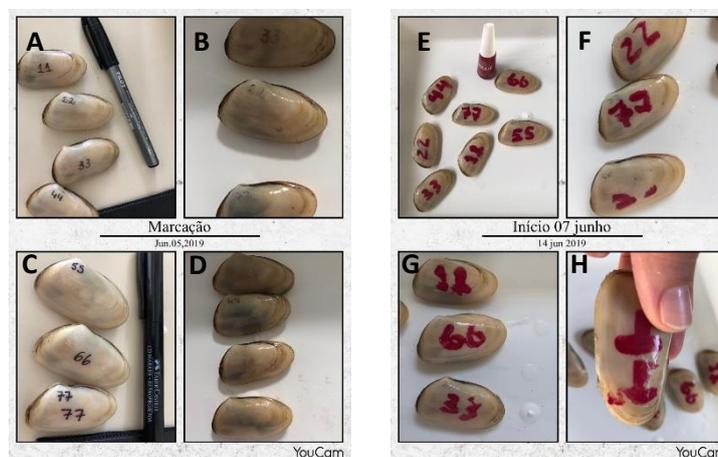


Figura 5: Mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) com diferentes tipos de marcação: com caneta piloto permanente (A) e após 4 dias (B); com caneta piloto para retroprojeter (C) e após 4 dias (D); com esmalte de unhas (E) e após 2 dias (F), 7 dias (G) e 10 dias (H).



Figura 6: Figura 6: Mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) submetidos à diferentes tipos de marcação: (A) com caneta piloto permanente ou esmalte de unhas cobertos com adesivo bicomponente à base de resina epóxi (Araldite) no dia da marcação (imagens à esquerda) e após 7 dias (direita); e (B) com caneta piloto permanente ou esmalte de unhas com cobertura de cola instantânea à base de cianoacrilato (Super Bonder) no dia da marcação (esquerda) e após 7 dias (imagem superior à direita).

Adaptação dos mariscos em tanques sem substrato arenoso

A fim de avaliar a adaptação dos mariscos quando mantidos em tanques sem a adição de substrato arenoso, um pré-teste foi realizado em 18/10/2019. Duas possibilidades foram testadas: a simples colocação dos mariscos diretamente sobre o fundo do tanque, onde eles permaneceriam horizontalmente, e a inserção dos mariscos em tubos de PVC de 40 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento mantidos verticalmente em contato com o fundo do tanque (Figura 7). Nesse caso, os mariscos permaneceriam na posição vertical, o que se aproxima ao comportamento da espécie no ambiente natural. Em cada um dos tubos de PVC foram feitos dois furos, um superior e um inferior, para permitir que a água circulasse no interior dos mesmos.

Para a realização do pré-teste de indução à desova foram coletados 160 mariscos na Barra do Estreito, praia do Mar Grosso em São José do Norte, RS. No momento da coleta, a temperatura e salinidade foram medidas (19,5°C e 25). Os intervalos de choques foram escolhidos a partir da temperatura da água do mar no dia da coleta, sendo testados três níveis: 22,5°C, 24,5°C e 26,5°C. Na EMA, os mariscos foram mantidos em um tanque de 500 L com água do mar a 19°C por 45 min antes do início do pré-teste. Cada choque teve duração de 60 min e consistiu de expor 40 mariscos à choques quentes e frio. Inicialmente, os animais foram transferidos do tanque com água a 19°C para recipientes com a temperatura alvo (22,5, 24,5 ou 26,5°C), onde permaneceram por 15 min. Os mariscos então retornaram ao tanque a 19°C por 15 min, sendo então novamente expostos a temperatura alvo por mais 30 min. Nos 15 min finais foi adicionado 100 mL de extrato de espermatozoide com concentração de $2,26 \times 10^{10}$ espermatozoide/mL. Após esses

procedimentos, os mariscos foram mantidos separados, conforme o tratamento a que foram expostos, e transferidos para um tanque com 250 L de água do mar a 19°C e salinidade 25, provido de aeração constante, onde foram mantidos até a manhã do dia seguinte (o que convencionamos chamar de período de “*overnight*”).



Figura 7: Exemplos do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) dispostos diretamente sobre o fundo do tanque e inseridos em tubos de PVC de 40 mm de diâmetro mantidos verticalmente em contato com o tanque.

Assim como no pré-teste de choque térmico com sedimento, a temperatura da água foi monitorada a cada 5 min durante os 60 min de choque térmico. Apesar de pequenas variações nas temperaturas com o passar do tempo, estas puderam ser corrigidas com a adição de água aquecida. Foi possível perceber que, com a adição do extrato de espermatozoides, os mariscos se mostravam mais ativos e também que no choque menos abrupto (para 22,5°C), os mariscos se mostravam menos ativos quando comparado aos indivíduos expostos à 24,5 e 26,5°C. De modo geral, e em que pese o curto período de observação, os mariscos responderam bem quando mantidos em tanques sem a adição de substrato arenoso.

No entanto, foi observado que os mariscos movimentavam incessantemente os pés na tentativa de inseri-lo em uma pequena fresta formada entre o tubo de PVC e o fundo do tanque, o que fazia com que o pé dos mariscos deslizessem e o mesmo não ficasse totalmente na posição vertical. Desse modo, a estratégia de apenas colocá-los no fundo pareceu menos estressante e por isso foi adotada.

Procedimentos experimentais

Obtenção dos mariscos

Além dos indivíduos coletados para a realização dos pré-testes acima relatados, seis outras expedições de coleta de marisco foram realizadas nas praias do Cassino, Rio Grande, RS, e do Mar Grosso em São José do Norte, RS, nos meses de fevereiro, março, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2019. Em todas as coletas, a temperatura e a salinidade da água foram medidas com termômetro e refratômetro ótico, respectivamente (Tabela 4). Em todas as oportunidades, os mariscos foram coletados na zona entre marés com o auxílio de pás de corte, e selecionados indivíduos com comprimento total superior à 50 mm. Os mariscos foram transportados em caixas térmicas sem água até a EMA.

Seleção e biometria dos mariscos

Na chegada à EMA, foram descartados os mariscos com valvas quebradas, sendo que a aparência externa e coloração das conchas, ausência de epibiontes e parasitas, e a atividade dos sifões e pés também foram considerados como critérios de seleção.

Os mariscos foram secos com papel toalha, inicialmente numerados em sequência apenas com caneta piloto permanente, e medidos o comprimento total (Lt) e altura total (Ht) da concha, e os pesos úmido e seco. O comprimento e largura foram obtidos com um paquímetro manual com precisão de 0,01 mm (Figura 8), sendo que indivíduos com Lt inferior à 50 mm foram descartados. O peso vivo total foi medido com uma balança eletrônica marca Marte (precisão de 0,01 g). O peso seco inicial e final foram determinados de acordo com a metodologia de Helm & Bourne (2004), em que os mariscos foram sacrificados, o corpo mole foi separado da concha e ambos foram secos em estufa a 60°C por, pelo menos, 48 horas até atingir peso constante.



Figura 8: Medidas de comprimento total (Lt) e largura total (Ht) coletadas de indivíduos do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*).

O fator de condição (CF) é usado como um índice de bem-estar e peso/tamanho do organismo, o qual depende de aspectos como disponibilidade e diversidade de alimento, reserva energética, performance reprodutiva, dentre outros. Nesse estudo, CF foi estimado para comparar a condição dos mariscos no início e ao fim de cada experimento. Para estimar o CF, foram feitas regressões lineares entre o peso úmido e o comprimento total dos indivíduos de cada experimento ($W = aL^b$). Para isso, o peso (W) e comprimento total (L) foram transformados utilizando a função $\text{Log}(x)$. Desse modo, foram estimados os coeficientes (a , b) da relação peso-comprimento, no qual a = intercepto no eixo do comprimento e b = coeficiente de regressão ou expoente do crescimento. Os valores de a e b dos experimentos I, II e III foram $a = -3,23$, $b = 2,51$, $a = -3,46$, $b = 2,68$, e $a = -3,40$, $b = 2,58$, respectivamente. Os respectivos R^2 dos experimentos I, II e III foram 0,60, 0,59 e 0,45. Para os experimentos IV, V e VI, os valores de a e b foram, respectivamente, $a = -0,40$, $b = 2,23$, $a = -1,13$, $b = 3,02$, e $a = -0,22$, $b = 1,73$ e os respectivos R^2 foram 0,55, 0,74 e 0,41.

O fator de condição (CF) foi determinado de acordo com Fulton (1911):

$$CF = \frac{W}{L^b} \times 1000$$

onde W = peso úmido total (g), L = comprimento total (mm) e b = coeficiente da regressão de cada experimento.

Adicionalmente, o índice de condição (CI) foi determinado através do peso seco da carne (g) e do peso seco da concha (g) conforme Lucas & Beninger (1985):

$$CI = \frac{\text{peso seco da carne}}{\text{peso seco da concha}} \times 100$$

Após as medições, foi aplicada uma fina cobertura de *Araldite* na concha de cada marisco para manter a integridade da marcação. Após 10 min de secagem, os mariscos foram colocados na água. A marcação das conchas foi realizada adaptando as metodologias propostas por Lonhart (1999) e Lemarié *et al.* (2000).

Tabela 4: Data e local das coletas, número de indivíduos coletados (n), comprimento total médio (\pm DP; mm), temperatura ($^{\circ}$ C) e salinidade da água nas coletas de marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) nas praias do Cassino, Rio Grande, RS, e Mar Grosso, São José do Norte, RS, para utilização nos seis experimentos de indução à desova com condicionamento (Experimentos I, II e III) e sem condicionamento em laboratório (Experimentos IV, V e VI).

Experimento	Data	Local	n	Comprimento	Temperatura	Salinidade
I	15/02/2019	Cassino	328	53,0 \pm 1,0	23,0	32
II	14/03/2019	Mar Grosso	100	62,3 \pm 2,5	24,0	28
III	19/09/2019	Mar Grosso	128	56,7 \pm 2,6	18,0	24
IV	07/11/2019	Mar Grosso	179	59,8 \pm 3,1	21,0	25
V	18/11/2019	Mar Grosso	150	58,1 \pm 3,5	22,5	28
VI	10/12/2019	Cassino	100	59,0 \pm 2,3	21,8	31

Indução à desova com condicionamento em laboratório

Após a realização dos procedimentos medição e marcação, os mariscos foram estocados na densidade inicial de 6,0 indivíduos por UE, totalizando 60 indivíduos nos experimentos I e II. Por sua vez, no experimento III inicialmente foram estocados de 7 a 8 indivíduos por UE.

As UEs foram inseridas em um tanque de fibra de vidro de 1.000 L, com volume útil de 500 L preenchido com água do mar previamente filtrada (1 μ m) e declorada, com temperatura média de 20,0 $^{\circ}$ C e salinidade 32 (Figura 9). A temperatura de 20 $^{\circ}$ C foi mantida com auxílio de um *chiller* Gelaqua 1 HP e uma bomba submersa Sarlo SB 2700. Duas pedras porosas conectadas ao sistema de ar comprimido da EMA foram introduzidas no tanque para manter as concentrações de oxigênio dissolvido. Nos experimentos I e II, a renovação diária de água foi de 20% devido a dificuldade na produção de microalgas, e no terceiro passou a ser de 100%.

Parâmetros de qualidade de água

A qualidade da água do tanque de manutenção foi monitorada durante todos os períodos experimentais. A temperatura e salinidade da água foram gradualmente ajustadas para 20 $^{\circ}$ C e 30-35, respectivamente, sendo, na medida do possível, mantidas nestas faixas. A concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e pH foram medidos diariamente às 08h00min com um oxímetro OxyGuard, um termômetro de mercúrio, refratômetro manual ATAGO e um medidor de pH de bancada Mettler Toledo,

respectivamente. As concentrações de amônia total e de nitrito também foram aferidas diariamente, enquanto a concentração de nitrato e alcalinidade, uma vez por semana, de acordo com UNESCO (1983), AOAC (1990) e APHA (1998), respectivamente.



Figura 9: Tanque de manutenção e disposição das unidades experimentais utilizadas nos experimentos de condicionamento do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*). A direita da imagem pode se observar o resfriador utilizado para manter a temperatura em torno de em torno de 20,0°C.

Cultivo de microalgas e alimentação dos mariscos

O inóculo inicial para o cultivo das microalgas *C. muelleri* e *I. galbana* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Produção de Microalgas da EMA.

Para o experimento I, *C. muelleri* e *I. galbana* foram produzidas em sistema batch composto de 4 tanques de 500 L, com volume útil de 230 L de água do mar previamente filtrada (1 µm), salinidade 28, fotoperíodo 24 h de luz, aeração constante, inoculados com meio f/2 (Guillard, 1975) e 20 L de inóculo. Cerca de 15×10^4 cél/mL de *I. galbana* e *C. muelleri*, na proporção de 70 e 30%, respectivamente, foi fornecida aos mariscos do experimento I.

Para os experimentos II e III foi ofertada apenas uma dieta unialgal de *C. muelleri* na concentração de 10×10^4 cél/mL. O cultivo foi realizado em 10 carboys de 20 L preenchidos com 18 L de água do mar previamente filtrada (1 µm), salinidade 28, fotoperíodo de 24 h diárias de luz, aeração constante, inoculados com meio f/2 (Guillard, 1975) e 2 L de inóculo.

Em todos os casos, as microalgas foram fornecidas aos mariscos quando se encontravam na fase exponencial de crescimento populacional. A fim de manter uma constante disponibilidade de microalgas, a concentração era monitorada duas vezes ao dia e, havendo necessidade, mais microalgas eram adicionadas ao tanque de manutenção para manter a densidade e proporção estabelecidas.

Experimentos de indução à desova com condicionamento

A partir da temperatura de manutenção (20°C), três experimentos com o condicionamento dos mariscos por, pelo menos, 14 dias foram realizados. No 15º dia, os mariscos foram submetidos a variação abrupta da temperatura da água (“choque de temperatura”) com o objetivo de induzi-los a desovar.

Experimento I

O primeiro experimento consistiu no choque de temperatura em dez UEs (n = 10) cada uma contendo 4 mariscos. Após 14 dias mantidas nas condições acima descritas, as UEs foram drenadas e transferidas para baldes plásticos contendo 22 L de água do mar nas temperaturas de 23°C (três UEs), 26°C (quatro UEs) e 29°C (três UEs). Os *airlifts* permaneceram funcionando. A temperatura da água dos baldes utilizados em todos os choques térmicos e a temperatura dos sedimentos de cada UE foram monitoradas durante 60 min em intervalos de 5 min (Tabelas 3 e 4). Caso necessário, água resfriada (20°C) ou aquecida (29°C) era adicionada aos baldes com objetivo de manter estável a temperatura desejada. O tempo de imersão das UEs nos baldes com temperaturas mais elevadas foi 60 min.

Experimento II

Este experimento foi desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa foi idêntica ao experimento I, e consistiu em choques de temperatura em dez UEs (n = 10) contendo de 4 a 6 mariscos por UE. No 15º dia de condicionamento, as UEs foram drenadas e transferidas para baldes plásticos com 22 L de água do mar nas temperaturas de 23°C (três UEs), 26°C (quatro UEs) e 29°C (três UEs). Os *airlifts* permaneceram funcionando. A temperatura da água dos baldes e no sedimento de cada UE foram monitoradas a cada 5 min durante os 60 min que os baldes permaneceram imersos nos baldes com temperaturas mais elevadas. Quando necessário, água a 20°C ou a 29°C era adicionada aos baldes para manter estável a temperatura desejada.

A segunda etapa consistiu em manter as mesmas 10 UEs da etapa anterior no tanque de manutenção a 20°C por mais dois dias. No 18º dia, as UEs foram expostas, dessa vez por 120 min, a novos choques de temperatura, sendo cinco UEs imersas baldes a 24 °C e as outros cinco, a 26°C. A temperatura da água dos baldes e do sedimento em cada UE foram monitoradas no intervalo de 5 min.

Experimento III

Neste experimento, o manejo e os procedimentos experimentais foram idênticos ao primeiro experimento, com exceção das temperaturas de choque. Dessa vez, foram testadas as temperaturas de 23, 25 e 27°C.

Análises histológicas

Com o intuito de identificar o sexo e o estágio de maturação gonadal em diferentes momentos, amostras de mariscos foram realizadas e submetidas à análise histológica. No experimento I foram coletados 7 indivíduos, denominados M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7, antes da exposição aos choques térmicos. No segundo experimento foram amostrados 16 mariscos para análise histológica: cinco no início do experimento (M8 ao M12), um após a sua morte (M13), cinco antes do choque térmico da primeira etapa (M14 ao M18) e cinco após o segundo choque térmico (M19 ao M23). Dez mariscos do experimento II foram coletados, sendo 5 antes do início do período de condicionamento e os outros 5 após os 14 dias de condicionamento (e antes da exposição ao choque de temperatura).

Os animais foram fixados em formol salino a 20% até serem processados. Os tecidos foram cortados e colocados em cassetes devidamente identificados. As amostras foram processadas em processador automático Leica TP1020 com inclusão em Paraplast. Após o emblocamento, os blocos foram seccionados a 5 µm com um micrótomo Leica RM 2245 e corados com hematoxilina-eosina. As lâminas histológicas foram examinadas no microscópio óptico Zeiss Primo Star equipado com uma câmera e software AxioVision 4.8.2. e imagens foram obtidas. As gônadas foram classificadas em 7 estágios de desenvolvimento adaptando-se as propostas de Masello (1987) e Hermann *et al.* (2009) como descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Classificação dos estágios de desenvolvimento das gônadas do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) adaptada de Masello (1987) e Hermann *et al.* (2009).

Estágio da gônada	Descrição
Estágio 0: repouso sexual	Células imaturas aderidas às paredes dos folículos, presença de tecido conectivo abundante sem diferenciação, não há diferenciação sexual.
Estágio 1: estágio ativo inicial	Folículos pequenos e em pouca quantidade, gônias ainda estão aderidas a parede, distinção do sexo.
Estágio 2: estágio ativo final	Multiplicação e aumento do tamanho dos folículos, espermatogônia e espermatócito nos machos e oogonia e ovócitos pré-vitelogênicos nas fêmeas.
Estágio 3: estágio de maturação inicial	Folículos aumentam de tamanho e ocupam todo o tecido. Nas fêmeas, diminui o contato dos ovócitos com a parede celular diminui, ficando apenas unidas pelo pedúnculo que se afina à medida que a célula atinge a maturação. Nos machos, à medida que a maturação avança as células tendem a ocupar o interior do folículo, diminuindo o lúmen e as paredes celulares ficam mais finas.
Estágio 4: estágio maduro	Folículos de formato poligonal está quase cheio de gametas maduros, espermatozoides ocupam a maioria dos folículos e presença de ovócitos poligonais maduros livres no lúmen.
Estágio 5: estágio desova parcial	Presença de ovócitos maduros livres no lúmen e espaços vazios, espermatozoides perdem disposição radial e presença de ovócitos arredondados livres no lúmen e espaços vazios
Estágio 6: estágio desova total	Folículos pequenos e praticamente vazios e degradação residual de gametas
Estágio 7: estágio de recuperação	Folículos gonadais vazios, presença de células com movimento ameboide entre os folículos, perto das paredes e no centro. Só é possível distinguir os sexos, caso haja ovócitos remanescentes deformados ou difusos, espaços intercelulares muito amplos.

Adicionalmente, a condição imunológica dos mariscos foi estimada baseado em Santos *et al.* (2016). Para isso, a hemolinfa foi obtida por punção da cavidade pericárdica

e lâminas de esfregaços foram montadas, fixadas em metanol por 10 min na geladeira e em seguida coradas com Giemsa durante 20 min.

Experimentos de indução à desova sem condicionamento

Diferentemente dos experimentos anteriores, onde houve condicionamento dos mariscos em laboratório por um período mínimo de 14 dias, três outros experimentos foram realizados sem nenhuma espécie de condicionamento em laboratório. Estes experimentos serão denominados experimentos IV, V e VI.

Somente para estes três experimentos, um total de 429 animais com comprimento médio (\pm DP) de 58,94 mm (\pm 0,70) foi coletado na zona entre marés das Praia do Mar Grosso e Cassino, nos municípios de São José do Norte e Rio Grande, RS, respectivamente (Tabela 4). As médias (\pm DP) de temperatura e salinidade no momento das coletas foram, respectivamente, de 21,8°C (\pm 0,6) e 28,0 (\pm 2,5). Os mariscos foram transportados em caixas térmicas ao laboratório, onde foram selecionados, lavados e transferidos para um tanque de recepção com capacidade de 1.000 L, mas preenchido com 500 L de água com temperatura e salinidade semelhantes ao momento da coleta. Quatro pedras porosas conectadas ao sistema de ar comprimido do laboratório foram introduzidas no tanque para manter os níveis de oxigênio dissolvido.

Os três experimentos consistiram na exposição dos mariscos a diferentes tipos de tratamentos, os quais foram realizados de forma abrupta (“choque”) e sem nenhuma espécie de condicionamento prévio. Após a exposição aos diferentes tratamentos, os animais foram mantidos até a manhã do dia seguinte (*overnight*), quando foi observada a ocorrência de desovas. Para isso, o conteúdo dos recipientes era filtrado em uma peneira de 25 μ m e três alíquotas de 1 mL eram coletadas para verificar a ocorrência de desovas e fazer a eventual contagem de ovócitos ou zigotos fertilizados com uma câmara de Sedgewick-Rafter.

Após o *overnight*, os mariscos foram secos com papel toalha e tiveram o comprimento total, altura total, peso úmido total e peso seco medidos conforme descrito anteriormente. Os exemplares destes três experimentos também foram amostrados para a realização de análises histológicas da mesma forma que descrito anteriormente para os mariscos dos experimentos com condicionamento.

Experimento IV

Neste experimento foram testados três níveis de temperatura (23, 25 e 27°C) associados à adição de 100 mL de um extrato de espermatozoides obtido de três machos. As amostras foram diluídas em 100 mL de água do mar em uma das temperaturas de choque (23, 25 ou 27°C). Para mensuração da concentração espermática, amostras de 1 mL do extrato foram coletadas e fixadas em Lugol, sendo contados os espermatozoides presentes em 5 dos 25 campos da câmara de Neubauer. A concentração de espermatozoides por mL foi calculada segundo a equação (CBRA, 1998):

$$C_{spz} = \left(\frac{\sum Spz}{2} \right) \times 100 \times 0,5 \times 10^6$$

C_{spz} = concentração de espermatozoides por mL

$\sum Spz$ = média do total de espermatozoides contados em 5 quadrados nas duas câmaras

100 = fator de diluição da amostra (1:100)

$0,5 \times 10^6$ = quantidade de espermatozoides em 1 mL de amostra

O experimento foi realizado em tanques pretos circulares preenchidos com 25 L de água nas mesmas condições do tanque de recepção dos mariscos. Os mariscos foram mantidos nos tanques direto no fundo do tanque ou inseridos em tubos de PVC, conforme a Figura 7. A exposição simultânea à temperatura elevada (23, 25 ou 27°C) e ao extrato de espermatozoides teve a duração de 60 min e contou com um total de 40 indivíduos, dos quais 20 foram colocados diretamente no fundo e 20 inseridos nos tubos de PVC. Após os 15 min iniciais, 10 animais colocados diretamente sobre o fundo retornaram ao tanque de recepção, onde permaneceram por 15 min expostos a água na temperatura de cerca de 20°C. Estes mariscos foram então novamente transferidos para o tanque com a temperatura experimental (23, 25 ou 27°C) até completar 60 min.

A concentração final de espermatozoides (C_f) disponível no tanque foi determinada dividindo o total de espermatozoides encontrado no extrato (C_{spz}) pelo volume útil de água do tanque durante o choque (V).

$$C_{spT} = \frac{C_{spz}}{V}$$

C_{spT} = conc. espermatozoides no tanque (esperm/mL)

V = volume útil utilizado em mL

Cspz = espermatozoides por mL

Aos 45 min finais, 100 mL de extrato de espermatozoides com concentração média de 710.000, 694.000 e 862.000 espermatozoides/mL, respectivamente, foi adicionado nos tratamentos 23, 25 e 27°C. Após 60 min, os animais foram transferidos para o tanque de recepção, onde foram mantidos separadamente a 21°C e aeração constante até o dia seguinte (*overnight*). Na manhã seguinte foi verificada a ocorrência de desovas.

Experimento V

Como a temperatura e a salinidade no momento da coleta dos mariscos utilizados neste experimento era 22,5°C e 28, respectivamente (Tabela 4), quatro tratamentos foram propostos:

- 1) choque de temperatura (de 22 para 25,5°C);
- 2) choque de temperatura (de 22 para 25,5°C) associado à adição de extrato de espermatozoides na concentração de 693.750 espermatozoide.mL⁻¹ a cada 30 min;
- 3) choques de temperatura (de 22 para 25,5°C) e de salinidade (de 28 para 35);
- 4) choque de temperatura (de 22 para 25,5°C) associado à adição de peróxido de hidrogênio 6% em meio alcalinizado (pH 8,72).

Em cada tratamento, 20 animais foram acondicionados em caixas plásticas pretas com capacidade de 100 L e preenchidas com 20 L (Figura 10A). Embora a duração dos tratamentos tenha sido de 60 min, os mariscos de cada tratamento foram mantidos no *overnight* em baldes de 20 L preenchidos com 10 L de água e aeração constante. Cada tratamento teve 3 repetições com 6 mariscos por balde. Os baldes foram mantidos em *overnight* em um banho-maria em um tanque de 1.000 L com a temperatura média de 25,5°C graças a um termostato (Figura 11). Na manhã seguinte, o conteúdo dos baldes foi filtrado para verificar a ocorrência de desovas e eventual contagem de ovócitos ou zigotos fertilizados.



Figura 10: Exemplos do marisco branco *Amarilladesma mactroides* do Experimento V (A) e VI (B) submetidos a diferentes tratamentos de indução à desova.

Após a confirmação da ocorrência de desovas, o material filtrado foi transferido para baldes individuais. Decorridas 18 h da fertilização, três alíquotas de 1 mL de cada balde foram amostradas para estimar o número de ovos não eclodidos e de larvas trocóforas. Os estágios larvais foram observados em microscópio Nikon E3100 e fotografados com câmera Nikon D3200 no aumento de 10 x.



Figura 11: Tanque de 1.000 L utilizado para a manutenção dos baldes com mariscos branco (*Amarilladesma mactroides*) mantidos durante a noite (overnight) após as tentativas de indução à desova nos experimentos V e VI.

Experimento VI

Este experimento utilizou mariscos coletados na praia do Cassino, Rio Grande, RS, e que possuíam um comprimento médio de 59,0 mm. No momento da coleta, a temperatura e salinidade eram 21,8°C e 31, respectivamente (Tabela 4).

Foram testados os seguintes tratamentos:

- 1) choque de temperatura (de 22 para 26°C);
- 2) choques de temperatura (de 22 para 26°C) e pH (aumento para 9,15);
- 3) choque de temperatura (de 22 para 26°C) associado à adição de peróxido de hidrogênio (~ 5,5 mμ);
- 4) choque de temperatura (de 22 para 26°C) associado à adição de peróxido de hidrogênio (~ 5,5 mμ) em meio alcalinizado (pH 8,83).

Cada tratamento foi realizado com três repetições e 6 animais por repetição. A água utilizada em cada tratamento foi preparada previamente. Os tratamentos foram realizados em baldes de 20 L com volume útil de 10 L providos de aeração moderada (Figura 10 B). Após o tratamento, os baldes foram lavados e preenchidos apenas com água do mar e os animais foram mantidos no *overnight* (Figura 11).

Na manhã seguinte, o conteúdo dos baldes de todos os tratamentos foram filtrados para verificar se houve desova e fazer a contagem dos ovócitos e zigotos fertilizados. A contagem foi realizada em câmara de Sedgewick-Rafter e as amostras foram fotografadas com câmera Nikon D3200 no aumento de 10x.

Após a confirmação da ocorrência de desova, o material filtrado foi transferido para baldes individuais. Decorridas 18 h do provável momento de fertilização, três amostras de 1 mL foram retiradas de cada balde, e o número de larvas trocóforas e de ovos não eclodidos foram estimados.

Análises estatísticas

Experimentos I, II e III

Inicialmente, os dados foram testados quanto aos pressupostos necessários (Normalidade, independência e homocedasticidade) para a aplicação das análises de variância de uma e duas vias (ANOVA) e covariância (ANCOVA).

A comparação do comprimento inicial, peso total inicial, largura inicial, peso seco final entre os tratamentos foi verificada através da ANOVA de uma via. A análise dos dados de comprimento, peso total e largura final entre os tratamentos foram realizadas através da ANCOVA. A comparação dos parâmetros largura inicial e final entre os

experimentos foi verificada utilizando ANOVA de duas vias, tendo experimento e temperatura como fatores. Os parâmetros finais de comprimento e peso foram testados através da ANOVA não paramétrica e teste de Kruskal Wallis. O peso seco inicial dos indivíduos dos experimentos II e III foi comparado pelo teste *t-Student*, enquanto o peso seco final foi comparado por ANOVA de uma via. Diferenças na sobrevivência entre experimentos e entre tratamentos foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado e pelo método de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram construídas usando as datas de estocagem e mortalidade de cada indivíduo.

O índice de condição foi verificado através de ANOVA de uma via e os fatores de condição por ANOVA não paramétrica e teste de Kruskal Wallis. Os ovócitos medidos foram aleatoriamente selecionados, mas sendo apenas foram considerados aqueles que o núcleo estivesse visível. Os diâmetros dos ovócitos foram medidos usando o software ImageJ e, para cada experimento, foram analisadas fêmeas no início e no fim do período experimental por ANOVA de uma via.

Com exceção do comprimento inicial do experimento I, largura final do experimento II e do peso seco final dos experimentos, cuja normalidade e a homogeneidade foram verificadas respectivamente através dos testes de Cochran-Bartlett e Shapiro-Wilk, Levene e Kolgomorov, Levene e Kolgomorov, as demais análises foram verificadas através dos testes de Levene e Shapiro-Wilk. Para a análise da ANCOVA, a homogeneidade da declividade das retas também foi checada. Quando os pressupostos não foram atendidos, foi realizada a transformação pelo arcoseno da raiz quadrada (\sqrt{x}) ou $\log(x)$. A ocorrência de diferenças significativas entre tratamentos e experimentos foi inicialmente verificada através *post-hoc* Tukey HSD (parâmetros iniciais) ou Tukey desigual (parâmetros finais).

Experimentos IV, V e VI

Os resultados de comprimento total, peso total, peso seco, largura total e fator de condição foram inicialmente testados quanto aos pressupostos de normalidade (teste de Levene), homocedasticidade (Shapiro-Wilk) e independência para uso da análise de variância (ANOVA) de uma via nos experimentos IV e V. O fator de condição e o peso seco foram transformados pela função $\text{Log}(x)$ para atender os pressupostos. No experimento VI, o comprimento total foi avaliado por ANOVA não paramétrica e teste de Kruskal Wallis. O sucesso da indução à desova foi avaliado pela presença ou ausência de gametas após o *overnight*. Os tratamentos de indução à desova nos experimentos V e

VI foram avaliados por ANOVA não paramétrica e teste de Kruskal-Wallis. Os diâmetros maior e menor de 15 ovócitos escolhidos aleatoriamente, mas com núcleo visível, foram medidos de cada fêmea com o software ImageJ e avaliados por ANOVA de uma via. Diferenças na sobrevivência entre os tratamentos dos experimentos foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado e pelo método de Kaplan-Meier.

Independente de experimento, todas as análises foram efetuadas ao nível de significância de 0,05. Os dados foram analisados e plotados com os softwares Statistica 13.3, Past 3.2.1 e GraphPad Prism 8.0.

Resultados

Experimentos com condicionamento

Os valores médios das variáveis de qualidade de água nos três experimentos com condicionamento podem ser observados na tabela 6. A temperatura variou de 17,7 a 20,2°C, enquanto a salinidade média, de 23,7 a 30,7. As concentrações médias de oxigênio dissolvido permaneceram próximas de 7 mg.L⁻¹. As concentrações de amônia total e nitrito foram relativamente estáveis e com valores nas faixas de 0,04-0,06 e 0,01-0,08 mg.L⁻¹, respectivamente. Por sua vez, as concentrações de nitrato se mantiveram abaixo de 3,5 mg.L⁻¹. A alcalinidade média sempre foi superior à 130 mg.L⁻¹.

Tabela 6: Médias (\pm DP) das variáveis de qualidade de água nos três experimentos com condicionamento do marisco branco *Amarilladesma mactroides* com duração de 14 a 18 dias.

	Experimento I	Experimento II	Experimento III
Temperatura (°C)	20,17 \pm 0,31	19,95 \pm 0,23	17,69 \pm 1,56
Salinidade	30,73 \pm 0,70	29,63 \pm 0,50	23,71 \pm 1,31
pH	7,80 \pm 0,24	7,71 \pm 0,26	7,49 \pm 0,14
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	7,35 \pm 0,11	6,98 \pm 0,14	7,77 \pm 0,62
Amônia total (mg.L ⁻¹)	0,04 \pm 0,02	0,06 \pm 0,05	0,05 \pm 0,02
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,08 \pm 0,05	0,05 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01
Nitrato (mg.L ⁻¹)	3,16 \pm 0,30	1,00 \pm 1,34	2,79 \pm 2,20
Alcalinidade (mg.L ⁻¹)	150,00 \pm 0,00	160,00 \pm 10,00	130,00 \pm 7,07

O consumo diário de microalgas por indivíduo, tanto de dietas bialgal como unialgal, foi distinto entre os experimentos. No experimento I, o consumo diário da dieta bialgal (*I. galbana* e *C. muelleri*, 70:30) variou de 1 x 10³ cél/mL a 2,5 x 10³ cél/mL por indivíduo (Figura 12). O consumo diário de *C. muelleri* por indivíduo variou de 0,2 x 10³

a $1,7 \times 10^3$ cél/mL no experimento II, (Figura 13), enquanto no experimento III oscilou entre $0,75 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^3$ cél/mL (Figura 14).

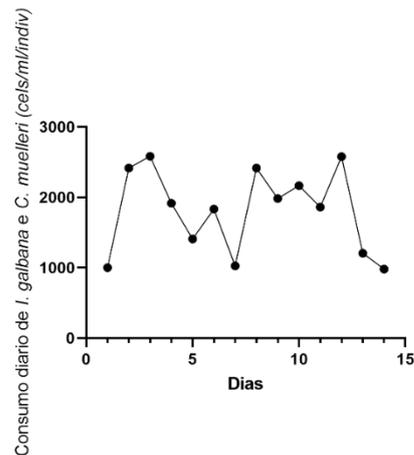


Figura 12: Média do consumo diário da dieta bialgal (*Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri*) estimado para cada indivíduo ($\text{cél.mL}^{-1}.\text{indivíduo}^{-1}$) do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) durante os 14 dias do experimento I.

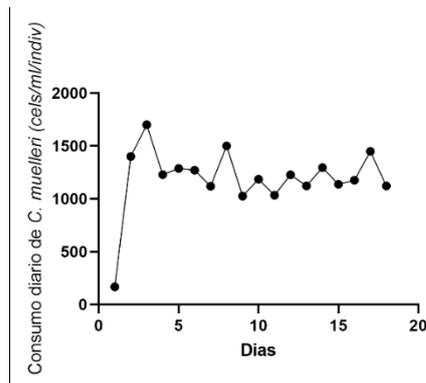


Figura 13: Média de consumo diário de *Chaetoceros muelleri* ($\text{cél.mL}^{-1}.\text{indivíduo}^{-1}$) do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) durante os 17 dias do experimento II.

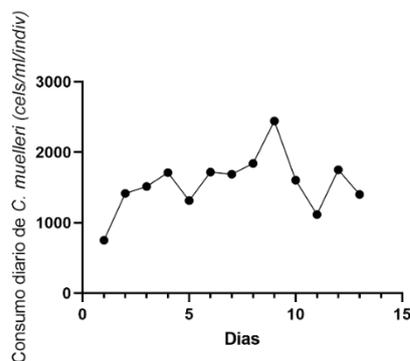


Figura 14: Média do consumo diário de *Chaetoceros muelleri* ($\text{cél.mL}^{-1}.\text{indivíduo}^{-1}$) do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) durante o período de 14 dias do experimento III.

Os mariscos não apresentaram diferenças significativas de comprimento total ($p>0,50$), peso ($p=0,731$) e largura ($p=0,412$) no início do experimento I (Tabela 7). Diferenças significativas de comprimento ($p=0,481$), peso e largura final ($p=0,058$) também não foram encontradas nos mariscos ao final desse experimento. Contudo, o comprimento final dos mariscos foi influenciado em 63% pelo comprimento inicial dos animais ($F = 69,6$; $p<0,05$).

Tabela 7: Médias (\pm DP) de comprimento inicial (CTi) e final (CTf), peso úmido inicial (PUI) e final (PUF), largura inicial (Li) e final (Lf) e peso seco final (PSf) dos exemplares de marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) mantidos a 20°C por 14 dias e expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 26 ou 29°C) no experimento I.

	23°C	26°C	29°C
CTi	52,86 \pm 0,41	52,79 \pm 0,36	52,92 \pm 0,43
CTf	53,39 \pm 0,25	53,21 \pm 0,22	53,05 \pm 0,25
Pui	13,27 \pm 0,39	12,87 \pm 0,34	13,14 \pm 0,40
Li	28,89 \pm 0,27	28,46 \pm 0,23	28,44 \pm 0,27
Lf	28,92 \pm 0,16	28,80 \pm 0,13	28,89 \pm 0,17
PUF	12,59 \pm 0,12	12,56 \pm 0,10	12,71 \pm 0,12
PSf	4,90 \pm 0,13	4,82 \pm 0,10	5,03 \pm 0,14

Assim como no experimento I, o comprimento total inicial e final ($p=0,57$ e $p=0,61$, respectivamente), largura inicial e final ($p=0,54$ e $p=0,99$) e peso úmido inicial e final ($p=0,47$ e $p=0,03$) dos mariscos no experimento II não se diferenciaram significativamente (Tabela 8). O peso úmido final dos mariscos foi modulado significativamente em 79% pelo peso inicial dos animais ($F=107,52$ e $p=0,000001$). A largura final foi afetada pela largura inicial em 64% ($F= 48,90$; $p=0,0000001$). O comprimento final foi afetado pelo comprimento final em 48% ($p=0,000028$).

No experimento III, foram encontradas diferenças significativas na largura ($p=0,015$) e no comprimento inicial ($p=0,03$) dos mariscos (Tabela 9). Os mariscos do tratamento 27°C tinham comprimento e largura inicial significativamente maiores do que os de 25°C. Também foram encontradas diferenças significativas na largura final dos mariscos ($p=0,00007$), sendo os mariscos dos tratamentos 23 e 27°C maiores que os de 25°C. Não houveram diferenças significativas no peso total inicial e final dos animais (PUI, $p=0,17$ e PUF, $p= 0,485$) dos tratamentos do experimento III (Tabela 5). O peso

final foi influenciado pelo peso inicial em 64% ($F=76,32$ e $p= 0,00000000004$). O peso seco final dos mariscos não diferiu entre os tratamentos ($p=0,07$).

Tabela 8: Média (\pm DP) do comprimento total inicial (CTi) e final (CTf), peso úmido inicial (Pui) e final (PUf), largura inicial (Li) e final (Lf) e peso seco final (PSf) dos mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 26 ou 29°C) no experimento II.

	23°C	26°C	29°C
CTi	61,88 \pm 0,59	62,25 \pm 0,52	62,77 \pm 0,60
CTf	62,19 \pm 0,76	62,86 \pm 0,58	62,48 \pm 0,67
Pui	19,73 \pm 0,67	20,64 \pm 0,58	20,83 \pm 0,67
PUf	21,59 \pm 0,45	21,45 \pm 0,35	20,97 \pm 0,40
Li	32,94 \pm 0,35	33,46 \pm 0,31	33,33 \pm 0,36
Lf	33,37 \pm 0,34	33,36 \pm 0,27	33,33 \pm 0,31
PSf	7,97 \pm 0,45	7,78 \pm 0,35	7,75 \pm 0,40

A comparação entre os mariscos dos experimentos I, II e III indicou que a maioria dos parâmetros biométricos analisados apresentaram diferenças significativas (Tabela 10). De modo geral, os mariscos do experimento II apresentaram Pui, PUf, CTi, CTf, Li, Lf, PSi e PSf significativamente maiores do que os indivíduos dos experimentos I e III.

O índice de condição final (Cif) não diferiu significativamente entre os mariscos dos três experimentos ($p=0,4640$). Por outro lado, os fatores de condição inicial (CFi) foram significativamente maiores nos mariscos do experimento I do que nos mariscos dos demais experimentos (Tabela 10; $p=0,00$ e $R=161,38$). Do mesmo modo, houveram diferenças significativas entre o fator de condição final (CFf) dos experimentos, sendo o CFf dos mariscos dos experimentos I e II maiores que o de III (Tabela 10; $p=0,0231$ e $R=104,20$).

Do ponto de vista sanitário, todos os animais se observaram macroscopicamente normais, ou seja, não havia nenhuma indicação visual da ocorrência de patologias. Embora os esfregaços de hemolinfa não possam ser usados categoricamente para definir se os animais estão mais ou menos imunoestimulados, a observação dos aspectos qualitativo e quantitativo das diferentes populações de hemócitos se observaram dentro dos limites normais, conforme definido por Santos *et al.* (2016) para essa espécie. O pigmento escuro observado na borda dos mantos (Figura 15) foi identificado como

melanina, sendo normalmente encontrado em moluscos de areia como resultado da alta atividade fagocítica.

Tabela 9: Médias (\pm DP) do comprimento total inicial (CTi) e final (CTf), peso úmido inicial (PUI) e final (PUf), largura inicial (Li) e final (Lf) e peso seco final (PSf) dos mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 25 e 27°C) no experimento III.

	23°C	25°C	27°C
CTi	57,27 \pm 0,53 ^{ab}	55,71 \pm 0,53 ^b	57,61 \pm 0,53 ^a
CTf	57,23 \pm 0,28	57,06 \pm 0,28	56,60 \pm 0,30
Li	30,27 \pm 0,31 ^{ab}	29,66 \pm 0,30 ^b	30,94 \pm 0,30 ^a
Lf	30,83 \pm 0,13 ^a	30,05 \pm 0,12 ^b	31,11 \pm 0,14 ^a
PUI	14,99 \pm 0,56	13,76 \pm 0,56	15,15 \pm 0,56
PUf	16,48 \pm 0,40	16,36 \pm 0,43	16,03 \pm 0,40
PSf	5,71 \pm 0,21	5,63 \pm 0,19	6,28 \pm 0,21



Figura 15: Coleta de tecidos do marisco branco *Amarilladesma mactroides* realizada antes do condicionamento dos indivíduos no experimento II, onde verifica-se a presença de melanina na borda do manto.

Tabela 10: Taxas de sobrevivência (S; %) e médias (\pm DP) do peso úmido inicial e final (PUi e PUF; g), comprimento total inicial e final (CTi e CTf; mm), largura inicial e final (Li e Lf; mm), peso seco inicial e final (PSi e PSf; g), índice de condição final (Cif) e fator de condição inicial e final (CFi e CFf) dos mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) mantidos em laboratório por, pelo menos, 14 dias e expostos à choques de diferentes temperaturas nos experimentos I, II e III.

	Experimento I	Experimento II	Experimento III
S	88,3	71,8	76,6
CTi	52,66 \pm 0,38 ^c	61,98 \pm 0,38 ^a	56,84 \pm 0,34 ^b
CTf	53,10 \pm 1,37 ^c	62,43 \pm 2,75 ^a	56,89 \pm 2,68 ^b
Li	28,36 \pm 0,22 ^c	32,99 \pm 0,23 ^a	30,24 \pm 0,20 ^b
Lf	28,87 \pm 0,25 ^c	33,35 \pm 0,28 ^a	30,66 \pm 0,24 ^b
PUi	11,74 \pm 0,34 ^c	19,43 \pm 0,35 ^a	14,29 \pm 0,31 ^b
PUf	12,48 \pm 1,25 ^c	21,26 \pm 3,06 ^a	16,23 \pm 2,57 ^b
PSi	-	8,87 \pm 0,91 ^a	5,25 \pm 0,49 ^b
PSf	5,12 \pm 0,15 ^c	8,02 \pm 0,18 ^a	6,18 \pm 0,14 ^b
Cif	24,38 \pm 2,02	21,08 \pm 1,91	21,82 \pm 1,43
CFi	0,58 \pm 0,04 ^a	0,31 \pm 0,02 ^c	0,41 \pm 0,05 ^b
CFf	0,58 \pm 0,01 ^a	0,33 \pm 0,01 ^c	0,48 \pm 0,01 ^b

As taxas de sobrevivência dos diferentes experimentos variaram de 71,8 a 88,3% (Figura 16), não diferindo significativamente entre si (Chi-quadrado=2,9211 e p=0,23). Entre as diferentes temperaturas que os mariscos foram submetidos também não foram observadas diferenças significativas (Chi-quadrado= 3,1625 e p=0,53), pois as taxas de sobrevivência variaram de 66,7 a 77,8% (Figura 17).

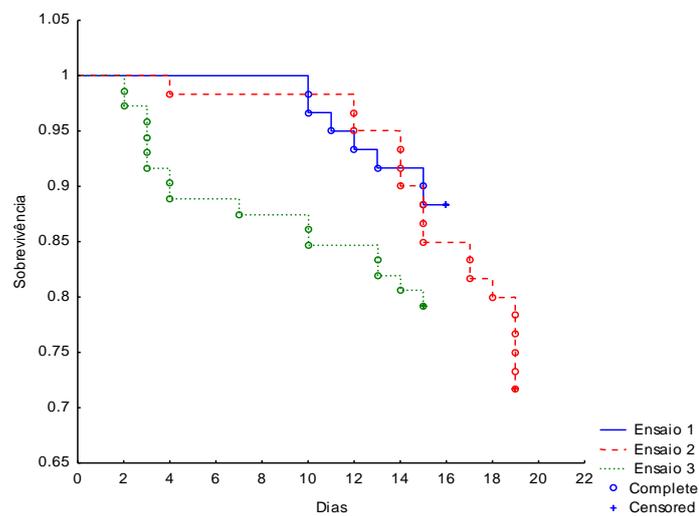


Figura 16: Curva cumulativa de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando os grupos de mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) utilizados nos experimentos I, II e III em relação à duração do período experimental (dias).

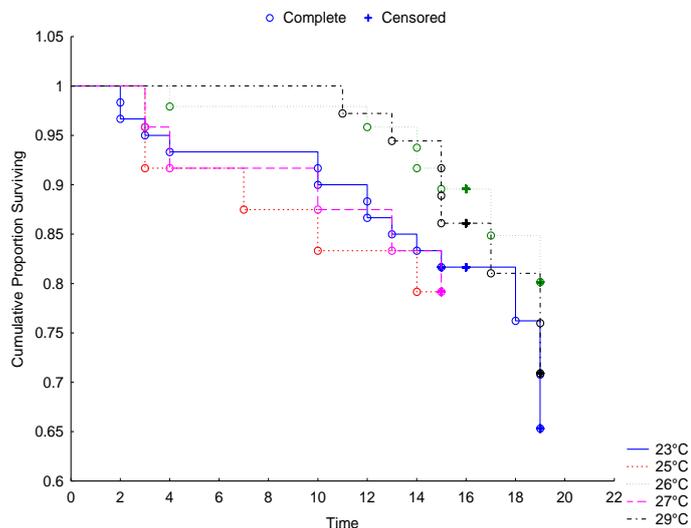


Figura 17: Curva cumulativa de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando os grupos de mariscos brancos (*Amarilladesma mactroides*) submetidos as temperaturas de 23, 25, 26, 27 ou 29°C nos experimentos I, II e III em relação à duração do período experimental (dias).

A manipulação térmica não resultou na desova dos mariscos em nenhum dos três experimentos com condicionamento (Experimentos I, II e III).

As análises histológicas comprovaram que todos os cinco mariscos amostrados ao final do experimento I eram machos e se encontravam em estágio imaturo após duas semanas de condicionamento (Figura 18).

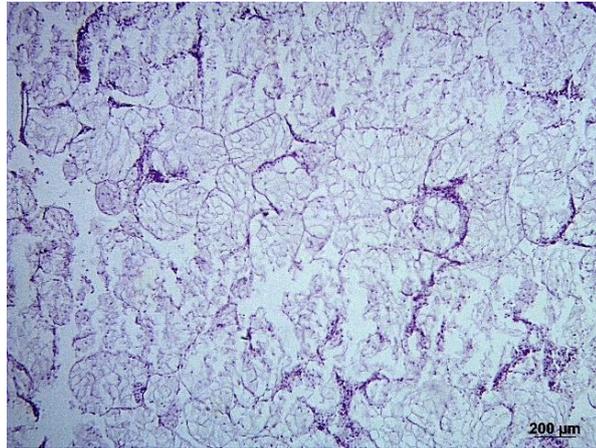


Figura 18: Secção histológica da gônada de um macho do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) do experimento I após 14 dias de condicionamento.

A análise das lâminas histológicas sugere que as gônadas dos mariscos do experimento II, amostrados no início de período experimental, se encontravam em estágio mais avançado de desenvolvimento quando comparados aos indivíduos ao final do experimento I (Figura 19A). Dos cinco animais analisados no início do experimento, quatro eram fêmeas e um macho. Este se encontrava no estágio de repouso sexual (Figura 19B) e a fêmea amostrada se encontrava em estágio de desova total (Figura 19A).

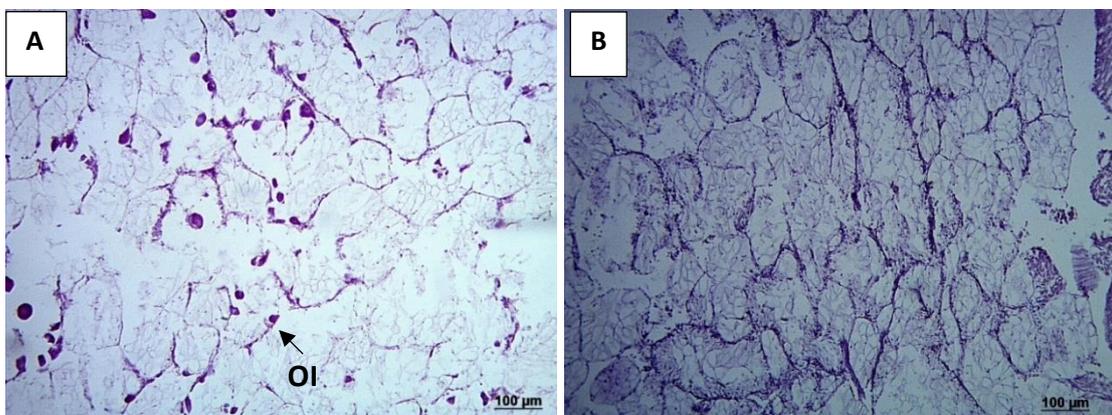


Figura 19: Secções histológicas de tecidos do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) amostrados no início do experimento II: (A) gônada de uma fêmea com ovócitos residuais e imaturos no estágio 6, ou de desova total e (B) macho no estágio 7, ou de repouso sexual.

Ainda no experimento II, quatro fêmeas e um macho foram amostrados antes dos choques de temperatura. A histologia da gônada de uma dessas fêmeas permite observar ovócitos imaturos (OI), maduros (OPM) e residuais (OR), tendo os OI o formato peduncular e estão aderidos à parede (Figura 8). Há uma maior quantidade de ovócitos arredondados livres no lúmen e envoltos por tecido conectivo, assim como alguns ovócitos poligonais maduros que serão reabsorvidos (Figura 20), indicando que a fêmea se encontrava no estágio 5 (desova parcial). Por sua vez, o macho estava no estágio 5 (desova parcial), com a presença de espermatogônias e espermatozoides maduros (Figura 21).

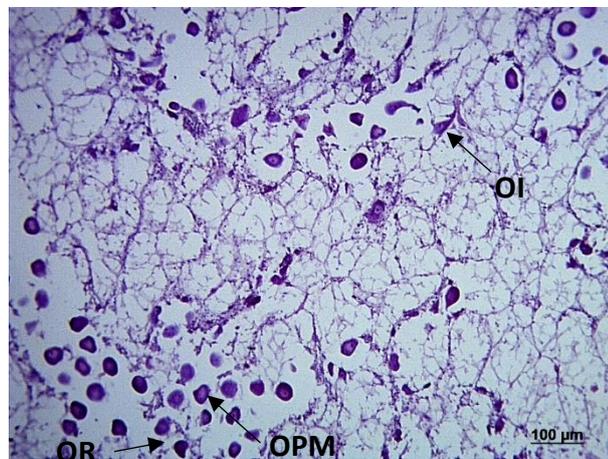


Figura 20: Secção histológica da gônada de fêmea do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) após o período de condicionamento no experimento II, onde podem ser observados ovócitos imaturos de formato peduncular e aderidos à parede (OI), alguns ovócitos maduros poligonais (OPM) e ovócitos residuais (OR).

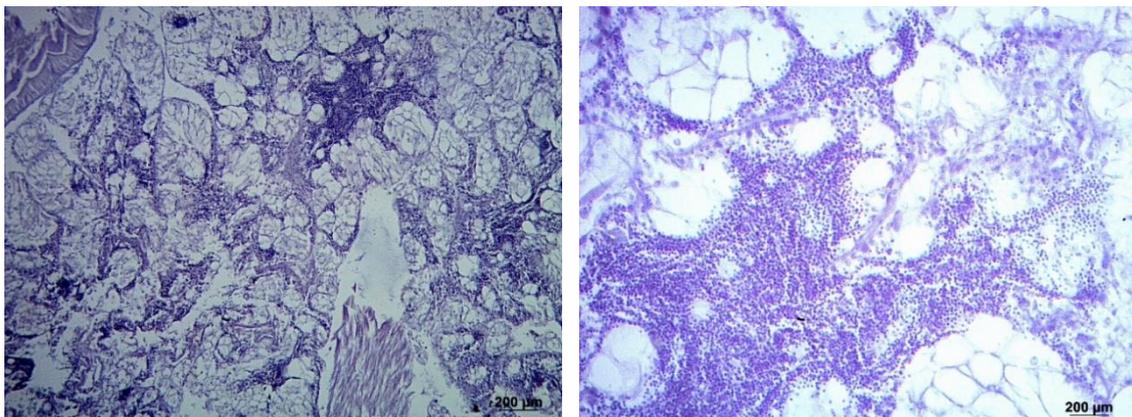


Figura 21: Secções histológicas de machos do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no estágio 5 de maturação sexual após o período de condicionamento (14 dias) no experimento II, onde podem ser observadas espermatogônias e espermátides maduras.

Cinco animais foram analisados antes da segunda etapa de indução à desova do experimento II. Dentre eles, três fêmeas, um macho e um hermafrodita. Uma fêmea contava com ovócitos poligonais maduros e vários ovócitos arredondados, indicando maturação inicial. O macho também apresentou espermatozoides maduros e espermátides e espermatogônias maduras, mas estes sem disposição radial característicos do estágio de desova parcial (Figura 22).

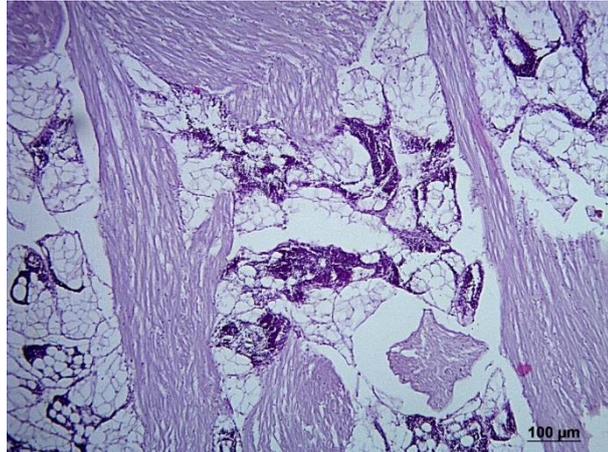


Figura 22: Secção histológica de macho do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no estágio 5 de maturação sexual após o período de condicionamento (14 dias) no experimento II, onde podem ser observados espermatozoides maduros, espermátides e espermatogônias maduras.

No início do experimento III, duas fêmeas e três machos foram histologicamente analisados. Ambas as fêmeas se encontravam no estágio 3, e uma das fêmeas analisadas apresentava ovócitos poligonais maduros, alguns ovócitos imaturos aderidos a parede folicular, parede folicular espessa e surgimento de espaços vazios (Figura 23). De modo similar, os machos analisados também apresentavam características do estágio sexual 3. Um dos machos apresentava canais de espermatozoides de coloração lilás e bem centralizados no folículo. A parede folicular predominava de ninhos de espermatócitos e dentro do folículo se concentravam espermátides (Figura 24). Quando comparado aos experimentos I e II, os mariscos do experimento III se encontravam num estágio de maturação mais avançado, mas não maduros o suficiente para desovar.

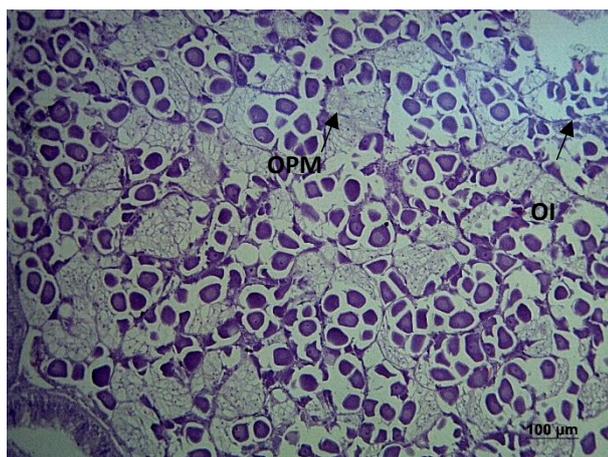


Figura 23: Secção histológica da gônada de fêmea do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no estágio 3 no início do experimento III, onde podem ser observados ovócitos imaturos (OI) e vários ovócitos maduros poligonais (OPM).

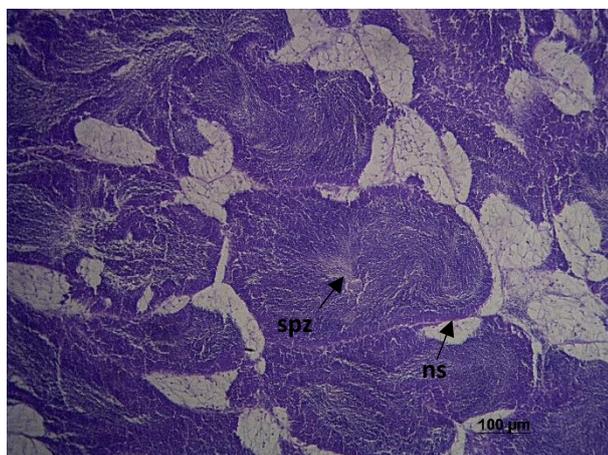


Figura 24: Secção histológica de macho do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no estágio 3 de maturação sexual amostrados no início do experimento III, onde podem ser observados espermatozoides radiais (spz) dentro do folículo e ninhos de espermatócitos (ns).

Assim como no experimento II, antes de ser realizada a indução à desova, cinco indivíduos do experimento III foram amostrados, sendo todas fêmeas. Duas delas se encontravam no estágio 4 de maturação sexual, com grande número de ovócitos poligonais livres no lúmen (Figura 25).

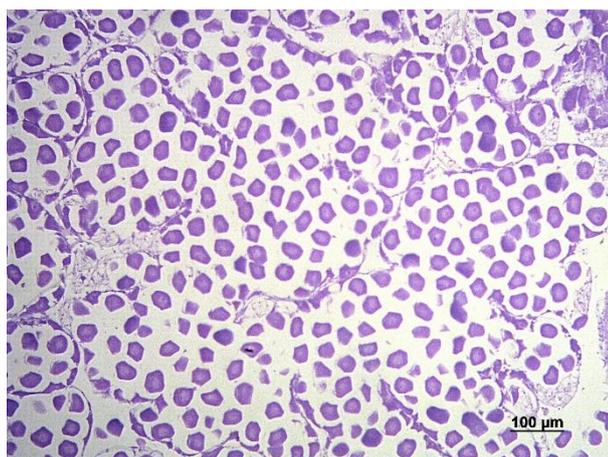


Figura 25: Secção histológica de fêmea de marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no estágio 4 de maturação sexual após 14 dias de condicionamento em laboratório e antes da exposição ao choque térmico no experimento III.

Os diâmetros maiores (DM) e menores (dm) dos ovócitos, avaliados no início e ao fim do período de condicionamento, foram significativamente maiores no experimento III do que no experimento II (Tabela 11).

Tabela 11: Médias (\pm DP) dos diâmetros maiores (DM) e menores (dm) dos ovócitos das fêmeas do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) no início e fim dos 14 dias de condicionamento nos experimentos II e III. Letras superscritas maiúsculas indicam diferenças significativas entre experimentos (Teste t-Student), enquanto as minúsculas indicam diferenças significativas entre DM ou dm em um mesmo experimento (ANOVA uma via).

Experimento	DM _i	DM _f	dm _i	dm _f
II	27,62 \pm 7,37 ^{Bb}	32,26 \pm 2,71 ^{Ba}	20,31 \pm 7,43 ^{Bb}	27,04 \pm 4,32 ^{Ba}
III	40,82 \pm 6,51 ^{Aa}	44,17 \pm 5,39 ^{Aa}	31,71 \pm 4,56 ^{Ab}	36,37 \pm 3,84 ^{Aa}

No experimento II, embora tenha sido possível medir os ovócitos de apenas uma fêmea no período inicial e de duas após o condicionamento, tanto o DM como o dm foram significativamente maiores após o período de condicionamento em laboratório (Tabela 11). No experimento III, os dm foram significativamente maiores após o período de condicionamento. Por outro lado, apesar de ter sido observada uma tendência de aumento do DM após o período de condicionamento, essa diferença foi apenas numérica, não sendo detectada diferença significativa.

Experimentos sem condicionamento

Os mariscos não apresentaram diferenças significativas de comprimento total ($p=0,86$), peso total ($p=0,39$), largura total ($p=0,94$), peso seco ($p=0,34$) e fator de condição ($p=0,11$) no experimento IV (Tabela 12).

Tabela 12: Médias (\pm DP) de comprimento total (CT), peso total (PT), largura total (LT), peso seco (PS) e fator de condição (CF) de exemplares de marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) sem serem condicionados e expostos à choques abruptos de diferentes temperaturas (23, 25 ou 27°C) no experimento IV.

	23	25	27	<i>p</i>
CT	60,04 \pm 0,67	59,62 \pm 0,68	60,11 \pm 0,67	0,86
LT	32,70 \pm 0,39	32,67 \pm 0,39	32,52 \pm 0,39	0,94
PT	18,95 \pm 0,62	18,04 \pm 0,62	17,81 \pm 0,62	0,39
OS	7,13 \pm 0,24	6,71 \pm 0,24	6,67 \pm 0,24	0,34
CF	1,98 \pm 0,47	2,09 \pm 0,48	2,11 \pm 0,47	0,11

Apesar de não ter sido observada a ocorrência de desovas logo após a exposição dos mariscos aos tratamentos experimentais, na manhã seguinte (*overnight*) foi verificada a presença de espuma esbranquiçada na superfície da água de alguns tanques. O volume total do tanque foi filtrado em peneira de 25 μ m e observou-se a presença de ovócitos e zigotos fertilizados (Figura 26) e, após 48 h, o aparecimento de larvas véliger (tipo “D”) (Figura 27). Apesar de termos a ocorrência de desova nos tratamentos submetidos ao choque de temperatura associado ao extrato de espermatozoides, não se pode afirmar com exatidão que tratamento levou à desova, já que, após a indução térmica, todos os mariscos foram acondicionados em um único tanque para o *overnight*.

As análises histológicas mostraram que, dos cinco os mariscos amostrados, quatro eram fêmeas e um era macho e todos se encontravam no estágio 5 - desova parcial (Figuras 28 e 29). Na figura 28, pode ser observado os ovócitos com formato poligonais maduros livres no lúmen (OPM) e espaços vazios, as paredes foliculares deformadas com rupturas e aparecimento de ovócito em degradação (OD). Na figura 29, a ausência dos canais de espermatozoides no centro do folículo, as paredes do folículo possuem rupturas e presença de elementos imaturos nas paredes.

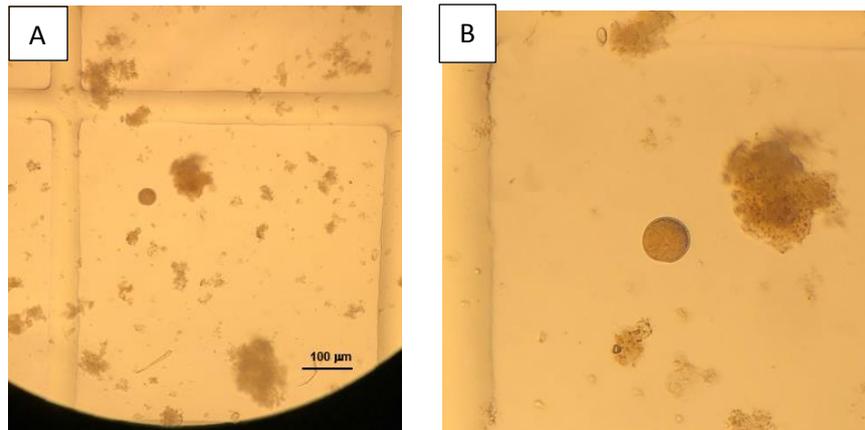


Figura 26: Presença de zigotos fertilizados no tanque de manutenção após 18 h dos mariscos (*Amarilladesma mactroides*) terem sido expostos ao estímulo de variação abrupta de temperatura associado à adição de extrato de espermatozoides.

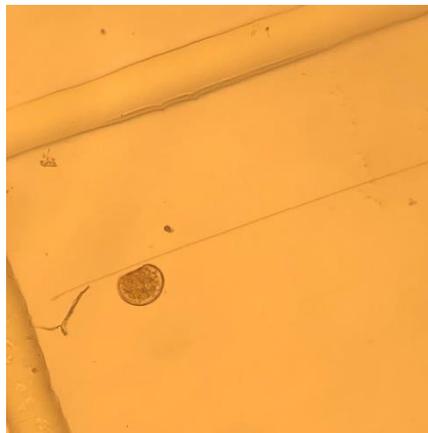


Figura 27: Presença de larva véliger (tipo “D”) no tanque de manutenção das larvas 48 h após os adultos de *Amarilladesma mactroides* terem sido expostos a variação abrupta de temperatura associado à adição de extrato de espermatozoides.

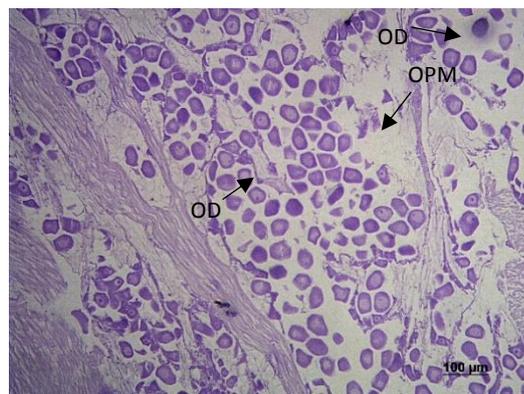


Figura 28: Estágio de desova parcial (Estágio 5) com ovócitos maduros poligonais livres (OM) e ovócitos em degradação (OD) de uma fêmea do marisco branco *Amarilladesma mactroides* do experimento IV sem condicionamento expostos ao choque térmico associado a adição extrato de espermatozoides.

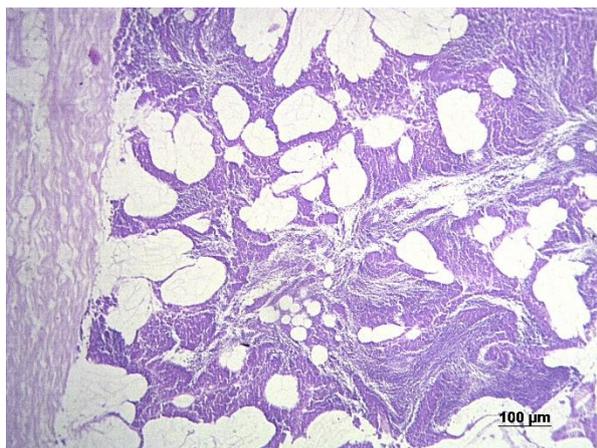


Figura 29: Estágio de desova parcial de macho de *Amarilladesma mactroides* do experimento IV sem condicionamento expostos ao choque térmico associado a adição de extrato de espermatozoides.

No experimento IV, a sobrevivência dos mariscos 18 h após a indução à desova não diferiu significativamente entre os tratamentos (Qui-quadrado = 0,5437 e $p=0,7620$), tendo apresentado médias de 87,5%, 82,5% e 87,5% nos tratamentos em que se efetuou o choque de temperatura de 20°C para 23, 25 ou 27°C, respectivamente (Figura 30).

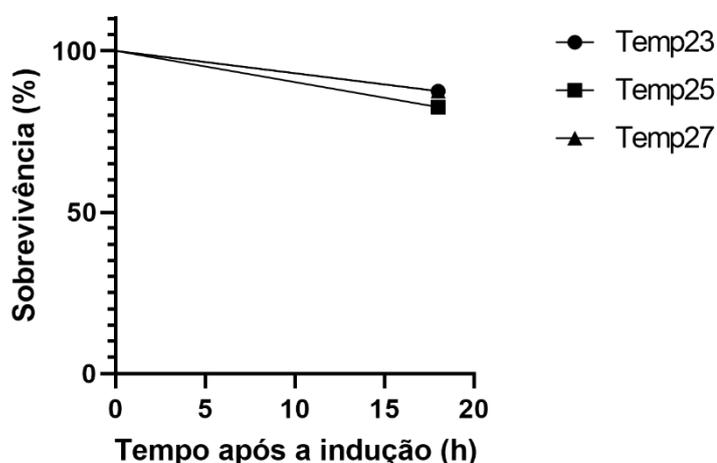


Figura 30: Sobrevivência (%) de *Amarilladesma mactroides* 18 h após a indução à desova utilizando os tratamentos Temp23 (choque de temperatura de 20°C para 23°C), Temp25 (choque de temperatura de 20°C para 25°C) e Temp27 (choque de temperatura de 20°C para 27°C) no experimento IV.

Assim como no experimento IV, não houveram diferenças significativas entre o comprimento (CT), largura (LT), peso úmido (PU), peso seco (PS) e fator de condição (CF) dos mariscos no experimento V (Tabela 13).

Tabela 13: Médias (\pm DP) de comprimento total (CT), peso total (PT), largura total (LT), peso seco (PS) e fator de condição (CF) dos exemplares de marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) sem serem condicionados em laboratório e expostos à diferentes tratamentos (T = choque de temperatura de 22 para 25,5°C; T+E = idem ao anterior associado à adição de extrato de espermatozoides; T+S = choque de temperatura e de salinidade; T+P = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio) no experimento V.

	T	T+E	T+S	T+P	<i>p</i> -valor
CT	58,41 \pm 0,83	57,64 \pm 0,85	57,16 \pm 0,94	58,82 \pm 0,85	0,534
LT	31,77 \pm 0,40	30,92 \pm 0,41	30,76 \pm 0,46	31,41 \pm 0,41	0,319
PU	17,59 \pm 0,86	15,93 \pm 0,89	16,09 \pm 0,98	16,82 \pm 0,89	0,539
PS	6,28 \pm 0,36	5,96 \pm 0,37	5,97 \pm 0,41	6,37 \pm 0,37	0,814
CF	0,080 \pm 0,001	0,075 \pm 0,002	0,079 \pm 0,002	0,075 \pm 0,002	0,253

Também não houveram diferenças significativas na taxa de sobrevivência de *A. mactroides* 18 h após a indução à desova (Qui-quadrado = 2,505 e $p=0,1135$), tendo sido 100% no tratamento de temperatura 25,5°C e com variação de 83,33 a 94,44% nos demais (Figura 31).

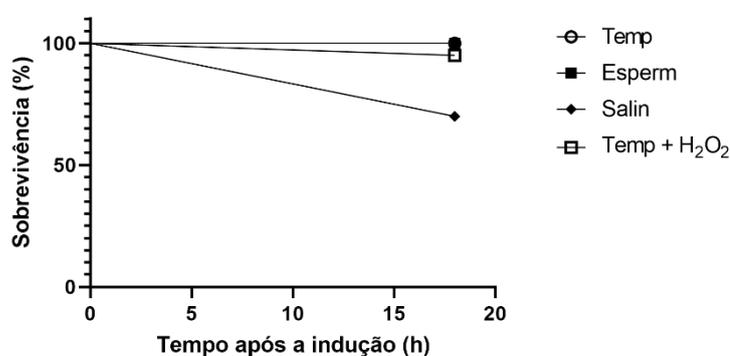


Figura 31: Sobrevivência (%) de *Amarilladesma mactroides* 18 h após a indução à desova utilizando os tratamentos Temp (choque de temperatura de 22 para 25,5°C), Esperm (choque de temperatura associado à adição de extrato de espermatozoides); Salin (choques de temperatura e de salinidade 28 para 35); e pH+perox (choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado).

Dezoito horas após a exposição aos diferentes tratamentos, foram encontrados ovócitos (434) e zigotos fertilizados (167) no tratamento de choque de temperatura

associado ao pH alcalino e peróxido de hidrogênio (pH+perox). Após 42 h, foram observadas larvas trocófora (44) e, após 66 h, larvas D (12) (Figura 32).

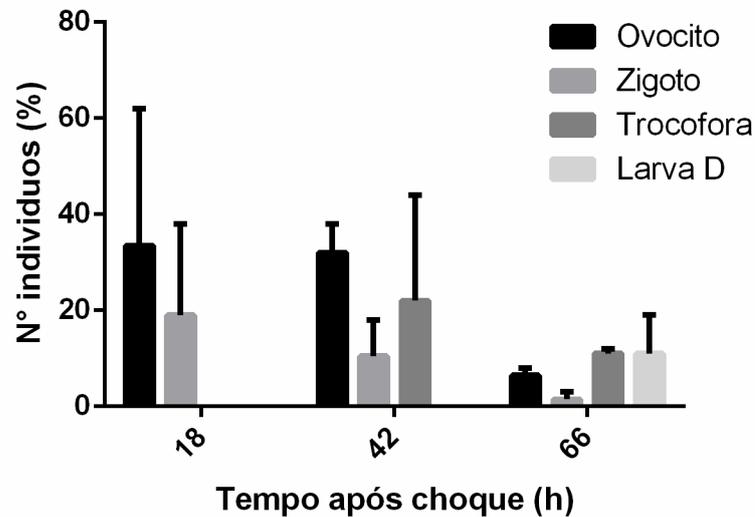


Figura 32: Proporção (%) de diferentes estágios larvais do marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) cerca de 66 h após a fertilização no tratamento de temperatura associada a pH alcalino e adição de peróxido de hidrogênio (5,5mM) no experimento V.

Assim como no experimento anterior, cinco mariscos foram amostrados para verificação das gônadas, sendo duas fêmeas e três machos. Uma das fêmeas se encontrava em estágio 5, ou de desova parcial, onde foi possível observar ovócitos arredondados (OR) residuais envoltos por tecido conectivo, folículos de tamanho reduzido, presença de ovócitos poligonais (OPM) e poucos ovócitos imaturos (OI) (Figura 33). Do mesmo modo, o macho analisado encontrava-se em estágio de desova parcial (Figura 34), com presença de espermatozoides, mas não tão centralizados como observado no macho maduro e o centro do folículo começa a apresentar mais feixes vazios. O estágio sexual dos mariscos verificado pela histologia explica o evento de desova ocorrido, visto que os mariscos já se encontravam em desova parcial no ambiente, com gametas livres no lúmen prontos para serem expelidos (“desovados”).

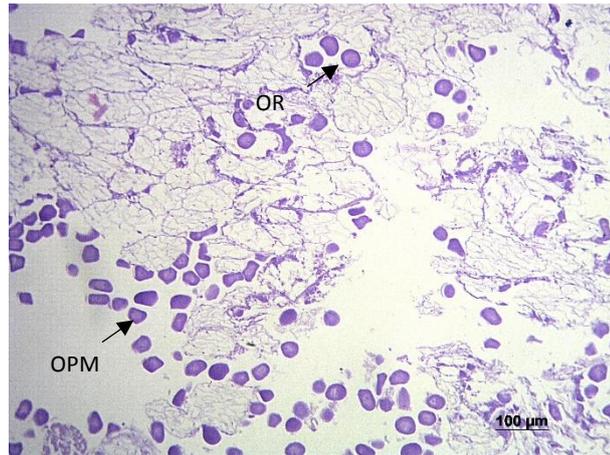


Figura 33: Estágio de desova parcial (Estágio 5) com ovócitos maduros poligonais livres (OPM) e ovócitos arredondados residuais (OR) de uma fêmea de *Amarilladesma mactroides* antes de ser exposta a um dos tratamentos de indução à desova do experimento V.

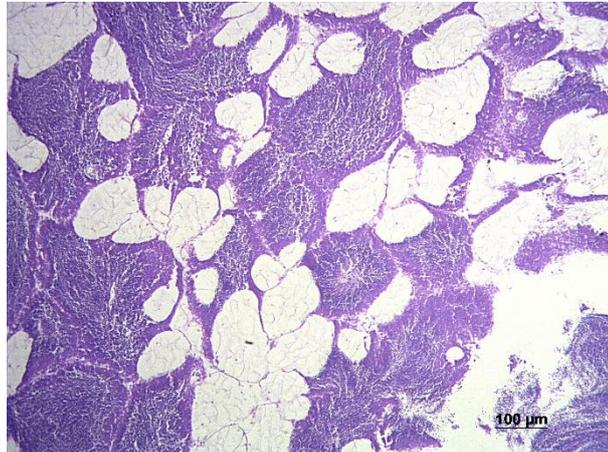


Figura 34: Secção histológica de macho do marisco branco *Amarilladesma mactroides* no estágio de desova parcial (estágio 5) do experimento V antes de ser exposto a um dos tratamentos de indução à desova.

De modo similar, não houveram diferenças significativas entre CT, LT, PU e PS entre os mariscos do experimento VI (Tabela 14). No entanto, o CF dos mariscos do tratamento “T” (choque de temperatura de 22 para 26°C) foi significativamente maior dos que os mariscos expostos ao choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado

Tabela 14: Médias (\pm DP) de comprimento total (CT), peso total (PT), largura total (LT), peso seco (PS) e fator de condição (CF) dos exemplares de marisco branco (*Amarilladesma mactroides*) sem serem condicionados em laboratório e expostos à diferentes tratamentos (T = choque de temperatura de 22 para 26°C; T+pH = idem ao anterior associado ao aumento do pH

para 9,15; T+P = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio; T+pH+P = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado no experimento VI.

	T	T+pH	T+P	T+pH+P	<i>p</i> -valor
CT	58,67 ± 3,35	58,99 ± 1,09	58,69 ± 1,70	59,02 ± 1,29	0,895
LT	32,09 ± 0,26	31,92 ± 0,29	31,21 ± 0,35	32,21 ± 0,34	0,174
PU	18,04 ± 0,40	18,01 ± 0,43	17,25 ± 0,53	16,71 ± 0,51	0,144
PS	7,37 ± 0,15	7,46 ± 0,17	7,05 ± 0,21	7,20 ± 0,20	0,427
CF	1,05 ± 0,02 ^a	1,03 ± 0,02 ^{ab}	0,99 ± 0,02 ^{ab}	0,96 ± 0,02 ^b	0,007

Assim como no experimento V, a sobrevivência dos indivíduos do experimento VI foi de 100% no tratamento de choque de temperatura. A sobrevivência no tratamento de pH alcalino foi 94,4%. Contudo, nos tratamentos com a adição de peróxido de hidrogênio as taxas de sobrevivência foram menores (55,55 a 66,67%; Figura 35). Foram, portanto, detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (Qui-quadrado = 18,99 e $p=0,0003$). Vale ressaltar que, tanto no experimento V quanto no VI, foi observado que os mariscos submetidos aos tratamentos com adição de peróxido de hidrogênio permaneceram maior parte do tempo com suas valvas fechadas.

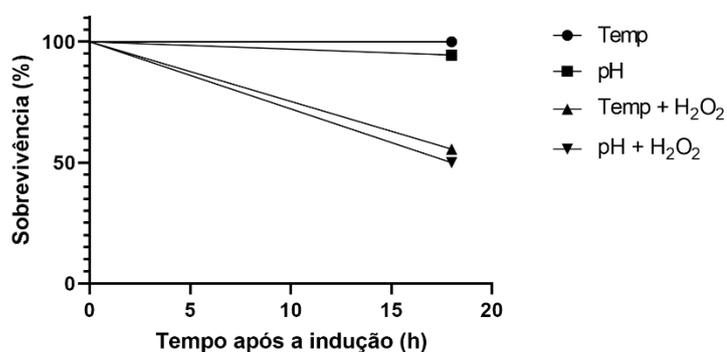


Figura 35: Taxa de sobrevivência (%) de exemplares de *Amarilladesma mactroides* do experimento VI 18 h após a exposição aos tratamentos de indução à desova (Temp = choque de temperatura de 22 para 26°C; pH = idem ao anterior associado ao aumento do pH para 9,15; H₂O₂ = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio; pH+ H₂O₂ = choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio em meio alcalinizado).

Várias desovas foram observadas no experimento VI: em uma das três repetições do tratamento choque de temperatura (de 22°C para 26°C) (3,3 ovócitos.L⁻¹), em uma repetição do tratamento choque de temperatura associado à adição de peróxido de

hidrogênio em meio alcalinizado (20,0 ovócitos.L⁻¹), em duas repetições do tratamento choque de temperatura associado à adição de peróxido de hidrogênio (6,7 e 23,3 ovócitos.L⁻¹) e em duas repetições do tratamento choque de temperatura associado ao aumento do pH (20,0 e 46,6 ovócitos.L⁻¹). Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (p=0,815). A densidade de ovócitos também não diferiu significativamente entre os tratamentos (p=0,585) (Figura 36).

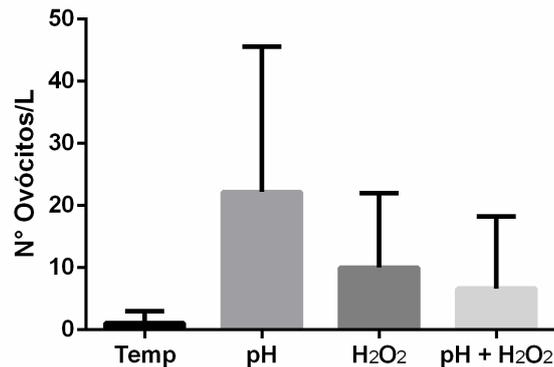


Figura 36: Densidade (indivíduos.L⁻¹) de ovócitos liberados por fêmeas de *Amarilladesma mactroides* submetidas a diferentes tratamentos de indução à desova: choque de temperatura de 22°C para 26°C (“Temp”); choque de temperatura de 22 para 26°C associada ao pH 9,13 (“pH”); choque de temperatura associado peróxido de hidrogênio (“H₂O₂”); e ao choque de temperatura associado à exposição ao peróxido de hidrogênio em pH alcalino (“pH + H₂O₂”).

Diferentemente do experimento V, o único tratamento do experimento VI em que foram observados zigotos foi o de temperatura associado ao peróxido (1,1 ovócitos.L⁻¹) porém não foram observadas larvas e, dessa forma, não foi possível quantificá-las.

Um total de cinco mariscos foram avaliados quanto a histologia dos seus tecidos gonadais, sendo três fêmeas e dois machos. As análises histológicas constataram que a fêmea e o macho se encontravam respectivamente em estágios de desova parcial. A fêmea apresentava os folículos pequenos com poucos ovócitos poligonais e mais ovócitos arredondados e alguns em degradação (Figura 37). O macho apresentava a região central dos folículos parcialmente vazia com escassos espermatozoides (Figura 38).

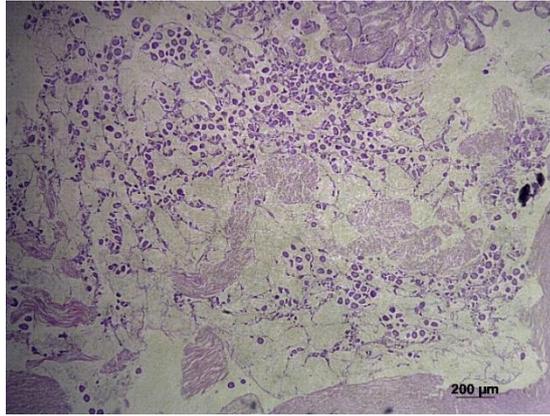


Figura 37: Secção histológica de fêmea de *Amarilladesma mactroides* em estágio de desova parcial (Estágio 5) com poucos ovócitos maduros poligonais livres e maior quantidade de ovócitos arredondados antes de ser exposta a um dos tratamentos de indução à desova do experimento V.

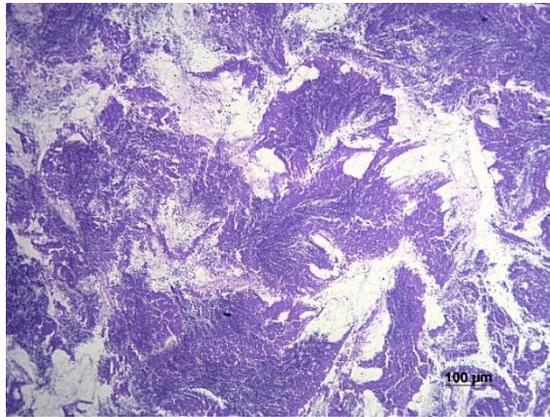


Figura 38: Secção histológica de macho do marisco branco *Amarilladesma mactroides* no estágio de desova parcial (estágio 5) do experimento VI antes de ser exposto a um dos tratamentos de indução à desova.

O DM dos ovócitos das fêmeas do experimento IV foi significativamente maior ($p=0,000002$) do que os dos experimentos V e VI, enquanto o dm do experimento IV foi significativamente maior ($p=0,021$) do que o do experimento VI, mas não diferiu do experimento V (Tabela 15).

Tabela 15: Médias (\pm DP) dos diâmetros maior (DM) e menor (dm) de ovócitos de fêmeas de *Amarilladesma mactroides* dos experimentos IV, V e VI antes de serem submetidas aos diferentes métodos de indução à desova. Letras superscritas indicam diferenças significativas em cada coluna (ANOVA uma via).

Experimento	DM	dm
IV	$42,54 \pm 4,27^a$	$30,37 \pm 4,40^a$
V	$36,65 \pm 4,95^b$	$27,27 \pm 3,21^{ab}$
VI	$32,29 \pm 4,68^c$	$26,93 \pm 2,95^b$

Discussão

Em que pese a grande importância ecológica e o relativo interesse econômico pelo marisco branco *A. mactroides* (Coscarón, 1959; Defeo, 1989), estudos que tratem da produção de sementes dessa espécie, especialmente os relacionados à reprodução em laboratório, são praticamente inexistentes (Santos, 2019). Recentemente, Proverbio *et al.* (2019) avaliaram técnicas básicas para manutenção de adultos de *A. mactroides* em laboratório, onde foram estudados os efeitos de diferentes dietas na sobrevivência e condição corporal, a posição anatômica e o uso do substrato. Assim, para o desenvolvimento desta dissertação, foi inicialmente necessário desenvolver, e testar, um sistema de manutenção da espécie em laboratório e, em um segundo momento, avaliar práticas de manejo que oferecessem condições adequadas para a sobrevivência e, eventualmente, a reprodução em cativeiro. Os resultados dos pré-testes, assim como dos experimentos com condicionamento, sugerem que as condições ambientais foram adequadas e, portanto, que os mariscos se adaptaram tanto ao sistema de manutenção como ao manejo aplicado.

As variáveis de qualidade de água permaneceram relativamente estáveis ao longo dos diferentes períodos experimentais e respeitaram as faixas recomendadas tanto para moluscos bivalves em geral (Utting, 1993; Helm & Bourne, 2004) como especificamente para *A. mactroides* (Carvalho *et al.*, 2015; Proverbio *et al.*, 2019; Santos, 2019). Além da qualidade da água, a ausência de pontos anóxicos na camada de sedimento arenoso ao final dos experimentos reitera as boas condições ambientais em que os mariscos foram mantidos. O fornecimento diário de microalgas (*C. muelleri* e/ou *I. galbana*) na fase exponencial do crescimento populacional e, mais importante, a ingestão diária estimada de 1,0 a 2,5 x 10³ cél.mL⁻¹ por cada exemplar de *A. mactroides*, também indica que a alimentação provavelmente tenha sido adequada. Como resultado disso, taxas de sobrevivência superiores a 70% foram obtidas e, embora os experimentos não tenham sido delineados para avaliar o crescimento, em todos os casos este foi positivo. O crescimento em bivalves é frequentemente expresso como incremento de tamanho corporal (Bayne & Worrall, 1980). Nos experimentos I, II e III, a média diária de incremento de comprimento foi estimado em 0,01-0,03 mm, 0,02-0,04 mm e 0,02 mm, respectivamente. No ambiente natural, o crescimento de *A. mactroides* diminui com a idade, sendo que indivíduos com dois a três anos crescem entre 0,03-0,05 e 0,01-0,02 mm.dia⁻¹, respectivamente (Capezani *et al.*, 1971). O crescimento dos mariscos no nosso estudo, portanto, estão de acordo com as estimativas de Capezani *et al.* (1971).

Finalmente, a análise histológica das gônadas permitiu observar um aumento significativo no tamanho dos ovócitos mesmo os mariscos sendo mantidos por um curto período de condicionamento, o que, mais uma vez, sugere que o sistema de cultivo utilizado tenha sido adequado.

Taxas de sobrevivência similares às aqui relatadas foram observadas por Mamat (2010) em adultos de *P. australis* alimentados com *C. muelleri* (76,7%) e por Marshall *et al.* (2012) em adultos de *P. generosa* alimentados com *T-Isochrysis* e *C. muelleri* (72%). Contudo, a sobrevivência de *A. mactroides* alimentado unicamente com *Spirulina* desidratada (0,021 g.dia⁻¹) após 14 dias (Proverbio *et al.*, 2019) foi superior ao aqui observado. Delaporte *et al.* (2003) verificaram uma grande diferença entre a sobrevivência de adultos da ostra do Pacífico *C. gigas* (73,4%) e de *R. philippinarum* (100%) alimentados com a mesma dieta (*C. calcitrans*). Entretanto, no presente estudo a concentração de microalgas ofertada foi inferior aos 6 x 10⁸ cél.animal⁻¹.dia⁻¹ fornecida por Delaporte *et al.* (2003). Isso se alinha ao proposto por Helm & Bourne (2004) e Utting & Millican (1997), em que a sobrevivência é afetada pela disponibilidade e qualidade da dieta ofertada. Além disso, uma parcela considerável dos mariscos brancos encontrados mortos nos nossos estudos apresentava rupturas no manto e, por essa razão, eram imediatamente retirados do sistema. Por causa disso, é possível que as mortalidades tenham ocorrido devido à traumas ou ao estresse decorrente da coleta, transporte e manipulação, bem como pelo manejo diário das unidades experimentais e animais

Uma fina camada de biofilme foi observada sobre o sedimento arenoso, principalmente a partir da segunda semana de desenvolvimento dos experimentos. Isso possivelmente ocorreu devido à decantação das microalgas, de fezes e de outros resíduos orgânicos, além do próprio crescimento da comunidade microbiana. Apesar da ótima qualidade ambiental, um aumento na taxa de renovação diária de água poderia afetar a sobrevivência dos mariscos, pois reduziria o biofilme formado na camada de areia, diminuindo assim a possibilidade de proliferação de eventuais patógenos. Por outro lado, a presença do biofilme pode ser positiva, pois, além de atuar na nitrificação dos compostos nitrogenados, pode também servir como suplemento alimentar (Thompson *et al.*, 2002). Nesse sentido, Defeo & Scarabino (1990) apresentaram a hipótese de que, apesar de *A. mactroides* ser reconhecidamente um filtrador suspensívoro, em situações de baixa oxigenação e de recirculação de água, a espécie seria capaz de consumir detritos orgânicos presentes no sedimento graças à ação do sifão inalante. Este comportamento alimentar alternativo também foi observado em vários dos nossos experimentos. No

entanto, como as concentrações de oxigênio dissolvido nos nossos estudos foram aferidas diariamente e sempre se mantiveram acima de $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$, é possível que, ao contrário do sugerido por Defeo & Scarabino (1990), a baixa oxigenação não esteja relacionado à ocorrência desse tipo de comportamento alimentar. A relativamente pequena circulação de água nas unidades experimentais associada à presença do biofilme sobre o sedimento talvez funcione como indutor dessa estratégia alimentar detritívora.

Como destacado anteriormente, não há um protocolo de controle da reprodução estabelecido para a espécie-alvo dessa dissertação. Contudo, existem práticas e metodologias distintas quando se refere ao condicionamento de várias outras espécies de bivalves, especialmente em relação à etapa inicial do condicionamento. Por exemplo, Marshall *et al.* (2012) optaram por manter adultos de *Panopea generosa* em jejum por três semanas para que ocorresse a reabsorção dos gametas e assim o início do condicionamento dos animais. Lagreze-Squella *et al.* (2018) induziram adultos do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* antes de começar o condicionamento propriamente dito e, dessa forma, fosse alcançado um estágio pós-desova uniforme em todo o estoque adulto. Outros autores, porém, preferem realizar o condicionamento dos animais quando estes estão próximos a maturação sexual, os quais geralmente são coletados antes ou durante o período natural de desova no ambiente (Ojea *et al.*, 2008; Costa & Patino, 2009; Delgado *et al.*, 2016; Olivares-Bañuelos *et al.*, 2017; Zevallos & Toledo, 2017) sem realizar jejum e nem a imediata indução à desova. Nessa dissertação, ambas as práticas foram testadas.

Apesar de acreditarmos que o sistema de manutenção e o manejo experimental tenham provido condições minimamente apropriadas para os exemplares de *A. mactroides*, não houve sucesso na indução à desova dos mariscos condicionados por duas semanas e posteriormente expostos à manipulação térmica. A não ocorrência de desovas pode estar associado ao estágio de desenvolvimento das gônadas no momento em que os mariscos foram coletados no ambiente (Ojea *et al.*, 2008; Matias *et al.*, 2008). O insucesso na indução à desova nos experimentos I e II pode, portanto, ser explicado pela imaturidade sexual tanto dos machos quanto das fêmeas. Embora nenhuma fêmea tenha sido amostrada para as análises histológicas no experimento I, todos os machos possuíam gônadas imaturas. As fêmeas do experimento II apresentavam tanto ovócitos imaturos (aderidos às paredes) quanto maduros (arredondados e livres no lúmen), o que indica que se encontravam em desova parcial, enquanto os machos do experimento II se encontravam no estágio pós-desova. Por outro lado, as fêmeas e os machos do

experimento III se encontravam em estágio mais avançado. Entretanto, apesar de estarem maduras e seus ovócitos terem aumentado de tamanho durante o condicionamento, a média do diâmetro maior ao final do período de condicionamento (44,17 μm) era inferior ao de um ovócito maduro, o qual, segundo Coscarón (1959), normalmente tem de 50 a 55 μm . Essa faixa de tamanho está de acordo com Santos (2019), que observou ovócitos recém fertilizados com um diâmetro médio de 51,2 μm . Para *M. donacium*, espécie da mesma família que *A. mactroides*, os diâmetros maior e menor de ovócitos maduros estão na faixa de 31-47 a 23-35 μm , respectivamente (Perea & Galvez, 2015). Todos os estudos mencionados anteriormente, assim como o nosso, utilizaram técnicas histológicas tradicionais para avaliar tanto o estágio gonadal quanto o tamanho dos ovócitos, o que reforça a importância da histologia como ferramenta valiosa e precisa na avaliação das gônadas e do estágio maturacional dos animais.

A distribuição geográfica parece influenciar o ciclo reprodutivo de *A. mactroides* (Cappezani *et al.*, 1971). Masello (1987) reporta que, na costa uruguaia, a desova do marisco branco apresenta dois picos concentrados entre outubro e dezembro e entre fevereiro a abril. Por sua vez, Coscarón (1959) relata que as desovas em praias argentinas ocorrem desde o fim de novembro até meados de março. Para a costa brasileira, infelizmente, inexistem estudos sobre a biologia reprodutiva de *A. mactroides*. Seria, portanto, de extrema importância avaliar a ocorrência de indivíduos aptos a desovar ao longo do ano e correlacionar os eventuais picos de desova com variáveis ambientais, em especial a temperatura e salinidade, e a disponibilidade de itens alimentares (composição quali-quantitativa da comunidade fitoplanctônica) naquele ambiente. Com base nesses resultados, seria possível determinar faixas recomendáveis para o condicionamento de adultos de marisco branco em cativeiro e, eventualmente, ter mais elementos para se estabelecer uma dieta para essa espécie.

A temperatura aqui adotada para o condicionamento dos animais, de cerca de 20°C, foi a mesma utilizada em diversos estudos de condicionamento de bivalves (Loosanof & Davis, 1951; Matías *et al.*, 2009; Sreedevi *et al.*, 2014; Oliveras-Bañuelos *et al.*, 2017; Trigos *et al.*, 2018). Entretanto, estudos com *M. donacium* e *Donax obesulus*, que habitam as zonas entre marés de praias no Peru e Chile, utilizaram temperaturas mais baixas (16 e 17°C) para o condicionamento. De modo similar, Santos (2019) manteve adultos de *A. mactroides* durante 21 dias a 18°C. Coscarón (1959) relata que as desovas em praias argentinas ocorrem quando a temperatura varia de 16,8 a 21,6°C. A faixa de temperatura em que *A. mactroides* é naturalmente encontrado na praia do Cassino, RS,

varia de 12,9 a 26°C (Santos *et al.*, 2016). Por outro lado, adultos de marisco branco foram mantidos no laboratório em temperaturas entre 18 e 25°C (Carvalho *et al.*, 2015a, b).

A variação sazonal da temperatura pode afetar a duração do condicionamento das espécies em laboratório. Utting & Spencer (1991) apontam que, de forma geral, em épocas mais frias, como no inverno, o condicionamento dos animais é mais longo que em épocas mais quentes, podendo durar de 6 a 8 semanas para que os bivalves atinjam a condição de desova. Como o ciclo reprodutivo de *A. mactroides* na costa do Brasil ainda não foi devidamente avaliado, existe a possibilidade de que as épocas de desova da população brasileira ocorram em épocas diferentes do indicado por Coscarón (1959) e Masello (1987) para a Argentina e o Uruguai, respectivamente, visto que a distribuição geográfica tem um papel crucial no ciclo reprodutivo do marisco branco.

As respostas dos bivalves submetidos ao condicionamento variam amplamente entre espécies. Santos (2019) condicionou reprodutores de *A. mactroides* por 3 semanas em uma temperatura inferior a esse estudo (18°C), mas não obteve sucesso na desova utilizando a manipulação térmica tanto com aumentos gradativos como com choques abruptos de temperatura. Metade do estoque adulto de *M. donacium*, espécie da mesma família que *A. mactroides*, atingiu a maturidade sexual após um período de condicionamento de 44 dias com uma dieta mista de *I. galbana*, *C. gracilis* e *P. lutheri* (Zevallos & Toledo, 2017). Exemplares de *P. australis* e *P. ventricosa*, também da mesma família do marisco branco, foram condicionados respectivamente por 3 semanas e 7 semanas antes de se induzir a desova (Mamat & Alfaro, 2014; Gadomski *et al.*, 2015). Indivíduos de *P. australis* foram induzidos a desovar utilizando choque térmico, mas não houve sucesso na liberação dos gametas e os animais voltaram para o condicionamento por mais 1 semana, e novamente foram induzidos a desova, mas, mais uma vez, não houve sucesso (Mamat & Alfaro, 2014). Contudo, Hooker (1997) conseguiu induzir exemplares de *P. australis* após 23 dias de condicionamento. Mamat & Alfaro (2014) atribuíram o insucesso na indução à desova ao mau condicionamento e à nutrição dos adultos. Exemplares de *Donax obesulus* que também habitam zonas entre marés, foram condicionados em laboratório e apenas atingiram a completa maturidade gonadal após 4 semanas de condicionamento (Cartensen *et al.*, 2010). Esses exemplos sugerem que a curta duração, apenas 14 dias, do período de condicionamento nos nossos experimentos possam ter levado ao insucesso das tentativas de indução à desova. Nesse sentido, vale observar que houve um aumento do tamanho dos ovócitos nos experimentos II e III,

sugerindo que um período de condicionamento mais longo poderia resultar em gametas maiores e com maior possibilidade de sucesso na indução à desova.

Além da época de coleta dos mariscos no ambiente e a duração do período de condicionamento, a baixa renovação da água e nutrição insuficiente dos animais tem influência na taxa de maturação gonadal dos bivalves e na qualidade dos gametas produzidos (Loosanof & Davis, 1951; Costa *et al.*, 2013). Nesse estudo, a qualidade de água manteve-se dentro das faixas desejáveis para condicionamento de bivalves (Helm & Bourne, 2004) e a quantidade de microalga ofertada foi a mesma ofertada por Santos (2019) para o condicionamento de adultos de marisco branco. Este autor, porém, ofertou uma dieta mista composta de *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas salina* e *Chaetoceros muelleri*. Por sua vez, Zevallos & Todelo (2017) ofertaram a adultos de *M. donacium* uma dieta mista de *I. galbana*, *C. gracilis* e *P. lutheri* com maior concentração algal ($2,0 \times 10^5$ cél/mL) do que a desse estudo e após 44 dias o estoque de marisco branco se encontrava 50% maduro. Gadomski *et al.* (2015) também forneceram uma dieta mista composta por *T. chuii*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. muelleri* e *Skeletonema marinoi* na concentração final de $8-10 \times 10^5$ cél/mL no condicionamento de adultos de *P. australis*. Um fator a ser considerado é que os animais foram mantidos em areia fina provinda do habitat natural e, portanto, o pequeno espaço intersticial entre os grânulos de areia favorece a colonização de microrganismos e detritos, dificultando assim a passagem de água e alimento (McLachlan, 1982; Eagle, 1983).

De modo geral, a sobrevivência nos experimentos IV, V e VI foram superiores a 80%, exceto no experimento VI nos tratamentos envolvendo peróxido de hidrogênio. Garcia *et al.* (2018) não observaram mortalidade nos tratamentos de 5-10mM de peróxido de hidrogênio na indução à desova de abalones. Ferranti *et al.* (2018) relataram a sobrevivência de todos os indivíduos expostos ao peróxido de hidrogênio nas concentrações de 6 e 10%. Entretanto, Flint & Than (2016) induziram corais *Acropora cerviconis* utilizando peróxido de hidrogênio (2 mM) e a mortalidade foi bem elevada após a indução. Os autores reportam que o peróxido pode ter um efeito irritante, onde os gametas são expelidos e os tecidos dos corais danificados, tendo um efeito contrário a indução. Haque & Kwon (2016) reportaram que o mexilhão *Mytilus edulis* é sensível a baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e o aumento da concentração desse composto reduz o consumo de oxigênio, a atividade do pé e a produção do bisso. No presente estudo, a sobrevivência no experimento VI nos tratamentos com peróxido foi muito inferior a encontrada por Garcia *et al.* (2018) e Ferranti *et al.* (2018), o que pode

estar relacionado a algum efeito nocivo para o marisco branco de modo similar ao proposto por Haque & Kwon (2016).

Os resultados de histologia dos experimentos em que os animais se encontravam em repouso (estágio 0) no experimento I e em desova total (estágio 6) no experimento II indicam que os mesmos não estavam aptos para a desova. Contudo, tanto os machos quanto as fêmeas se encontravam maduros (estágios 3 e 4) no experimento III, mas a manipulação térmica sozinha não foi capaz de induzir a desova. Entretanto, a temperatura associada a um segundo estímulo (exposição ao H₂O₂ e/ou pH alcalino) resultou em desovas nos experimentos IV, V e VI. A indução à desova do marisco branco sem condicionamento foi proposta justamente por ser a época do ano, segundo Coscarón (1959), Masello (1987), Hermann *et al.* (2009), em que os animais se encontrariam maduros nessa época no ambiente natural. Os resultados do presente estudo demonstraram um sucesso parcial na indução à desova utilizando diferentes estímulos, como a temperatura, (experimentos IV), adição de peróxido de hidrogênio em pH alcalino (experimento V) e com tratamentos de temperatura, temperatura e pH, temperatura e H₂O₂ e temperatura, pH e H₂O₂ associados (experimento VI). Entretanto, apenas nos experimentos IV e V foram observados estágios larvais.

Dentre os estímulos físicos utilizados na indução, o choque térmico é uma técnica de baixo custo e fácil emprego (Matias *et al.*, 2009; Cartensen *et al.*, 2010), sendo frequentemente em conjunto com a adição de extrato de espermatozoides (Hooker, 1997; Costa e Patino, 2009; Costa *et al.*, 2010; Joaquim *et al.*, 2014). Hooker (1997) obteve desova de *P. australis* utilizando a combinação de choque de temperatura (de 20 para 27°C) e extrato de espermatozoides. De modo similar, Redfearn (1982) também utilizou ciclos de choque de temperatura de 15-20 min e a adição de extrato de espermatozoides direto nos sífões inalantes. Nesse estudo, os choques cíclicos de temperatura associados ao extrato de espermatozoide resultaram na liberação de gametas tanto por machos quanto pelas fêmeas no experimento IV. Entretanto, não é possível afirmar qual temperatura aplicada teve sucesso e, por animais se encontrarem em desova parcial se o estímulo aplicado apenas contribuiu para que ovócitos e espermatozoides remanescentes maduros que ainda não foram reabsorvidos fossem expelidos.

Outro estímulo utilizado na indução à desova de moluscos como abalones, ostras, lapas e mariscos, e que também foi utilizado nesse estudo, é adição de peróxido de hidrogênio em água do mar alcalina (Morse *et al.*, 1977; Rose, 1990; Areias, 2012; Vosloo & Vosloo, 2017; Ferranti *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2018). Ferranti *et al.* (2018)

obtiveram desovas de 10% do estoque de *Patella caerulea* com o emprego de peróxido de hidrogênio a 6%. Moss *et al.* (1995) obtiveram de 15% a 43% de sucesso na desova de machos e fêmeas de abalones *Haliotis iris* submetidos ao tratamento de peróxido a 6%.

O número de zigotos, larvas trocófora e veliger estimados no tratamento de peróxido e pH alcalino do experimento V foram bem inferiores ao encontrado por Ferranti *et al.* (2018). Além disso, no experimento VI, mais especificamente nos tratamentos com exposição ao peróxido de hidrogênio, somente foi possível observar os zigotos e, nos demais tratamentos, apenas ovócitos não fertilizados. Esse baixo número e baixa viabilidade larval pode estar relacionado a vários fatores, entre os quais podemos elencar a manutenção da qualidade da água, principalmente em relação à proliferação microbiana, o que não foi considerado nessa dissertação, e a ocorrência da liberação de gametas imaturos ou não viáveis. Vosloo & Vosloo (2017) citam que o uso do peróxido de hidrogênio como indutor à desova do abalone *Haliotis midae* afetou a qualidade dos ovócitos, embora eles não tenham sido liberados em água contendo esse composto químico. Pode-se também considerar que a ausência de zigotos em alguns tratamentos possa estar relacionada a predominância de fêmeas, visto que cada fêmea de *A. mactroides* tem a capacidade de liberar uma grande quantidade de ovócitos (cerca de 5,3 milhões conforme Coscarón, 1959). Por sua vez, Matías *et al.* (2009) observaram o oposto, ou seja, o número de fêmeas de *R. decussatus* era inferior ao de machos, o que também influenciou o sucesso da fertilização.

Os intervalos de tempo entre os estágios larvais estimados nos experimentos V foram semelhantes aos relatados por Ferranti *et al.* (2018). Naquele estudo, cerca de 18 h após a fertilização ainda eram observados muitos zigotos, e as larvas D apareceram após apenas 42 h. Santos (2019) verificou que as primeiras larvas trocóforas e larvas D de *A. mactroides* apareceram respectivamente após 18 e 24 horas da fertilização e a larvicultura foi realizada a $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ e salinidade 32. Como mencionado anteriormente, a temperatura é um dos fatores regulatórios e importantes na reprodução dos bivalves e, o desenvolvimento larval também varia com a temperatura (Helm & Bourne, 2004). No presente estudo, o material coletado das desovas foi mantido em temperatura ambiente ($23,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$) e salinidade 25 para que pudesse acompanhar o desenvolvimento larval. Consequentemente, isso pode ter influenciado o desenvolvimento embrionário.

Os índices de condição (CI) de bivalves refletem as mudanças no desenvolvimento gonadal dos bivalves, aumentando quando as gônadas estão maduras e

diminuindo após a desova como descrito, por exemplo, para *Panopea generosa* (Marshall *et al.*, 2012) e *Macra purchisoni* (Nottingham & White, 2015). Nesse estudo, as médias do CI final dos animais dos experimentos I e II foram semelhantes às encontradas por Hermann *et al.* (2009) em adultos de *A. mactroides* coletados nos meses de fevereiro e março. Por outro lado, os CI dos experimentos I, II e III foram superiores aos encontrados de setembro e outubro e também foram superiores aos CI encontrados por Proverbio *et al.* (2019) após 30 dias de manutenção em laboratório. Hermann *et al.* (2009) observaram um aumento do CI no outono-inverno e uma diminuição na primavera-verão. Contudo, este autor aponta que o CI não foi útil, já que não se correlacionou significativamente com o ciclo reprodutivo do marisco branco em ambiente natural. Em outros bivalves que habitam zonas entre marés, como *Macra purchisoni*, o CI reflete bem o ciclo reprodutivo no ambiente natural, aumentando quando a maioria dos indivíduos estão maduros (outubro) e diminuindo no fim da primavera e início do verão quando ocorrem as desovas. Para *A. mactroides*, porém, desconhecemos a existência de estudos em laboratório que avaliam o CI, principalmente em relação ao ciclo reprodutivo.

Em relação ao CI de bivalves condicionados para indução à desova, Ramos *et al.* (2014) não encontraram diferenças significativas entre os CI da ostra de mangue (*Crassostrea gasar*) alimentadas com diferentes dietas após 60 dias de condicionamento. Entretanto, Martinez-Pita *et al.* (2016) relataram a maturação das gônadas, por meio de histologia, e o aumento do CI de adultos do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* condicionados em laboratório por 5 semanas.

O fator de condição (CF) refere-se à relação entre peso e comprimento dos animais e, dessa forma, descreve a condição de bem-estar dos indivíduos, seja de diferentes sexos, épocas do ano e locais de captura. De acordo com Fulton (1911), valores de CF iguais ou superiores a 1 indicam uma boa condição, sendo que esse índice pode ser influenciado pelo sexo, tipo e disponibilidade de alimento, estágio reprodutivo e performance reprodutiva (Kumar *et al.*, 2018), normalmente havendo um aumento no índice com o aumento do peso da gônada (Saç & Özolug, 2020). Há poucos trabalhos avaliando o CF de moluscos (Setyono, 2005; Ferreri, 2014; Sousa *et al.*, 2017) e uma fração ainda menor tratando de bivalves (Sharma *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2018). Nessa dissertação, o CF_i refletia a condição dos mariscos coletados no ambiente e, nesse caso, o CF_i dos mariscos do experimento I (0,58) foi superior aos dos demais experimentos. Por sua vez, o CF final do experimento I (0,58), no qual foi ofertada uma dieta mista, foi superior aos demais. Apesar disso, valores menores que 1 podem refletir algum estresse relacionado à escassez

de alimento ou ao período de reprodução natural (Narejo *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2018). Isso reforça a possibilidade de que, no momento das coletas, os mariscos apresentavam estágios gonadais de recuperação ou pós-desova, e também que a duração do período de condicionamento possa ter sido insuficiente, resultando, assim, em baixos CF inicial e final. De modo similar, Setyono (2005) avaliou o condicionamento de abalones sobre diferentes temperaturas e a variação entre seus CF iniciais e finais foi mínima ou inexistente. Por outro lado, os CF do experimento IV foram superiores a 1 e estão de acordo com os resultados de Sharma *et al.* (2005), em que o CF de *Meretrix meretrix* apresentou uma correlação positiva com os estágios de maturação gonadal. As diferenças no CF dos lotes de marisco utilizados nessa dissertação podem também ser atribuídas tanto à variação sazonal como aos diferentes períodos de coleta como verificado por Sharma *et al.* (2005). Mais estudos, portanto, são necessários para esclarecer com maior precisão a relação entre CF e o estado reprodutivo de *A. mactroides*.

Conclusões

Um sistema de manutenção e uma proposta de manejo de exemplares de *A. mactroides* em cativeiro foram desenvolvidos e testados com relativo sucesso. O condicionamento dos mariscos em laboratório por duas semanas promoveu a maturação das gônadas nos experimentos II e III, mas não o suficiente para que os animais desovassem quando estimulados por choques de temperatura. Apesar do condicionamento ter resultado em ovócitos com diâmetros maiores, estes ainda eram inferiores ao tamanho (50-55 μm) considerado como pronto para a liberação (desova). Acredita-se que um período de condicionamento mais longo e a oferta de uma dieta mista de microalgas possam aumentar as chances de sucesso na indução à desova. Além disso, fatores como o estágio de desenvolvimento gonadal dos mariscos no momento da coleta no ambiente e manejo inadequado (quantidade e qualidade do alimento) podem ter influenciado os resultados. A indução dos mariscos não condicionados resultou em desovas. Contudo, é possível que esse aparente sucesso na indução tenha ocorrido pela liberação de alguns gametas maduros restantes no lúmen de fêmeas coletadas com gônadas em estágio de desova parcial.

Referências bibliográficas

- Abbas, AS, El-Wazzan, E, Khafage, AR, El-Sayed, AFM & Razek, FAA. 2018. Influence of different microalgal diets on gonadal development of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* broodstock. *Aquacult Int*, 1-13,
- Aji, LP. 2011. Review: Spawning induction in bivalve. *Jurnal Penelitian Sains*, 14 (2D): 33-36.
- Anjos, C, Baptista, T, Joaquim, S, Mendes, S, Matias, AM, Moura, P, Simões, T, & Matias, D. 2016. Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquaculture Research*, 1–20.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemist. 1990. Official Methods of Analysis. AOAC, 15th ed., Washington, DC.
- APHA - American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, American Water Works Association and Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, DC.
- Arapov, J, Ezgeta-Balic, D, Peharda, M, & Nincevic Gladan, Z. 2010. Bivalve feeding - how and what they eat? *Ribarstvo*, 68(3): 105-116.
- Areias, DLL. 2012. Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução a desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795). Dissertação (Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos). 74f. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.
- Argello-Guevara, W, Llorca A & Sonnenholzer, S. 2013. Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (GRAY 1825). *Journal of Shellfish Research*, 32(3): 665–670.
- Ayerbe, R, Zevallos, S, Castañeda, V, Lope, F, Bendita, H, & SANZ, Y. 2017. Manual para el cultivo de la macha *Mesodesma donacium* (LAMARCK, 1818) em la región Moquega. Instituto del Mar del Perú, Callao, 24pp.
- Bantoto-Kinamot, V. 2016. Effects of induced spawning on early development in snout otter clam, *Lutraria philippinarum* (Deshayes, 1854) (Bivalvia: Mactridae). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(3): 1230-1236.

- Bayne, BL. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: WILEY, M (ed). Estuarine processes: Use, stresses and adaptation to the estuary. Academic Press New York, 1: 432-448
- Bayne, BL & Worrall, CM. 1980. Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. Mar. Ecol. Prog. Ser., 3:317-328.
- Cappezani, DAA, Olivier, SR, & Penchaszadeh, PE. 1971. Dinamica de poblacion. In: OLIVIER, S. R (ed). Estructura de la comunidad, dinamica de poblacion y biologia de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*). Desh. 1854) en Mar Azul. Instituto de Biología Marina, Argentina, Chap. 3:49-64.
- Carstensen, D, Laudine, J, Sielfeld, W, Oliva, ME & Arntz, WE. 2010. Early larval development of *Donax obesulus*: response to El Niño temperature and salinity conditions. Journal of Shellfish Research, 29(2), 361–368.
- Carvalho, YBM., Poersch, LH & Romano, LA. 2013. Rickettsia-associated mortality of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) in Southern Brazil. Malacologia, 56 (1-2): 301-307.
- Carvalho, YBM, Romano, LA & Poersch, LHS. 2015a. Effect of low salinity on the yellow clam *Mesodesma mactroides*. Braz. J. Biol., 75(1): 8-12.
- Carvalho YBM, Jethro, J, Poersch, LHS & Romano, LA. 2015b. India ink induces apoptosis in the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854) Optical and ultrastructural study. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 87(4): 1981-1989.
- Carvalho, YBM, Santos, JJS, Raibenberg, FC, Poersch, LH & Romano, LA. 2016. Use of polymerase chain reaction for bivalve pathogen surveillance in the yellow clam *Mesodesma mactroides*. Journal of Aquatic Animal Health 28:114–117.
- Castagna, M. 1983. Review of recent bivalve culture methods. J. World Maricul. Soc. 14:567-575.
- Castagna, M. 2001. Aquaculture of the Hard Clam, *Mercenaria mercenaria*. In: _____. Biology of the Hard Clam. Elsevier Science B.V., Chapter 15: 675-699.
- Chiaradia, N, Nuñez, JD & Ocampo, EH. 2011. Defensas consteras, remodelado de playas y la situación de la almeja amarilla em la costa marplatense. Boletin Biologica 21, jul.-set, 27-29.
- Cledón, M & Nuñez, JD. 2010. Siphon nipping facilitates lethal predation in the clam *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854) (Mollusca: Bivalva). Mar. Biol., 157:737–745.

- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA. 49p.
- Coscarón, S. 1959. La almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*, Deshayes) de la costa de la Provincia de Buenos Aires. Agro. Publ. Tec., v.1, n. 3, 1-66.
- Costa, F & Patino, DM. 2009. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777). Aquaculture 288, 57-64.
- Costa, F, Aranda-Burgos, JA, Cerviño-Otero, A, Fernández-Pardo, A, Louzán, A, Nóvoa, S, Ojea, J, & Martínez-Patiño, D. 2013. Clam Reproduction. In: GONZÁLEZ, F. C. (ed.). Clam Fisheries and Aquaculture. Nova Science Publishers, New York, Chap. 3: 45-71.
- Cremonte, F & Figueras, A. 2004. Parasites as possible cause of mass mortalities of the critically endangered clam *Mesodesma mactroides* on the Atlantic coast of Argentina. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24(3), 166-172.
- Dadon, JR, Castños, C, Garcia, RE, Chiappini, GMT & Cruses, JM. 2001. Efectos a largo plazo de las pesqueiras de almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) y berberecho (*Donax hanlenyanus*), y de la urbanización sobre las comunidades intermareales. Chapter 37. 703–715. Sustentabilidad de la Biodiversidad. Universidad de Concepción, Chile.
- Defeo, O, Layerle, C, Masello, A. 1986. Spatial and temporal structure of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854) in Uruguay. Medio Ambiente (Chile) 8, 48–57.
- Defeo, O, Rey, M & Cascudo J. 1989. Estimaciones de stock del recurso almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) en base al analisis de cohortes (POPE, 1972). Publ. Com. Tec.Mix. Frente Maritimo, 4: 41-54.
- Defeo, O, & Scarabino, V. 1990. Ecological significance of a possible deposit-feeding strategy in *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854) (Mollusca: Pelecypoda). Atlántica (Brazil), 12: 55–65.
- Defeo, O. 1998. Testing hypotheses on recruitment, growth, and mortality in exploited bivalves: an experimental perspective. In: Proceedings of the North Pacific Symposium on Invertebrate Stock Assessment and Management, p. 257-264.
- Defeo, O, Gianelli, I, Martínez, G, Ortega, Celentano, E, Lercari, D, & Rosa, A. 2018. Natural, social and governance responses of a small-scale fishery to mass mortalities: the yellow clam *Mesodesma mactroides* in Uruguay. In: Global change in marine systems: societal and governing responses. Editors: Guillotreau, P, Bundy

- A, & Perry, RI. Routledge Studies in Environment, Culture, and Society Series. 1-14.
- Delaporte, M, Soudant, P, Moal, J, Lambert, C, Quéré, C, Miner, P, Choquet, G, Paillard, C & Samain, JF. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. The Journal of Experimental Biology 206, 3053-3064
- Delgado, M & Camacho, AP. 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. Sci. Mar., 69(1): 87-97.
- Delgado, M, Pérez-Larruscain, J & Ignasi Gairín, J. 2016. Broodstock conditioning and gonadal development of the smooth clam *Callista chione* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) on the Catalan coast (NE Spain). Acta Adriat., 57(1): 93-106.
- Eagle, GA. 1983. The chemistry of sandy beach ecosystems – a review. In: McLachlan, A & Erasmus, T. Sandy beaches as ecosystems. Springer-Science, Part two: Chemical aspects, 203-224.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Limited trades in bivalves. Disponível em: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/522564/> Acesso: 29/06/2018.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome: FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries. 227p.
- Ferranti, MP, Monteggia, D, Asnaghi, V & Chiantore, M. 2018. Artificial reproduction protocol, from spawning to metamorphosis, through non-invasive methods in *Patella caerulea* Linnaeus, 1758. Aquaculture Research, 49:3, 3386-3391.
- Ferreri, GB.2014. Length—Weight Relationships and Condition Factors of the Humboldt Squid (*Dosidicus gigas*) from the Gulf of California and the Pacific Ocean," Journal of Shellfish Research 33(3), 769-780.
- Fiori, SM & Cazaniga, NJ. 1999. Mass mortality of the yellow clam, *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Maत्रacea) in Monte Hermoso beach, Argentina. Biological Conservation, 89: 305-309.
- Fiori, SM & Morsan, EM. 2004. Age and individual growth of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia) in the southernmost range of its distribution. ICES Journal of Marine Science, 61: 1253-1259.

- Fiori, SM, Cazaniga, NJ & Estebenet, AL. 2004. Winter distribution, density and size of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia, Mactracea) in Monte Hermoso beach (Argentina). *Braz. Jour. Ocean.*, 52(1): 1-9.
- Fiori, SM & Defeo, O. 2006. Biogeographic patterns in life-history traits of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*, in sandy beaches of South America. *Journal of Coastal Research*, 22(4): 1-9.
- Fiori, SM & Carcedo, C. 2015. Influence of grain size on burrowing and alongshore distribution of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*). *J. Shell. Res.* 34(3):785-789.
- Fiori, S, Frontini, R & Bayón, C. 2019. Morphometric analysis of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) to interpret fragmentary archaeological specimens. *The Journal of Island and Coastal Archaeology*, 0:1–10.
- FishStatJ - Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series. 2018. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 21 July 2016. <http://www.fao.org/fishery/> Acceso: 03/02/2020.
- Flint, M & Than, JT. 2016. Potential spawn induction and suppression agents in Caribbean *Acropora cervicornis* corals of the Florida Keys. *PeerJ* 4:e1982.
- Fulton, TW. 1911. *The sovereignty of the sea*. Edinburgh and London.
- Gadomski, K, Moller, H, Beentjes, M & Lamare, M. 2015. Embryonic and larval development of the New Zealand bivalve *Paphies ventricosa* Gray, 1843 (Veneroida: Mesodesmatidae) at a range of temperatures. *Journal of Molluscan Studies*, 1–9.
- Garcia, LN, Murillo, DL, Tabares, PA, Paredes, FJ & Chapman, FA. 2018. Induced spawning of the blood ark *Anadara tuberculosa*, using hydrogen peroxide. *AACL Bioflux*, 11(4): 1248-1251.
- Gosling, EM. 2004. *Bivalve Molluscs – Biology, Ecology and Culture*. Oxford, Fishing News Books, 2 ed., 455p.
- Gosling, E. 2015. Reproduction, settlement and recruitment. In: _____. *Marine Bivalve Molluscs*. John Wiley & Sons Ltd., Oxford, Chap. 5: 157-202.
- Haque, N & Kwon, SH. 2016. Physiological effects of biocide on marine bivalve blue mussels in context prevent macrofouling. *Journal of Ecology and Environment*, 40(16), 1-8.
- Helm, M & Bourne, N. 2004. *Hatchery culture of bivalves – A practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 471: 1-203.

- Heslinga, G, Watson, T & Isamu, T. 1990. Giant clam farming. Pacific Fisheries Development Foundation (NMFS/NOAA), Honolulu, Hawaii, USA, 179pp.
- Hermann, M, Alfaya, JEF, Lepore, ML, Penchaszadeh, PE, & Laudien, J. 2009. Reproductive cycle and gonad development of the northern Argentinean *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Helgol. Mar. Res.*, 63:207-218.
- Hermann, M, Alfaya, JEF, Lepore, ML, Penchaszadeh, PE & Arntz, W. 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy, temperate beach in northern Argentina. *Helgol Mar Res.*, 65: 285-297.
- Hooker, SH. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand pipi, *Paphies australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Bulletin of Marine Science*, 61(2): 225–240.
- Huber, M. 2010. Compendium of bivalves. A full-color guide to 3,300 of the world's marine bivalves. A status on Bivalvia after 250 years of research. ConchBooks, Hockenheim, Germany.
- Joaquim, S, Matias, D, Matias, AM, Gonçalves, R, Chícaro, L & Gaspar, MB. 2014. New species in aquaculture: are the striped venus clam *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) and the surf clam *Spisula solida* (Linnaeus 1758) potential candidates for diversification in shellfish aquaculture? *Aquaculture Research*, 47: 1327–1340.
- Kumar, SA, Nadeeka, GG & Jayasena, DD. 2018. Comparative analysis of morphological characteristics of clam (*Marcia opima*) in mannar coastal belt, Sri Lanka. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(3): 392-399.
- Lagrece-Squella, FJ, Suhnel, S, Vieira, G, Langdon, C & Melo, CMR. 2018. Optimizing broodstock conditioning for the tropical clam *Anomalocardia brasiliana*. *Journal of Shellfish Research*, 37(5): 979–987.
- Lemarié, DP, Smith, DR, Villela, RF & Weller, DA. 2000. Evaluation of tag types and adhesives for marking freshwater mussels (Mollusca: Unionidae). *Journal of Shellfish Research*, 19: 247-250.
- Lepore, ML 2008. Estudio del crecimiento de la almeja amarilla argentina *Mesodesma mactroides* por marcaje fluorescente in situ y comparación con el método de análisis de distribuciones de frecuencias de tallas. 47f. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Argentina, 2008.

- Lonhart, S. I. 1999. Multiple techniques for marking subtidal marine mollusks. In: Heine, J, Caneatro, D & Wuttken, G. (eds.). Proceeding of the American Academy of Underwater Science 19th Annual Scientific Diving Symposium. American Academy of Underwater Sciences, Nahant, Massachusetts. pp. 67-70.
- Lucas, A & Beninger, P. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44: 187-200.
- Mamat, NZ. 2010. Nutrition and broodstock conditioning of the New Zealand pipi, *Paphies australis*. 133f. Thesis (Master of Applied Science). Auckland University of Technology, New Zealand.
- Mamat, NZ & Alfaro, AC. 2014. Evaluation of microalgal and formulated diets for the culture of New Zealand pipi clam *Paphies australis*. *Int Aquat Res.* 6:57, 1-11.
- Marins LF, Levy JA. 1999. High genetic distance between marine bivalves of the genus *Mesodesma* inhabiting the Atlantic and Pacific coasts of South America. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 124(3):313–319
- Marshall, R, McKinley, RS & Pearce, CM. 2012. Effect of temperature on gonad development of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa*, Gould, 1850). *Aquaculture* 338-341, 264-273.
- Masello, A. 1987. Consideraciones sobre crecimiento y biología reproductiva de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854). 126f. Tesis (Licenciatura en Oceanografía Biológica). Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Matias, D, Joaquim, S, Leitão, A & Massapina, C. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquacult Int*, 17: 257-271.
- Matias, D, Joaquim, S, Matias, AM & Leitão, A. 2016. Reproductive effort of the European clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): influence of different diets and temperatures. *Invertebrate Reproduction & Development*, 60(1): 49-58.
- Martínez-Pita, I, Sánchez-Lazo, C & García, FJ. 2016. Influence of microalga lipid composition on the sexual maturation of *Mytillus galloprovincialis*: a hatchery study. *Aquaculture Nutrition*, 22: 202-216.
- McLachlan, A. 1982. A model for the estimation of water filtration and nutrient regeneration by exposed sandy beaches, *Mar. Environ. Res.* 6, 37-48.

- McLachlan, A. 2018. Fisheries. In: McLachlan, A & Defeo, O. The Ecology of sandy shores. Academic Press, Chap. 14: 331-372.
- McLachlan, A, Dugan JE, Defeo, O, Ansell, AD, Hubbard, DM, Jaramillo, E, & Penchaszadeh, PE. 1996. Beach clam fisheries. In: Barnes H, Ansell AD, Gibson RN & Barnes, M (ed). Oceanography and Marine Biology: an annual review. London, UCL Press, 34: 163-232.
- Morse, DE, Duncan, H, Hooker, N & Morse, A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. Science, 196: 298-300.
- Muller-Feuga, A, Kaas, R & Moal, J. 2003. The microalgae of aquaculture. In: Stottrup, J & McEvoy, L (eds). Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Science Publications Ltd, Oxford, UK, Chapter: 207–252.
- Narejo, NT, Rahmatullah, SM & Mammur, M. 2002. Length-weight relationship and relative condition factor (K) of *Monopterus cuchia* (Hamilton). Indian J. Fish., 49(3): 329-333.
- Nottingham, CD & White, WL. 2015. Annual reproductive cycle and condition index of the New Zealand surf clam *Macraa murchisoni* (Deshayes, 1854) (Bivalvia: Macrtridae). Journal of Shellfish Research, 34 (3): 777–784.
- Odebrecht, C, Rörig, LR, Garcia, VMT & Abreu, PC. 1995. Shellfish mortality and a red tide event in southern Brazil. In: Harmful Marine Algal Blooms. P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, & C. Marcaillou (eds). Paris: Lavoisier Science, 213–218.
- Ojea, J, Pazos, AJ, Martínez, D, Novoa, S, García-Martínez, P, Sánchez, JL & Abad, M. 2008. Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*. Journal of Shellfish Research, 27: 1093 – 1100.
- Olivares-Bañuelos, TN, Rodríguez-González, D , García-Pamares, J & González-Gómez, MA. 2017. First description of growth, development and rearing of the sandy clam *Chione cortezi* (Bivalvia, Veneridae) (Carpenter, 1864).Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 12(3): 206-217.
- Olivier, SR, Penchaszadeh, P. 1971. Ecología General. In: OLIVIER, S. R (ed). Estructura de la comunidad, dinamica de poblacion y biologia de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*). Desh. 1854) en Mar Azul. Instituto de Biología Marina, Argentina, Chap.1: 13-35.

- Ortega, L, Castilla, JC, Espino, M, Yamashiro, C & Defeo, O. 2012. Effects of fishing, market price, and climate on two South American clam species. *Marine Ecology Progress Series*, 469: 71-85.
- Perea, A & Gálvez, MA. 2015. Maturity grading key of *Mesodesma donacium* (Bivalvia, Mesodesmatidae). *The Biologist*, 13(2): 257-269.
- Proverbio, C, Carnevia, D, Jorge-Romero, G & Lercari, D. 2019. Herramientas para el mantenimiento de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* en condiciones experimentales de cautiverio. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, 18, 124-141.
- Ramos, CO, Gomes, CHAM, Magalhães, ARM, Santos, AI & Mello, CMR. 2014. Maturation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* at different temperatures in the laboratory. *Journal of Shellfish Research*, 33(1): 187–194.
- Redfearn, P. 1982. Larval shell development of the toheroa, *Paphies ventricosa* (Gray, 1843) (Mactracea: Mesodesmatidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 16: 241-252.
- Rheault, R. 2012. Shellfish aquaculture. In: Tidwell, J. (ed.), *Aquaculture Production Systems*. Oxford: Wiley-Blackwell, Chapter 5: 79-118.
- Riascos, JM, Carstensen, D, Laudien, J, Arntz, W, Oliva, ME, Güntner, A & Heilmayer, O. 2009. Thriving and declining: climate variability shaping life-history and population persistence of *Mesodesma donacium* in the Humboldt Upwelling System. *Marine Ecology Progress Series*, 385: 151-153.
- Rosa, AO. 2006. A importância dos mariscos na subsistência de antigos grupos indígenas no Litoral Central. *Pesquisas Antropologia* 63: 259-288.
- Rose, RA, Dybdahl, RE & Harders, S. 1990. Reproductive cycle of the western Australian silverlip pearl oyster, *Pinctada marima* (Jameson) (Mollusca, Pteriidae). *J. Shellfish Res.*, 9(2): 261-272.
- Santos, JJS, Carvalho, YB, Lopes, DA & Romano, LA. 2016. Immunological Profile of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Mesodesmatidae) from the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of Aquatic Animal Health*, 28:11–20.
- Santos, JJS. 2019. Produção de formas jovens do marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve,1854) (Bivalvia: Mesodesmatidae), em laboratório. 121f. Tese (Doutorado em Aquicultura). Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil.

- Sarkis, S. & Lovatelli, A. 2007. Installation and operation of a modular bivalve hatchery. Rome, FAO Fisheries Technical Paper 492: 173p
- Sastry, AN. 1963. Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* (Lamarck). Influence of temperature on maturation and spawning. Biol. Bull. 125:146-153.
- Setyono, DED. 2005. Broodstock conditioning for the tropical abalone (*Haliotis asinina*) under different combination of photoperiod and water temperature. Indonesian Fish. Res. Journal, 11: 81-88.
- Sharma R, Venkateshvaran, K & Purushothama, CS. 2005. Length-weight relationship and condition factor of *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) and *Meretrix meretrix* (Linnaeus, 1758) from Mumbai waters. J. Indian Fish. Assoc., 32: 157-163
- Sousa, R, Delgado, J, Pinto, AR & Henriques, P. 2017. Growth and reproduction on the North-eastern Atlantic keystone species *Patella aspera* (Mollusca: Patellogastropoda). Helgol Mar Res, 71(8): 1-13.
- Sreedevi, PR, Uthayakumar, V, Jayakumar, R & Ramasubramanian. 2014. Influence of rearing water temperature on induced gonadal development and spawning behaviour of tropical green mussel, *Perna viridis*. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(3): 204-209.
- Tanyaros, S & Tarangkoon, W. 2016. Variability in larval period, post-setting growth and survival of the oyster *Crassostrea belcheri* produced by gamete stripping method. Agriculture and Natural Resources, 50: 295-298.
- Thompson, GA & Bock, MFS. 2007. Mortandad masiva de *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mactracea) en el partido de la costa, Buenos Aires, Argentina, en Septiembre 2004. Atlântica, 29(2): 115-119.
- Trevelyan, GA & Chang, ES. 1983. Experiments on larval rearing of the California mussel (*Mytilus californianus*). J. World Maricul. Soc. 14:137-148.
- Trigos, S, Vicente, N, Prado, P & Espinós, FJ. 2018. Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. Aquaculture, 483: 102–110.
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, FR.
- Utting, SD & Spencer, BE. 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. MAFF Fish. Res., Lowestoft, 68:31p.
- Utting, SD. 1993. Procedures for the maintenance and hatchery conditioning of bivalve broodstocks. World Aquaculture 24(3), 78-82.

- Utting, SD & Millican, PF. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155: 45-54.
- Vasquez, N, Fiori, S, Arzul, I, Carcedo, C & Cremonte, F. 2016. Mass mortalities affecting populations of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* along its geographic range. *Journal of Shellfish Research*, 35(4): 739–745.
- Velasco, LA, Barros, J & Acosta, E. 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture*, 266:153–165.
- Viet Le, D, Alfaro, AC & King, N. 2014. Broodstock conditioning of New Zealand geoduck (*Panopea zelandica*) within different temperature and feeding ration regimes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48(3): 356-370.
- Vosloo, D & Vosloo, A. 2017. Short postspawning recovery time affects DNA integrity and fertilization success of South African abalone (*Haliotis midae*) oocytes. *Journal of Shellfish Research*, 36 (1): 169-174.
- Zevallos, S, & Toledo, P. 2017. Use of microalgae for broodstock conditioning of *Mesodesma donacium* (Mesodesmatidae). *The Biologist*, 15(1): 109-117.
- Wisjman, J, Troost, K, Fang, J, & Roncarati, A. 2019. Global production of marine bivalves, trends and challenges. In: Smaal et al. (eds). *Good and Services of Marine Bivalves*. Springer Open, Switzerland, Chapter 2: 7-26.
- World Register of Marine Species – WoRMS. 2020. Mollusca Base. *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854). Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=505790>. Acesso: 21/02/2020.
- Yan, H, Li, Q, Liu, W, Yu, R & Kong, L. 2010. Seasonal changes in reproductive activity and biochemical composition of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck 1818). *Marine Biology Research*, 6: 78-88.