



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

Produção de formas jovens do marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) (Bivalvia: Mesodesmatidae), em laboratório

Juan Jethro Silva Santos

Rio Grande, RS

2019



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

Produção de formas jovens do marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) (Bivalvia: Mesodesmatidae), em laboratório

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Aluno: MSc. Juan Jethro Silva Santos

Orientador: Dr. Prof. Luis Alberto Romano

Co-orientador: Dr. Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes

Fevereiro de 2019

Índice:

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Resumo geral.....	13
General abstract	15
Introdução geral	17
Panorama global.....	17
Espécie e estudos em laboratório	18
Variáveis ambientais no cultivo do marisco branco	20
Salinidade.....	20
Temperatura	21
Dietas.....	23
Objetivos.....	24
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos.....	24
Referências	25
Capítulo 1. Desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> (Reeve, 1854) (Mesodesmatidae) em laboratório.....	33
Resumo	34
1. Introdução.....	35
2. Material e Métodos	36
3. Resultados.....	39

4. Discussão	45
5. Conclusão	49
Agradecimentos	49
Referências	49
Capítulo 2. Efeito da salinidade no desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> (Reeve, 1854) em laboratório.....	54
Resumo	55
1. Introdução.....	56
2. Material e Métodos.....	57
3. Resultados.....	61
4. Discussão	65
5. Conclusão	69
Agradecimentos	69
Referências	69
Capítulo 3. Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco <i>Amarilladesma mactroides</i> (Reeve, 1854) em laboratório	75
Resumo	76
Introdução.....	76
Material e Métodos.....	78
Resultados.....	82
Discussão	86
Conclusão	89
Agradecimentos	89
Referências	89

Capítulo 4. Efeitos de diferentes dietas de microalgas vivas, no crescimento e sobrevivência de sementes do molusco de areia <i>Amarilladesma mactroides</i> (Reeve, 1854) em laboratório	95
Resumo	96
1. Introdução.....	97
2. Material e Métodos.....	99
3. Resultados.....	104
4. Discussão	105
5. Conclusão	112
Agradecimentos.....	113
Referências	113
Considerações Gerais	119
Conclusões Finais.....	120

Dedicatória

“Pois é, vá até...onde o destino não previu...

Sem mais, vá atrás...vou até onde eu conseguir...

Deixe o amanhã, e a gente sorrir...que o coração já quer descansar...”

Marcelo Camelo

Aos ancestrais e aos novos...

A família.

Agradecimentos

A minha família, principalmente aos meus pais Emanuel Santos e Joelina da Silva Santos. Todos os ensinamentos, princípios e valores foram postos a prova nesta trajetória. Seria humanamente impossível agradecê-los com palavras. No entanto, obrigado por me ensinarem a ser “humano” e por me fazerem acreditar que sonhos são reais.

Aos meus amigos mais próximos que conhecem minha trajetória de vida e luta, e que sempre acreditaram em mim e no meu trabalho, com muito carinho e orgulho.

A Universidade Federal de Rio Grande – FURG, que me proporcionou respirar pesquisa, assim como, conhecer grandes pesquisadores e professores. Em especial: ao Dr. Yuri Bovi, por ser um dos precursores desta pesquisa e por sempre torcer pelo desenvolvimento desta tese; Dr. Mário Roberto “Junim”, Dr. Lucas Campos “Luquinhas”, MSc. Rafael Buitrago “Rafita”, por serem meus orientadores e revisores nesta reta final., e acima de tudo, por serem grandes amigos.

Aos professores: Dr. Ricardo, Dr. Tesser e Dr. Geraldo, que diretamente e indiretamente, mesmo atuando em áreas de pesquisas diferentes, jamais negaram apoio, motivação e carinho e conseqüentemente, a todos os colegas, amigos e funcionários da EMA (Estação Marinha de Aquicultura) que me ajudaram principalmente na convivência, com apoio, carinho e respeito incondicional todos os dias.

A Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, por me acolher e disponibilizar estrutura e conhecimento. Além de me integrar a família LMM (Laboratório de Moluscos Marinhos), o que tornou possível a minha satisfação pessoal como pesquisador e realização desta pesquisa.

Dentre os membros desta família encontram-se os professores: Dr. Marcos “Marcão” por tornar possível o meu estágio inicial; Dr. Melo, por dar carta branca e tranquilidade para o desenvolvimento da pesquisa; Dr. Carlos Henrique “Tatu” ao aceitar o desafio e por acreditar na proposta de trabalhar com uma espécie nova, tornando-se uma pessoa que estimo grande admiração e amizade; e a todos os membros desta equipe, que tornaram a rotina de trabalho e de vida mais leves: Eduardo Nunes “Guru Duda”, Alexandre, Rico, Jaqueline, Francisco “Chicão”, Blacher, Paulo “japonês”, Guilherme “Gui”, Ana, Zezé, Sino, Gabriel Nandi, Cássio Ramos e João. E principalmente a Juliana Portella, por aceitar a me acompanhar neste desafio, com ajuda em todas etapas experimentais e principalmente nas etapas psicológicas, que não aparecem no currículo Lattes ou artigos. Me fornecendo apoio, motivação e sempre confiança.

E por fim, ao professor Dr. Romano, por mais uma vez aceitar o desafio de me orientar, firmando-se como mestre de vida, professor e grande amigo. Obrigado por sempre acreditar em meu potencial e trabalho.

Lista de figuras

Capítulo 1.

Figura 1. Estágios embrionários de desenvolvimento de *Amarilladesma mactroides*: (A) (B) ovócito fertilizado com primeiro corpúsculo polar; (C) segundo corpúsculo polar; (D) primeira divisão embrionária; (E) embrião de 2 células; (F) divisões iniciais; (G) múltiplas divisões; (H) múltiplas divisões; (I) blástula; (J) gástrula; (K) primeiro movimento de cílios e natação; (L) trocófora; (M) trocófora; (N) trocófora; (O) véliger estágio D..... 41

Figura 2. Dados de crescimento larval da espécie *Amarilladesma mactroides*, regressões para os dados de crescimento em função do tempo em Graus/Dia. A. Altura = $31,05 \pm 0,92$; Dia + $12,07 \pm 15,51$; $r^2 = 0,91$; $p < 0,0001$. B. Comprimento = $35,78 \pm 1,1$; Dia + $16,66 \pm 18,0$; $r^2 = 0,91$; $p < 0,0001$. C. Altura = $0,86 \pm 0,005$ Comprimento = $1,298 \pm 2,96$; $r^2 = 0,99$; $p < 0,0001$. D. Médias temperaturas no período experimental. E. Comprimento = $2,5 \pm 0,11$ Graus/Dia + $33,88 \pm 24,66$; $r^2 = 0,83$; $p < 0,0001$, Altura = $2,17 \pm 0,09$ Graus/Dia + $27,09 \pm 21,33$; $r^2 = 0,84$; $p < 0,0001$ 43

Figura 3. Desenvolvimento larval de *Amarilladesma mactroides*, médias (\pm DP) de comprimento de concha (μm), no período de 27 dias. (A) véliger D, 1 dia; (B) véliger D, 2 dias; (C) larvas umbonadas iniciais, 8 dias; (D) larvas umbonadas, 10 dias; (E) larvas umbonadas, 15 dias; (F) pediveliger, 25 dias; e (G) pediveliger, 27 dias..... 44

Capítulo 2.

Figura 1 (A-C). Médias de altura (A) e comprimento (B) das larvas de *Amarilladesma mactroides* expostas a diferentes salinidades: 20, 25, 30 e 35 ppt em laboratório, com duração de 27 dias de larvicultura. (C) Médias de altura das larvas em função do tempo que ajustam ao modelo estatístico de Von Bertalanffy. Médias de temperatura (\pm DP) de $19,4 \pm 1,4$ °C 64

Figura 2. Taxa de sobrevivência (%) das larvas de *Amarilladesma mactroides* expostas a diferentes salinidades: 20, 25, 30 e 35 ppt em laboratório, com duração de 27 de larvicultura. Médias de temperatura (\pm DP) de $19,4 \pm 1,4$ °C..... 65

Capítulo 3.

Figura 1. Médias de altura e comprimento de conchas de larvas de *Amarilladesma mactroides*, submetidos a diferentes temperaturas (18, 20, 23 e 26 °C), durante o período

experimental de 24 dias. Imagens à esquerda representam análise de regressão da altura e comprimento (ANOVA de duas vias). Enquanto que as imagens da direita indicam o crescimento das larvas, em que (*) expressa diferenças biométricas significativas entre os tratamentos 18 e 20 °C comparados com o tratamento 26 °C..... 84

Figura 2. Taxa de mortalidade (%) das larvas de *Amarilladesma mactroides* expostas a diferentes temperaturas: 18, 20, 23 e 26 °C em laboratório, com duração de 24 dias de larvicultura..... 85

Capítulo 4.

Figura 1. Médias de peso vivo total (g) de sementes de *A. mactroides* alimentadas com diferentes dietas, durante 28 dias. Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO); Cm: *Chaetoceros muelleri*; Ts: *Tetraselmis suecica*; S/A: sem fornecimento de microalgas 107

Figura 2. Médias de peso vivo total (g) e peso seco (g) de sementes de *Amarilladesma mactroides* alimentadas com dietas bialgais em diferentes proporções, concentrações e volumes, no período experimental de 21 dias. Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) e Cm: *Chaetoceros muelleri*..... 107

Lista de tabelas

Capítulo 1.

Tabela 1. Estágios embrionários de *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) em função do tempo, cultivados em $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (n = 10) 40

Tabela 2. Etapas do desenvolvimento embrionário e larval em *Amarilladesma mactroides*, *Paphies ventricosa*, *Paphies subtriangulata*, *Paphies australis* e *Mesodesma donacium*, com tempos cronometrados (minutos, horas e dias pós fertilização) e medidas médias de altura e comprimento (μm) em cada estágio. Médias de temperaturas (\pm DP) referentes apenas a etapa de larvicultura das espécies. Ausência de informações representadas em linhas pontilhadas..... 47

Capítulo 2.

Tabela 1. Descrição do desenvolvimento embrionário da espécie *Amarilladesma mactroides* em diferentes salinidades: 20, 25, 30 e 35 ppt, no período de 27 horas. Número médio de indivíduos por tratamento = 10. Média de temperatura da água (\pm DP), durante o período experimental, $21,0 \pm 0,9^\circ\text{C}$. (-) Indicam ausência de informação referente ao período de transformação. 61

Tabela 2. Limite de tolerância e salinidades ótimas para o desenvolvimento de embriões para larvas D normais de algumas espécies de bivalves. 66

Tabela 3. Limite de tolerância e níveis ótimos de salinidade para o crescimento larval e sobrevivência de *Amarilladesma mactroides* e outras espécies de bivalves. 68

Capítulo 3.

Tabela 1. Descrição do desenvolvimento embrionário da espécie *Amarilladesma mactroides* em diferentes temperaturas: 18, 20, 23 e 26°C (\pm DP) com duração aproximada de 28 horas. Salinidade da água durante o período experimental, 35 ppt. Número médio de indivíduos por tratamento = 10..... 82

Capítulo 4.

Tabela 1. Microalgas utilizadas no experimento. Medidas de comprimento e largura (μm) descritos por Nell & O'Connor (1991). Medidas de peso seco, proteínas, lipídeos e carboidratos (pg.célula^{-1}) descritos por Brown (1991)..... 102

Tabela 2. Diferentes proporções, porcentagens e volumes de microalgas utilizadas para as etapas experimentais de sementes de *Amarilladesma mactroides*. Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO); Cm: *Chaetoceros muelleri*; Ts: *Tetraselmis suecica*; S/A: sem fornecimento de microalgas..... 102

Tabela 3. Médias (\pm desvio padrão) de altura (A) e comprimento (C) de conchas e mortalidade (M%) de sementes de *Amarilladesma mactroides*, alimentado com diferentes dietas de microalgas. Resultados referentes aos últimos dias de cada etapa experimental. Letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO); Cm: *Chaetoceros muelleri*; Ts: *Tetraselmis suecica*; S/A: sem fornecimento de microalgas..... 108

1 **Resumo geral**

2 A malacocultura é uma atividade que contribui com a produção aquícola mundial, com
3 destaque aos moluscos bivalves. Neste contexto, a América Latina vem investindo no
4 cultivo e pesquisas de espécies de bivalves exóticos e principalmente em espécies nativas
5 com potencial para produção. Esse investimento tende a aumentar a diversificação de
6 espécies cultivadas, e, conseqüentemente, implica na diminuição da sobrepesca dos
7 estoques naturais, tornando-se uma alternativa como fonte de renda e alimento para várias
8 regiões. Partindo desse pressuposto, o marisco branco *Amarilladesma mactroides* é um
9 bivalve de areia, da família Mesodesmatidae, com importância socioeconômica nas
10 regiões, onde essa espécie é endêmica e que por várias décadas está suscetível à sobre-
11 exploração e surtos de mortalidades sem causas definidas. Por este motivo, inúmeras
12 pesquisas vêm sendo desenvolvidas referentes a esta espécie, no entanto nenhuma
13 relacionada à sua reprodução em laboratório. Devido à problemática relacionada ao
14 desaparecimento do marisco branco, em ambiente natural, a produção de sementes pode
15 ser uma alternativa inicial para controle do estoque no ambiente. Contudo, para o
16 desenvolvimento da aquicultura de uma espécie nova, são necessárias informações sobre
17 os requerimentos biológicos e ecológicos perante variáveis ambientais, em laboratório,
18 para posteriormente observar seu desempenho em sistemas de cultivo. Desta forma, os
19 capítulos do presente trabalho visaram obter informações sobre a produção em laboratório
20 do marisco branco, levando-se em consideração inicialmente realizar e descrever a
21 larvicultura, para posteriormente avaliar o efeito de variáveis como salinidade,
22 temperatura e dietas, nas etapas de desenvolvimento embrionário, larval assim como, no
23 assentamento desta espécie. O capítulo 1 demonstrou que foi possível a realização da
24 desova pela técnica de “stripping”, em que através de análises descritivas acompanhou-
25 se as etapas do desenvolvimento embrionário completo, desde a fertilização até a
26 formação de larvas D, com duração de 24 horas. Observou-se um desenvolvimento larval
27 positivo por meio das variáveis biométricas de altura e comprimento de conchas em
28 função do tempo, com formação de larvas pedivéligers prontas para assentamento, no
29 período de 27 dias. No capítulo 2, embriões e larvas de *A. mactroides* foram submetidos
30 e mantidos a quatro salinidades diferentes: 20, 25, 30 e 35 ppt, para determinar as
31 condições ótimas para a espécie. Os resultados deste experimento indicaram que embriões
32 e larvas toleram salinidades entre (25 - 35 ppt), com o melhor crescimento e sobrevivência
33 em salinidades elevadas de 35 ppt. Enquanto que no capítulo 3, avaliou-se o efeito de

34 quatro diferentes temperaturas (18, 20, 23 e 26 °C) no desenvolvimento embrionário,
35 crescimento larval e sobrevivência do marisco branco. Os resultados indicaram que os
36 embriões desta espécie são capazes de tolerar uma variação de 18 a 26 °C de temperatura,
37 sendo o efeito desta variável um determinante na velocidade de metamorfose. Diante das
38 condições experimentais adotadas, as larvas mantiveram-se dependentes das
39 temperaturas mais baixas (18 e 20 °C) para estarem aptas ao assentamento em melhores
40 condições de tamanho e sobrevivência. E por fim, no capítulo 4 avaliou-se o efeito de
41 diferentes proporções, quantidades e concentrações de três microalgas vivas,
42 consolidadas na aquicultura como fonte de alimentação: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO)
43 (Iso); *Chaetoceros muelleri* (Cm) e *Tetraselmis suecica* (Ts). Neste experimento, as
44 sementes de marisco branco alimentadas com as dietas compostas por *I. galbana* e *C.*
45 *muelleri* ofertadas de forma isolada ou misturadas entre si (diversas proporções),
46 apresentaram maior crescimento e sobrevivência em laboratório. Dessa maneira, com
47 estes resultados pode-se dizer que foi possível realizar um protocolo básico de cultivo de
48 *A. mactroides* em laboratório, no qual, estas informações podem contribuir para futuros
49 programas de repovoamento do ambiente natural e produção de sementes para fins do
50 cultivo desta espécie.

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 General abstract

66 Malacoculture is an activity which contributes to world aquaculture production,
67 highlighting bivalve molluscs. In this context, Latin America has been investing on
68 farming and research of exotic bivalve species and mainly in native ones with potential
69 for production. This investment tends to increase the diversification of farmed species,
70 and consequently implies on overfishing decrease of natural stocks, becoming an
71 alternative for food and income to several regions. Based on this assumption, the yellow
72 clam *Amarillidesma mactroides* is a sand bivalve of Mesodesmatidae family, with
73 socioeconomic importance in regions where this species is endemic and for several
74 decades is susceptible to excessive exploitation and mortality outbreaks without definite
75 causes. For this reason, many researches are being developed regarding this species,
76 however no one is related to its reproduction in laboratory. Due to yellow clam vanishing
77 in natural environment, seed production may be an alternative to control the environment
78 stock. Nevertheless, to aquaculture development of new species, it is necessary
79 information about biological and ecological requirements toward environmental variables
80 in laboratory to later observe its performance in farming systems. In this way, the chapters
81 of the present work aimed to obtain information on the laboratory production of yellow
82 clam, taking into account initially to describe and describe the larviculture, to later
83 evaluate the effect of variables such as salinity, temperature and diets, in the stages of
84 development embryonic, larval as well as in the settlement of this species. Chapter 1
85 demonstrated that it was possible to perform spawning by the stripping technique, in
86 which descriptive analysis was followed by the stages of complete embryonic
87 development, from fertilization to the formation of D larvae, lasting 24 hours. A positive
88 larval development was observed by means of the biometric variables of height and length
89 of shells as a function of time, with formation of pediveliger larvae ready for settlement,
90 in the period of 27 days. In Chapter 2, embryos and larvae of *A. mactroides* were
91 submitted to and maintained at four different salinities: 20, 25, 30 and 35 ppt, to determine
92 optimal conditions for the species. The results of this experiment indicated that embryos
93 and larvae tolerate salinities between (25-35 ppt), with the best growth and survival at
94 high salinities of 35 ppt. While in Chapter 3, the effect of four different temperatures (18,
95 20, 23 and 26 °C) on embryonic development, larval growth and survival of yellow clam
96 was evaluated. The results indicated that the embryos of this species are able to tolerate a
97 variation of 18 to 26 °C of temperature, being the effect of this variable a determinant in

98 the speed of metamorphosis. In view of the experimental conditions adopted, the larvae
99 remained dependent on the lower temperatures (18 and 20 °C) to be able to settle in better
100 conditions of size and survival. Finally, in Chapter 4, the effect of different proportions,
101 quantities and concentrations of three live microalgae, consolidated in aquaculture as a
102 source of feed, was evaluated: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) (Iso); *Chaetoceros*
103 *muelleri* (Cm) and *Tetraselmis suecica* (Ts). In this experiment, the yellow clam fed diets
104 composed of *I. galbana* and *C. muelleri*, offered in isolation or mixed with each other
105 (several proportions), presented higher growth and survival in the laboratory. Thus, with
106 these results it can be said that it was possible to carry out a basic protocol for the
107 cultivation of *A. mactroides* in the laboratory, in which, this information may contribute
108 to future programs to repopulate the natural environment and seed production for the
109 purpose of cultivating this species.

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125 **Introdução geral**

126 *Panorama global*

127 A aquicultura é uma atividade interdisciplinar (Arana, 1999) que está relacionada
128 à produção de organismos biológicos e seus produtos derivados, pertencente a um sistema
129 aquático visando a sustentabilidade (FAO, 2018). Estima-se que a produção aquícola
130 mundial chegou a 110,2 milhões de toneladas (incluindo plantas aquáticas) gerando 243,5
131 bilhões de dólares (FAO, 2018). Dentre estes valores, a malacocultura, contribuiu com
132 17,1 milhões de toneladas, com geração de 29,2 bilhões de dólares (FAO, 2018).
133 Mantendo o destaque, como no relatório anterior (FAO, 2016), à produção de bivalves
134 marinhos: ostras, mexilhões e moluscos de areia.

135 Para Marques (2004) apesar da importância dos moluscos marinhos para a
136 economia e como fonte de alimento, ainda existem poucos estudos quando comparados
137 com o número de espécies existentes. Sendo as espécies de bivalves de areia mais
138 desprivilegiadas com dados biológicos básicos, o que gera dificuldades na gestão destes
139 recursos naturais (Santos, 2014).

140 Há alguns anos, a América latina vem investindo no cultivo e pesquisa de espécies
141 de bivalves com importância econômica, tanto espécies exóticas, tais como a ostra do
142 pacífico *Crassostrea gigas* e o mexilhão azul *Mytilus galloprovincialis*; quanto espécies
143 nativas, tais como os mexilhões *M. chilensis* e *Perna perna*, a vieira *Nodipecten nodosus*,
144 as ostras *C. rhizophorae* e *C. brasiliana*, e o bivalve de areia *Anomalocardia brasiliana*
145 (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2008; Oliveira *et al.*, 2016).

146 Com a inserção de espécies nativas na produção aquícola aumenta-se a
147 diversificação de espécies cultivadas, e conseqüentemente a diminuição da sobrepesca
148 dos estoques naturais, além de gerar fontes de renda e alimento nas regiões em que estas
149 espécies são endêmicas (Uriarte, 2008).

150 Neste contexto para Santos *et al.* (2016), a família Mesodesmatidae está
151 representada por moluscos de areia que apresentam importância socioeconômica em
152 diversas regiões do mundo, sendo apontadas como promissoras para aquicultura, como
153 as espécies *Paphies ventricosa* (toheroa) (Redfearn, 1982; Gadomski *et al.*, 2015) e
154 *Paphies australis* (pipi) (Hooker, 1997), na Nova Zelândia e *Mesodesma donacium* (La
155 macha) (Uriarte, 2008; Ayerbe *et al.*, 2017), no Chile e Peru. No decorrer dos anos,
156 pesquisas referentes a estas espécies estão sendo desenvolvidas, almejando informações

157 que visem estabelecer protocolos de cultivo em laboratório (Hooker, 1997; Gadomski *et*
158 *al.*, 2015; Ayerbe *et al.*, 2017).

159 Ao longo da costa brasileira, podem ser destacadas algumas espécies nativas de
160 moluscos de areia que apresentam importância histórica e ou econômica em várias regiões
161 nas quais são exploradas, como: *Donax hanleyanus* (Philippi, 1847), *Cyrtopleura costata*
162 (Linnaeus, 1758) e *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Lagrzeze, 2014), e a
163 espécie *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854), representante da família
164 Mesodesmatidae, que se enquadra também nestas características.

165 *Espécie e estudos em laboratório*

166 O marisco branco, *Amarilladesma mactroides*, até pouco tempo classificado como
167 *Mesodesma mactroides*, é uma espécie nativa do litoral do Brasil, Uruguai e Argentina
168 distribuindo-se desde a Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil até o sul da província de
169 Buenos Aires, Argentina (Rios, 1994). Estes animais são comercialmente explorados
170 (Herrmann *et al.*, 2011), possuindo um valor histórico como recurso pesqueiro (Coscarón,
171 1959; McLachlan, 2018), sendo extraídos para alimentação humana e para atividades
172 recreativas, como isca de pesca (Bastida *et al.*, 1991). Biologicamente é uma espécie
173 dióica, sem dimorfismo sexual, no qual suas larvas apresentam período planctônico
174 (Coscarón, 1959). Habitam de forma agregada, zonas entremarés de praias arenosas
175 subtropicais e temperadas (Bergonci, 2005). Além disso, são suspensívoros, filtradores
176 de microalgas e material em suspensão, assim como sedimentívoros, alimentando-se de
177 detritos no sedimento (Defeo & Scarabino 1990), que devido à baixa capacidade de
178 detoxificação aliada a alta tolerância a contaminação, os torna bons indicadores
179 biológicos (bioacumulação) de qualidade de água dos oceanos e outros mananciais
180 hídricos (Defeo & Scarabino, 1990).

181 A comercialização desta espécie, assim como de outros moluscos de areia, é
182 baseada na extração em estoques naturais. Dados sobre a quantidade de extração desse
183 recurso são escassos, com registros na Argentina, destacando exploração máxima de
184 1.079 toneladas no ano de 1953, havendo a necessidade de proibição da pesca em 1956,
185 com o intuito de recuperação dos estoques naturais (Coscaron 1959), porém sem êxito.
186 No Uruguai, iniciou-se o levantamento estatístico de extrações a partir dos anos 1980,
187 com dados referentes a 62 toneladas em 1981 e 219 toneladas no ano de 1985, de retirada
188 de marisco branco do ambiente (Defeo, 2003). Desde então estudos vinculados a gestão

189 deste recurso são desenvolvidos (Defeo, 2003; Gianelli *et al.*, 2015). No Brasil não
190 existem dados da real quantidade desse recurso extraído por ano.

191 Diante deste cenário, atualmente a população de marisco branco encontra-se
192 drasticamente reduzida, devido a ação antrópica vinculada à extração excessiva (Carvalho
193 *et al.*, 2013a; Carvalho *et al.*, 2013b; Santos *et al.*, 2016) e surtos de mortalidades
194 massivas, que vêm acometendo os estoques naturais desta espécie ao longo da sua
195 distribuição geográfica (Ortega *et al.*, 2012). Contudo a real causa das mortalidades ainda
196 permanece desconhecida (Santos *et al.*, 2016).

197 Desta forma, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, visando o desenvolvimento de
198 estratégias e programas de gestão destes recursos (Gianelli *et al.*, 2015), assim como
199 estudos ambientais, por exemplo, prevalência de patógenos, ação antrópica e
200 sazonalidade (Carvalho *et al.*, 2013a; Carvalho *et al.*, 2013b; Santos *et al.*, 2016); e
201 laboratoriais, por exemplo, tolerância à salinidade e índice apoptótico, utilizando como
202 histopatologia e imunologia (Carvalho *et al.*, 2015a; Carvalho *et al.*, 2015b; Carvalho *et*
203 *al.*, 2016). No entanto, pouco ainda se conhece sobre o desenvolvimento embrionário e
204 larval em laboratório de *A. mactroides*, apenas as informações limitadas de Coscarón
205 (1959), que não conseguiu completar a metamorfose das larvas em laboratório.

206 No cultivo de moluscos bivalves, as formas jovens (sementes) podem ser obtidas
207 através da extração e captação nos estoques naturais, e da produção em laboratório
208 (Lagreze, 2014). Devido a problemática ambiental de *A. mactroides*, a produção de
209 sementes em laboratório tende a ser a mais viável. No entanto, para a introdução e
210 desenvolvimento da malacocultura de novas espécies é de suma importância o
211 conhecimento adequado dos requerimentos biológicos e ecológicos perante variáveis
212 ambientais em laboratório, para posteriormente observar seu desempenho em sistemas de
213 cultivo (Urban, 2000; Madrones-Ladja, 2002; Huo *et al.*, 2014).

214 Variáveis ambientais como salinidade, temperatura e disponibilidade de alimento
215 são fatores que afetam diretamente os moluscos bivalves, desde o condicionamento de
216 reprodutores até os processos de larvicultura (desenvolvimento embrionário e larval) e de
217 assentamento desta espécie (Calabrese & Davis, 1970). Apenas com estas informações, a
218 produção em laboratório do marisco branco, poderia auxiliar e contribuir para o
219 desenvolvimento de programas de repovoamento do ambiente natural e produção de
220 sementes para fins da aquicultura. Processo que já vem ocorrendo com a espécie
221 *Mesodesma donacium* no Peru (Ayerbe *et al.*, 2017).

222 *Variáveis ambientais no cultivo do marisco branco*

223 *Salinidade*

224 A salinidade é uma variável que influencia nas atividades biológicas de bivalves,
225 tais como condicionamento e maturação de reprodutores em laboratório (Utting &
226 Millican, 1997), indução da desova (Southgate & Lee, 1998) e conseqüentemente no
227 desenvolvimento embrionário e larval (Madrones - Ladjá, 2002; Huo *et al.*, 2014; Fang
228 *et al.*, 2016) além de ser um critério fundamental na seleção de áreas para o crescimento
229 (Madrones - Ladjá, 2002). Desta forma, esta variável é de suma importância para a
230 sobrevivência e crescimento larval em laboratório (Huo *et al.*, 2017), sendo necessário
231 compreender os níveis de tolerância assim como os níveis ótimos para os organismos
232 (Nell e Holliday, 1988).

233 Segundo Davis (1958), a tolerância dos embriões à salinidade é proveniente da
234 salinidade no qual os reprodutores são condicionados e do local que ocorre a desova. No
235 entanto, para este tipo de afirmação, diante das inúmeras espécies de bivalves cultivados
236 e com potencial para cultivo, Fang *et al.*, (2016) afirmam que é vital conduzir estudos de
237 tolerância ambiental em laboratório, principalmente para os estágios de vida mais
238 complexos de uma espécie (por exemplo as etapas iniciais de vida). Estas informações
239 são condizentes com Utting & Millican (1997), que relatam que a salinidade da água deve
240 ser controlada (ao ótimo da espécie), visto que níveis abaixo do ideal podem afetar a
241 maturação e desenvolvimento dos oócitos e a subsequente viabilidade larval. Southgate
242 & Lee (1998), em um estudo com *Saccostrea echinata*, observaram ao realizar a
243 indução à desova, uma sobrevivência larval baixa (utilizando salinidades reduzidas),
244 relacionando este efeito a influência da salinidade.

245 Juvenis e adultos de *A. mactroides* (juvenis e adultos) são considerados
246 eurihalinos moderados, tolerando salinidades de 15 a 35 ppt (Carvalho *et al.*, 2015b) e
247 osmoconformadores (Lopes *et al.*, 2011), como vários moluscos bivalves (Shumway,
248 1977). Esta espécie fica suscetível a ambientes que podem apresentar flutuações de
249 salinidades, tal como a praia do Cassino na costa sul do Rio Grande do Sul, com registros
250 de variações de 14 a 38 ppt (Odebrecht *et al.*, 2010). Desta forma, estas mudanças tendem
251 a causar estresses salinos que afetam a taxa de filtração, devido ao fechamento parcial ou
252 total das valvas, como forma de isolamento dos órgãos internos com o meio externo
253 (mecanismo de defesa) (Shumway, 1977), havendo gastos de energia para ajustar a
254 pressão osmótica de acordo com a salinidade da água do mar (busca da homeostase),

255 processo que também afeta a ingestão de alimentos e conseqüentemente o crescimento
256 (Huo *et al.*, 2017).

257 Mesmo com estudos demonstrando a capacidade de bivalves tolerarem uma ampla
258 variação de salinidade, os efeitos desta variável nas larvas de moluscos ainda não são
259 completamente conhecidos (Huo *et al.*, 2017). Para Mackie (1984), a salinidade exerce
260 uma grande influência nas características dos organismos nos seus diferentes estágios de
261 vida, o que pode ser crucial para o desenvolvimento ou êxito reprodutivo, visto que, ainda
262 não existem informações sobre o efeito da salinidade no desenvolvimento embrionário e
263 larval do marisco branco.

264 Outros estudos comprovam que a salinidade também exerce influência direta em
265 outras variáveis ambientais, por exemplo, na tolerância à temperatura de larvas de
266 bivalves (Calabrese, 1969; Cain, 1973), o que fortalece a ideia de que são necessárias
267 mais pesquisas relacionadas a estes fatores ambientais no desenvolvimento embrionário
268 e larval de *A. mactroides*.

269 ***Temperatura***

270 A temperatura é um dos fatores mais influentes para moluscos bivalves (Helm *et*
271 *al.*, 2004; Huo *et al.*, 2017), pois influenciam na velocidade de reações químicas e
272 biológicas, e conseqüentemente em todo metabolismo dos organismos, como por
273 exemplo, no sistema imunológico afetando a contagem total de hemócitos (Santos *et al.*,
274 2016), mecanismos fisiológicos, tais como consumo de oxigênio e taxa de depuração
275 (Casas *et al.*, 2018) e atividades reprodutivas dos animais, tais como os processos de
276 condicionamento de reprodutores, desenvolvimento embrionário e larval, assim como
277 crescimento e sobrevivência (Gireesh & Gopinathan, 2004; Barber & Blake 2006;
278 Gadowski *et al.*, 2015; Gosling, 2015; Huo *et al.*, 2017).

279 A maioria das espécies de moluscos de águas temperadas tem um período
280 reprodutivo restrito, relacionado às variações sazonais de temperatura, ao contrário das
281 espécies de regiões tropicais, que apresentam um período prolongado ao longo do ano
282 (Gireesh & Gopinathan, 2004). Em um estudo sazonal, em locais que o marisco branco é
283 encontrado, Santos *et al.* (2016) relataram flutuações médias de temperaturas de 13 a
284 26°C ao longo do ano. Essa faixa de temperatura está de acordo com o descrito por
285 Herrmann *et al.* (2009), que, ao estudar o ciclo reprodutivo desta espécie na Argentina,
286 registraram duas desovas por ano, uma na primavera e outra no verão (Herrmann *et al.*,
287 2009), o que estaria relacionado principalmente a temperatura.

288 Neste contexto, para Barber & Blacke (2006), a temperatura é o principal
289 regulador da gametogênese em bivalves marinhos, o que torna estas informações cruciais
290 também para compreender o processo de aclimação e condicionamento de reprodutores
291 em laboratório. Contudo, são necessários mais estudos abordando processos de ciclos
292 reprodutivos de *A. mactroides* em toda sua distribuição geográfica, para melhor
293 compreensão dos efeitos dos fatores ambientais em sua fisiologia reprodutiva.

294 Os processos de aclimação e condicionamento dos reprodutores de moluscos
295 bivalves tem como objetivo a conservação ou maturação gonadal para um controle
296 reprodutivo dos animais. Contudo, a resposta a estes processos pode variar, inclusive
297 entre populações da mesma espécie (Avendaño e Le Pennec, 1997). A temperatura da
298 água é o fator ambiental frequentemente mais implicado na regulação da desova e
299 crescimento larval tanto em populações selvagens, quanto as populações mantidas em
300 laboratório (Helm & Bourne, 2004; Gosling, 2015). Desta forma, a manipulação da
301 temperatura da água na etapa de aclimação e condicionamento de reprodutores é uma
302 ferramenta importante para compreensão e ou potencialização da gametogênese de uma
303 espécie desejada, ou seja, processo que poderá dar qualidade aos gametas, aumentando a
304 produção e sobrevivência larval (Argüello-Guevara *et al.*, 2013). A manipulação da
305 temperatura também pode ser uma alternativa viável para obtenção de gametas fora do
306 período que esta produção ocorre naturalmente no ambiente (Gomes *et al.*, 2014).

307 Estudos comprovam a influência da temperatura no desenvolvimento ontogênico
308 e na sobrevivência de bivalves (Doroudi *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2016; Huo *et al.*, 2017).
309 Doroudi *et al.* (1999) e Peng *et al.* (2016) observaram que o aumento da temperatura
310 proporcionou um rápido crescimento larval, porém resultou em maiores mortalidades de
311 *Pinctada margaritifera* (L.) e *Crassostrea iredalei*, respectivamente.

312 Estudando o efeito da temperatura no desenvolvimento larval e reserva de lipídios
313 em *Crassostrea gigas*, Kheder *et al.* (2010) observaram que as de 17, 22, 27 e 32 °C não
314 surtiram efeitos na mortalidade larval, mas afetou diretamente o crescimento e o sucesso
315 de assentamento. Em temperaturas mais baixas, as larvas levaram mais tempo para se
316 desenvolverem e estarem prontas para o assentamento, apesar do maior acúmulo de
317 lipídios. Por outro lado, em altas temperaturas, houve um rápido crescimento, altas taxas
318 de metamorfose e menor acúmulo de lipídios. Resposta semelhante foi observada por
319 Gadomski *et al.* (2015), demonstrando que diferentes temperaturas afetam a velocidade
320 do desenvolvimento embrionário e larval de *Paphies ventricosa*, podendo variar de 22 a

321 31 dias para as larvas estarem prontas ao assentamento. Porém, tais informações são
322 específicas, e devem ser elucidadas para a espécie alvo.

323 Huo *et al.* (2017) relataram que os processos de metamorfose, crescimento larval
324 e sobrevivência de bivalves podem aumentar ou serem acelerados com o acréscimo da
325 temperatura até um certo ponto, todavia, quando esta relação positiva é saturada, pode-se
326 tornar prejudicial.

327 Como regra geral, o aumento da temperatura acelera os processos metabólicos, o
328 que pode afetar a assimilação de alimentos dos bivalves (Bayne & Newell, 1983).
329 Característica que faz da disponibilidade e o tipo de alimento, outro fator chave no ciclo
330 reprodutivo dos bivalves (Widdows, 1991; Gosling, 2015).

331 *Dietas*

332 As microalgas são as principais fontes de alimento para larvas e sementes de
333 bivalves em laboratório (Helm & Bourne, 2004), devido seu valor nutricional de grande
334 importância para o desenvolvimento destas etapas de desenvolvimento (Oliveira *et al.*,
335 2016). Para encontrar as microalgas adequadas para as dietas em sistemas de produção,
336 existem algumas condições a serem consideradas, como: tamanho de célula adequado à
337 fase de vida; a qualidade e composição nutricional; e a facilidade de cultivar estas
338 microalgas em laboratório (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1991). Esta última está associada
339 também a produção de microalgas em laboratório ser uma atividade onerosa e trabalhosa,
340 podendo custar cerca de 30% da produção de sementes de bivalves (Rivero-Rodriguez et
341 al., 2007).

342 Desta forma, estas informações precisam ser bem elucidadas conforme a espécie,
343 pois a escolha da microalga pode variar também com o período de desenvolvimento do
344 animal (necessidades específicas nutricionais em relação ao seu desenvolvimento)
345 (Pettersen *et al.*, 2010). Por exemplo, a concentração de microalgas pode afetar a
346 eficiência de alimentação e, conseqüentemente, o crescimento das larvas de moluscos
347 bivalves (Gallager, 1988), pois alguns bivalves podem selecionar seus alimentos de vários
348 tipos de partículas, ingerindo os de alta qualidade, enquanto rejeita aqueles indesejáveis
349 (processo que gera gasto de energia), como pseudofezes (Ward & Shumway, 2004).

350 Para larvas e sementes de bivalves é essencial a diversificação de microalgas na
351 alimentação, pois estas são compostas por diferentes concentrações de carboidratos, que
352 apresentam funções estruturais e energéticas (White *et al.*, 1989), e de lipídeos, que atuam
353 como componentes de membranas, isolante térmico e reserva de energia (Lourenço,

354 2006) contribuindo para o suprimento das necessidades dos organismos (Utting *et al.*,
355 1997; Ronquillo *et al.*, 2012).

356 Entre os lipídeos, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) são classificados
357 como fundamentais para a maior parte dos animais marinhos (Dustan *et al.*, 1994), pois
358 sua síntese pode ser limitada em bivalves, sendo adquirido principalmente por ingestão
359 de alimentos (Knauer & Southgate, 1999). Desta forma tem uma atenção especial nas
360 dietas.

361 Alguns dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) encontrados nas microalgas
362 são: eicosapentaenóico (EPA), araquidônico (ARA) e docosahexaenóico (DHA)
363 (Ronquillo *et al.*, 2012). No geral, as microalgas flageladas possuem níveis mais elevados
364 de DHA, enquanto as diatomáceas, de EPA (Dustan *et al.*, 1994). De acordo com as
365 concentrações ótimas para espécie e estágio de vida da mesma, o balanceamento e
366 combinação destes nutrientes nas microalgas podem promover um maior crescimento e
367 sobrevivência em laboratório (Helm *et al.*, 2004; Ronquillo *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*,
368 2016).

369 Neste sentido, com o presente estudo propõe-se contribuir com tecnologias que
370 abordam o desenvolvimento embrionário e larval em diferentes condições ambientais
371 (salinidade e temperatura) e diferentes tipos de dietas, no cultivo do marisco branco
372 *Amarilladesma mactroides* em laboratório. Estas informações visam servir de base para
373 o desenvolvimento do pacote tecnológico do cultivo desta espécie, colaborando
374 futuramente para consolidação, tanto da produção comercial quanto para o repovoamento
375 dos estoques naturais.

376 **Objetivos**

377 ***Objetivo geral***

378 Contribuir com a produção e manutenção de formas jovens da espécie
379 *Amarilladesma mactroides* em laboratório.

380 ***Objetivos específicos***

381 **Capítulo 1:** Realizar e descrever a larvicultura da espécie *A. mactroides* em
382 laboratório;

383 **Capítulo 2:** Avaliar o desenvolvimento de embriões e o crescimento e
384 sobrevivência de larvas da espécie *A. mactroides*, em diferentes regimes de salinidades
385 em laboratório;

386 **Capítulo 3:** Avaliar o desenvolvimento de embriões e o crescimento e
387 sobrevivência de larvas da espécie *A. mactroides*, em diferentes regimes de temperaturas
388 em laboratório;

389 **Capítulo 4:** Avaliar o efeito de diferentes dietas na sobrevivência e crescimento
390 de sementes de *A. mactroides*.

391 **Referências**

392 Arana, L.V., 1999. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para
393 formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. Florianópolis: 380
394 UFSC. 310 p.

395 Argüello-Guevara, W., Loor, A., Sonnenholzner, S., 2013. Broodstock
396 conditioning, spawning induction, and early larval development of the tropical rock
397 oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825). J. Shellfish Res., 32(3): 665-670.
398 <http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0306>.

399 Avendaño, M., & Le Pennec, M. (1997). Intraspecific variation in gametogenesis
400 in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus*
401 (Lamarck). Aquacult. Res., 28(3): 175-182. [https://doi.org/10.1046/j.1365-](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00844.x)
402 [2109.1997.00844.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00844.x).

403 Ayerbe, R., Zevallos, S., Castañeda, V., Lope, F., Bendita, H., Sanz, Y., 2017.
404 Manual para el cultivo de la macha *Mesodesma donacium* (LAMARCK, 1818) en la
405 región Moquega. Instituto del Mar del Perú, Callao, 24pp.

406 Barber, B. J., Blake, N. J., 1991. Reproductive physiology. Scallops: biology,
407 ecology and aquaculture, 21: 377-409.

408 Bastida, R.O., Roux, A., Bremec, C., Gerpe, M., Sorensen, M. 1991. Estructura
409 poblacional de la almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*) durante el verano de 1989
410 en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Frente Mari, 9A: 83-92.

411 Bayne, B. L., Newell, R. C., 1983. Physiological energetics of marine molluscs.
412 In The Mollusca, Volume 4 (pp. 407-515).

413 Bergonci, P.E.A., 2005. Aspectos da dinâmica populacional do marisco branco
414 *Amarilladesma mactroides* Deshayé, 1854 (Mollusca Bivalvia) em praias arenosas

415 exposta do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Biociências,
416 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

417 Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-YEomans. 2008. La patología en moluscos
418 bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América
419 Latina. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de
420 moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en
421 América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto
422 Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 327–337.

423 Cain, T. D., 1973. The combined effects of temperature and salinity on embryos
424 and larvae of the clam *Rangia cuneata*. Mar. Biol., 21(1): 1-6. [http://dx.doi.org/
425 10.1007/BF00351185](http://dx.doi.org/10.1007/BF00351185).

426 Calabrese, A., Davis, H. C., 1970. Tolerances and requirements of embryos and
427 larvae of bivalve molluscs. Helgoländer wiss. Meeresunters., 20 (1): 553-564.
428 [http://dx.doi.org/ 10.1007/bf01609928](http://dx.doi.org/10.1007/bf01609928).

429 Calabrese, A., 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature
430 on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). Biol. Bull., 137(3): 417-
431 428. [http://dx.doi.org/ 10.2307/1540164](http://dx.doi.org/10.2307/1540164).

432 Carvalho, Y.B.M., Poersch, L.H., Romano, L.A., 2013a. Rickettsia associated
433 mortality of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) in
434 southern Brazil. Malacologia, 56 (1-2): 301-3017.
435 <http://dx.doi.org/10.4002/040.056.0217>.

436 Carvalho, Y.B.M, Poersch, L.H., Junior, J.P., Romano, L.A., 2013b.
437 Histopathological survey of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* from southern
438 Brazil. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 33(2): 53-58.

439 Carvalho, Y.B., Jethro, J., Poersch, L.H., Romano, L.A., 2015a. India ink induces
440 apoptosis in the yellow clam *Amarilladesma mactroides* (Deshayes, 1854). Optical and
441 ultrastructural study. An. Acad. Bras. Ciênc., 87 (4): 1981-1989.
442 <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140600>.

443 Carvalho, Y.B.M., Romano, L.A., Poersch, L.H.S., 2015b. Effect of low salinity
444 on the yellow clam *Amarilladesma mactroides*. Braz. J. Biol., 75 (1): 8-12.
445 <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.03213>.

446 Carvalho, Y.B., Santos, J.J.S., Raibenberg, F.R., Poersch, L.H., Romano, L.A.,
447 2016. Use of polymerase chain reaction for bivalve pathogen surveillance in the yellow

- 448 clam *Amarilladesma mactroides*. J. Aquat. Anim. Health., 28 (2): 114-117.
449 <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2016.1152324>.
- 450 Casas, S. M., Filgueira, R., Lavaud, R., Comeau, L. A., La Peyre, M. K., La Peyre,
451 J. F., 2018. Combined effects of temperature and salinity on the physiology of two
452 geographically-distant eastern oyster populations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 506: 82-90.
453 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.06.001>.
- 454 Chretiennot-Dinet, M. J., Vaulot, D., Galois, R., Spano, A. M., Robert, R., 1991.
455 Analysis of larval oyster grazing by flow cytometry. J. shellfish res., 10(2): 457-463.
- 456 Coscarón, S. 1959. La almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*, Deshayes) de
457 la costa de la Provincia de Buenos Aires. Agro. Publ. Tec. v. 1, n. 3, p. 1-66.
- 458 Davis, H.C., 1958. Survival and growth of clam and oyster larvae at different
459 salinities. Biol. Bull. 114 (3): 296– 297. <http://dx.doi.org/10.2307/1538986>.
- 460 Defeo, O., Scarabino, V., 1990. Ecological significance of a possible deposit-
461 feeding strategy in *Amarilladesma mactroides* Deshayes, 1854 (Mollusca: Pelecypoda).
462 Atlântica, Rio Grande, v. 12, n. 1, p. 55-65.
- 463 Defeo, O. 2003. Marine invertebrate fisheries in sandy beaches: an overview.
464 Journal of Coastal Research, Issue 35: 56-65. <http://dx.doi:tw/10.2307/40928749>.
- 465 Doroudi, M. S., Southgate, P. C., Mayer, R. J., 1999. The combined effects of
466 temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada*
467 *margaritifera* (L.). Aquacult. Res., 30(4): 271-277. [https://doi.org/10.1046/j.1365-](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00324.x)
468 [2109.1999.00324.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00324.x).
- 469 FAO - Food and Agriculture Organization, 2018. The State of World Fisheries
470 and Aquaculture: Meeting the sustainable development goals. Roma. 227pp.
- 471 FAO - Food and Agriculture Organization, 2016. The State of World Fisheries
472 and Aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- 473 Fang, A., Peng, T. C., Yen, P. K., Yasin, Z., Hwai, A. 2016. Effect of salinity on
474 embryo and larval development of oyster *Crassostrea iredalei*. Trop Life Sci Res., 27(1):
475 23–29. <http://dx.doi.org/10.21315/tlsr2016.27.3.4>.
- 476 Gadamisk, K., Moller, H., Beentjes, M., Lamre, M., 2015. Embryonic and larval
477 development of the New Zealand bivalve *Paphies ventricosa* Gray, 1843 (Veneroida:
478 Mesodesmatidae) at a range of temperatures. J. Mollus. Stud., 81 (3): 356–364.
479 <http://dx.doi:10.1093/mollus/eyv001>.
- 480 Gallager, S. M., 1988. Visual observations of particle manipulation during feeding
481 in larvae of a bivalve mollusc. Bulletin of marine Science, 43(3): 344-365.

- 482 Gianelli, I., Martínez, G., Defeo, O., 2015. An ecosystem approach to small-scale
483 co-managed fisheries: the yellow clam fishery in Uruguay. *Mar. Policy*, 62: 196–202.
484 <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2015.09.025>.
- 485 Gireesh, R., Gopinathan, C. P., 2004. Effect of salinity and pH on the larval
486 development and spat production of *Paphia malabarica*. *J. Mar. Biol. Assoc.*
487 *India*, 46(2): 146-153.
- 488 Gomes, C. H. A. M., Silva, F. C., Lopes, G. R., Melo, C. M. R., 2014. The
489 reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. *Braz. J. Biol.*, 74(4): 967-976.
490 <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.04912>.
- 491 González-Araya, R., Lebrun, L., Quéré, C., Robert, R., 2012. The selection of an
492 ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part B). *Aquaculture*, 362: 55-
493 66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.029>.
- 494 Gosling, E., 2015. Reproduction, settlement and recruitment. In: *Marine bivalve*
495 *molluscs*. John Wiley & Sons. Ltd., Oxford, Chap. 5: 157-202.
- 496 Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves: a
497 practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. N° 471, Rome, FAO.
- 498 Herrmann, M., Alfaya, J. E., Lepore, M. L., Penchaszadeh, P. E., Arntz, W. E.,
499 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam *Amarilladesma*
500 *mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy, temperate beach in northern
501 Argentina. *Helgol Mar Res*, 65(3): 285-297. <http://10.1007/s10152-010-0222-3>.
- 502 Hermann, M., Alfaya, J.E.F., Lepore, M.L., Penchaszadeh, P.E., Laudien, J., 2009.
503 Reproductive cycle and gonad development of the Northern Argentinean *Amarilladesma*
504 *mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Helgol. Mar. Res.*, 63:207–218. [http://](http://10.1007/s10152-009-0150-2)
505 10.1007/s10152-009-0150-2.
- 506 Hooker, S.H., 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand pipi
507 *Paphies australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Bull. Mar. Sci.*, 61(2): 225-240.
- 508 Huo, Z., Wang, Z., Liang, J., Zhang, Y., Shen, J., Yao, Tuo, Su, J., Yu, R., 2014.
509 Effects of salinity on embryonic development, survival, and growth of *Crassostrea*
510 *hongkongensis*. *J. Ocean Univ. China*, 13 (4): 666–670. [https://doi.org/10.1007/s11802-](https://doi.org/10.1007/s11802-014-2206-4)
511 [014-2206-4](https://doi.org/10.1007/s11802-014-2206-4).
- 512 Huo Z. M., Guan H. W., Rbbani M. G., Xiao Y. X., Zhang X. K., Fan C., Yan X. W.,
513 2017. Effects of environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of
514 geoduck clam (*Panopea japonica* A. Adams, 1850) larvae. *Aquaculture reports* 8 (2017):
515 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.001>.

- 516 Kheder, R. B., Moal, J., Robert, R., 2010. Impact of temperature on larval development
517 and evolution of physiological indices in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 309(1-4):286-
518 289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.005>.
- 519 Knauer, J., & Southgate, P. C., 1999. A review of the nutritional requirements of
520 bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve
521 aquaculture. *Rev. Fish. Sci.*, 7(3-4): 241-280.
522 <https://doi.org/10.1080/10641269908951362>.
- 523 Lagreze, F.J.S., 2014. Maturação, larvicultura e depuração do berbigão
524 *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia; Veneridae) em laboratório. Tese de
525 doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- 526 Lopes, T. M., Barcarolli, I. F., De Oliveira, C. B., De Souza, M. M., Bianchini,
527 A., 2011. Mechanisms of copper accumulation in isolated mantle cells of the marine clam
528 *Amarilladesma mactroides*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30 (7): 1586-1592.
529 <https://doi.org/10.1002/etc.527>.
- 530 Lourenço, S. O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e
531 aplicações (Vol. 606). São Carlos: RiMa.
- 532 Mackie, G. L., 1984. Bivalves. *The mollusca*, 7, 351-418.
- 533 Madrones-Ladja, J.A., 2002. Salinity effect on the embryonic development, larval
534 growth and survival at metamorphosis of *Placuna placenta* Linnaeus (1758).
535 *Aquaculture*, 214 (1-4): 411-418. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00401-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5).
- 536 Manoj Nair, R., Appukuttan, K. K., 2003. Effect of temperature on the
537 development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus,
538 1758). *Aquacult. Res.*, 34(12): 1037-1045. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00906.x>.
- 540 Marques, C.G., 2004. Aspectos reprodutivos do berbigão *Tivela mactroides*
541 (Born, 1778) (Bivalvia: Veneridae), na Enseada de Caraguatatuba, São Paulo – Brasil. São
542 João da Boa Vista, SP. 67p.
- 543 McLachlan, A., 2018. Fisheries. In: McLachlan, A., and Defeo, O. *The Ecology*
544 *of Sandy Shores*. Academic Press, Chap. 14: 331-372. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809467-9.00014-X>.
- 546 Nell, J.A., Holliday, J.E., 1988. Effects of salinity on the growth and survival of
547 Sydney Rock Oyster (*Saccostrea commercialis*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)
548 larvae and spat. *Aquaculture* 68 (1): 39 – 44. [https://doi.org/10.1016/0044-486\(88\)90289-](https://doi.org/10.1016/0044-486(88)90289-X)
549 [X](https://doi.org/10.1016/0044-486(88)90289-X).

- 550 Odebrecht, C., Bergesch, M., Rörig, L.R., Abreu, P.C., 2010. Phytoplankton
551 interannual variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-2007), with emphasis on
552 the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis*. Estuar. Coast., 33 (2): 570-583.
553 <https://doi.org/10.1007/S12237-009-9176-6>.
- 554 Oliveira, B.I., Rodrigues, S.N.S., Lavander, H., Lima, P., Olivera-Gálvez, A.,
555 2016. Growth and survival of *Anomalocardia brasiliiana* larvae (Bivalvia: Veneridae) fed
556 with microalgal diets. Lat. Am. J. Aquat. Res, 44(1): 34-38. [http://10.3856/vol44-issue1-
557 fulltext-3](http://10.3856/vol44-issue1-fulltext-3).
- 558 Ortega, L., Castilla, J.C., Espino, M., Yamashiro, C., Defeo, O., 2012. Effects of
559 fishing, market price, and climate on two South American clam species. Mar. Ecol. Prog.
560 Ser., 469: 71–85. <https://doi.org/10.3354/meps10016>.
- 561 Peng, T. C., Vengatesen, T., Hwai, A. T. S. 2016. Assessment of Temperature
562 Effects on Early Larval Development Survival of Hatchery-reared Tropical Oyster,
563 *Crassostrea iredalei*. Trop. Life. Sci. Res., 27(suppl): 111-116.
564 <http://dx.doi.org/10.21315/tlsr2016.27.3.15>.
- 565 Pettersen, A. K., Turchini, G. M., Jahangard, S., Ingram, B. A., Sherman, C. D.,
566 2010. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty
567 acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. Aquaculture, 309(1-
568 4): 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.024>.
- 569 Pronker, A. E., Nevejan, N. M., Peene, F., Geijssen, P., Sorgeloos, P., 2008.
570 Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part
571 I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. Aquacult.
572 Int., 16(4): 297-307. <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9143-9>.
- 573 Redfearn, P., 1982. Larval shell development of the toheroa, *Paphies ventricosa*
574 (Gray 1843) (Mactracea: Mesodesmatidae). New. Zeal. J. Mar. Fresh., 16 (3-4): 241–252.
575 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1982.9515967>.
- 576 Rios, E.C., 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio
577 Grande. 368p.
- 578 Rivero-Rodríguez, S., Beaumont, A. R., Lora-Vilchis, M. C., 2007. The effect of
579 microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of
580 *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. Aquaculture, 263(1-4): 199-210.
581 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.038>.

582 Ronquillo, J. D., Fraser, J., McConkey, A. J., 2012. Effect of mixed microalgal
583 diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*)
584 juveniles. *Aquaculture*, 360: 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.018>.

585 Santos, J.J.S., 2014. Perfil Imunológico do marisco branco *Amarilladesma*
586 *mactroides* (Mesodesmatidae) do litoral sul do Rio Grande do Sul. Dissertação de
587 Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande.

588 Santos, J.J.S., Carvalho, Y.B., Lopes, D.LD.A., Romano, L.A., 2016.
589 Immunological profile of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* (Mesodesmatidae)
590 from the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *J. Aquat. Anim. Health.*, 28 (1): 11-
591 20. <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2015.1116471>.

592 Shumway, S. E., 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and
593 Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine*
594 *Biology*, 41(2): 153-177. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00394023>.

595 Southgate, P. C., Lee, P. S., 1998. Hatchery rearing of the tropical blacklip oyster
596 *Saccostrea echinata* (Quoy and Gaimard). *Aquaculture*, 169(3-4): 275-281.
597 [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00382-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00382-2).

598 Urban, H. J., 2000. Culture potential of the pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from
599 the Caribbean. I. Gametogenic activity, growth, mortality and production of a natural
600 population. *Aquaculture*, 189 (3-4): 361–373. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00394-X)
601 [8486\(00\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00394-X).

602 Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En A.
603 Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos
604 bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América
605 Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt,
606 Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.pp. 61–75.

607 Utting, S. D., Millican, P. F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of
608 bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval
609 viability. *Aquaculture*, 155 (1-4): 45-54. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(97\)00108-](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(97)00108-7)
610 [7](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(97)00108-7).

611 Viet Le, D., Alfaro, A. C., King, N., 2014. Broodstock conditioning of New
612 Zealand geoduck (*Panopea zelandica*) within different temperature and feeding ration
613 regimes. *New. Zeal. J. Mar. Fresh.*, 48(3): 356-370.
614 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.2014.918548>.

615 Ward, J. E., Shumway, S. E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle
616 selection in suspension-and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 300 (1-2),
617 83-130. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002>.

618 Whyte, J. N. C., Bourne, N., Hodgson, C. A., 1989. Influence of algal diets on
619 biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay)
620 larvae. *Aquaculture*, 78(3-4): 333-347. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90110-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90110-5).

621 Widdows, J., 1991. Physiological ecology of mussel larvae. *Aquaculture*, 94 (2-
622 3), 147-163.

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646 **Capítulo 1.**

647

648

649

650

651

652

653

654

655 **Desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco *Amarilladesma***
656 ***mactroides* (Reeve, 1854) (Mesodesmatidae) em laboratório**

657

658

659

660

661 **Manuscrito submetido para: Anais da Academia Brasileira de Ciências**

662

663

664

665 **Observação:** Durante a transcrição para esta tese as figuras e tabelas foram colocadas no
666 corpo do texto para uma melhor compreensão. A normatização deste capítulo seguiu os
667 padrões estabelecidos pela revista submetida.

668

669

670

671

672

673

674

675 **Resumo**

676 O marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) é um molusco da areia com
677 importância histórica e socioeconômica no Brasil, Uruguai e Argentina. Uma forma
678 garantida de acesso e restabelecimento bem sucedido das espécies em seu ambiente
679 natural está diretamente ligada à sua biologia reprodutiva. Desta forma, nosso artigo
680 apresenta o desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco criado em
681 laboratório para tais fins. Selecionou-se espécimes reprodutores de *A. mactroides* com
682 comprimento total médio de concha e peso total de $66 \pm 3,82$ mm e $27,15 \pm 4,07$ g,
683 respectivamente, para posterior indução à desova por meio da técnica de *stripping*. Em
684 relação ao desenvolvimento embrionário, os ovócitos recém fertilizados exibiram um
685 diâmetro médio de $51,20 \pm 6,64$ μ m. O primeiro corpúsculo polar, trocóforas e larva
686 véliger D, surgiram em 20 min, 18 e 24 h após a fertilização, respectivamente. Larvas
687 umbonadas e pediveligers foram observadas no 8º e 25º dia, respectivamente, com
688 metamorfose completa ocorrendo apenas no 27º dia, quando todas as larvas foram retidas
689 em peneiras com malha de nylon de 200 μ m. Portanto, com essa compreensão básica do
690 desenvolvimento embrionário e larval de *A. mactroides* em laboratório, os estudos futuros
691 se concentrarão em estabelecer um pacote tecnológico para essa espécie.

692 **Palavras-chave:** reprodutores; véliger D; *A. mactroides*; pediveligers; molusco de areia;
693 *stripping*;

694

695

696

697

698

699

700

701 **Introdução**

702 A família Mesodesmatidae está representada por moluscos de areia que
703 apresentam importância socioeconômica em diversas regiões do mundo, sendo apontadas
704 como promissoras para aquicultura (Santos et al. 2016), como toheroa (*Paphies*
705 *ventricosa*) (Redfearn 1982; Gadomski et al. 2015) e pipi (*Paphies australis*) (Hooker
706 1997) na Nova Zelândia, La macha (*Mesodesma donacium*) (Uriarte 2008; Ayerbe et al.
707 2017) no Chile e Peru, e o marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) no
708 sul da América do Sul. A espécie *A. mactroides* distribuiu-se do litoral do Rio de Janeiro,
709 Brasil até Buenos Aires, Argentina (Rios 1994), destacando-se pelo seu valor histórico
710 pesqueiro nessas regiões (Coscarón 1959; McLachlan 2018). Extração excessiva e
711 mortalidades massivas reduziram drasticamente suas populações (Carvalho et al., 2013a;
712 Carvalho et al., 2013b; Santos et al., 2016), porém as reais causas destas mortalidades
713 permanecem desconhecidas. Então, diante desta problemática, é importante desenvolver
714 estratégias para gerenciar e aumentar seus estoques naturais (Gianelli et al. 2015).

715 O cultivo do marisco branco em laboratório tem sido considerado uma opção para
716 fomentar programas de repovoamento e atividades da aquicultura, como já ocorreu com
717 *M. donacium* no Peru (Ayerbe et al. 2017). No entanto, ainda não existe o conhecimento
718 sobre o cultivo de *A. mactroides*, como muitas outras espécies nativas tropicais com
719 potencial comercial, embora essa atividade possa ser inegavelmente benéfica, reduzindo
720 a pressão sobre as populações naturais e aumentando a produtividade costeira (Cáceres-
721 Martínez e Vásquez -Yeomans 2008; López et al. 2008).

722 Estudos anteriores sobre prevalência de patógenos, influência antropogênica,
723 sazonalidade (Carvalho et al. 2013a; Carvalho et al. 2013b; Santos et al. 2016), tolerância
724 à salinidade, histopatologia e imunologia (Carvalho et al. 2015a; Carvalho et al. 2015b;
725 Carvalho et al., 2016) foram realizados para compreender o comportamento ambiental de

726 *A. mactroides*. Para cultivar uma nova espécie, é importante entender suas necessidades
727 biológicas e ecológicas e fornecer uma simulação adequada das condições ambientais no
728 laboratório, para subseqüentemente, um melhor desempenho nos sistemas de cultivo
729 (Urban 2000; Madrones-Ladja 2002; Huo et al. 2014).

730 Nesse sentido, pouco se sabe sobre o desenvolvimento embrionário e larval de *A.*
731 *mactroides* em laboratório. Assim, nosso estudo descreve a morfologia e o crescimento
732 durante o desenvolvimento embrionário e larval do molusco amarelo *A. mactroides* em
733 condições de laboratório, contribuindo para o desenvolvimento do pacote tecnológico
734 para esta espécie.

735 **2. Material e Métodos**

736 *2.1. Coleta laboratorial e procedimentos de condicionamento*

737 Cinquenta espécimes adultos de *A. mactroides* foram coletados em abril de 2017
738 (outono), durante a maré baixa na zona de maré da praia de Mar Grosso, no município de
739 São José do Norte, Rio Grande do Sul, Brasil (32°3'10"S 51°59'26"O). Os animais foram
740 armazenados em bacias de contenção de 20 litros em temperatura ambiente e
741 transportados para o Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de
742 Santa Catarina (LMM - UFSC).

743 Os animais foram aclimatados em baldes de 5 litros contendo areia (3 kg) e
744 transferidos para tanques de 40 litros com temperatura de 18 ° C, aeração e fluxo contínuo
745 de água do mar (35 ppt). A dieta dos reprodutores foi uma mistura de microalgas
746 composta por *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* e *Rhodomonas salina* (1: 1: 1)
747 nas concentrações de 15 a 20 x 10⁴ células.mL⁻¹ por dia. O comprimento médio total da
748 concha e o peso dos espécimes de reprodutores selecionados para este experimento foram
749 de 66 ± 3,82 mm e 27,15 ± 4,07 g, respectivamente.

750 *2.2. Indução de desova*

751 No final da terceira semana de condicionamento, tentou-se induções à desova
752 através de três metodologias diferentes: duas induções térmicas, com aumento gradual da
753 temperatura e um choque térmico abrupto, assim como uma indução pela técnica de
754 *stripping*.

755 O método de indução térmica com aumento gradativo de temperatura consistiu na
756 exposição de 40 espécimes de reprodutores em um tanque (200 L) com fluxo contínuo de
757 água e salinidade de 35 ppt a uma temperatura aumentando gradualmente de 18 para 26
758 °C durante 9 horas. O segundo método de indução térmica foi um método de choque que
759 consistiu em expor 40 espécimes de reprodutores aclimatados a 18 °C em um tanque de
760 2.500 L com aeração branda a um aumento abrupto da temperatura (23,5 °C) por 15 horas
761 (overnight). Os tanques continham uma peneira de malha de 18 µm na saída de água para
762 reter os gametas femininos.

763 A desova foi realizada utilizando o método de *stripping*, utilizando oito espécimes
764 de *A. mactroides* avaliados em microscopia óptica para certificar a presença de gametas
765 viáveis (Helm et al. 2004). A proporção de machos e fêmeas usados neste procedimento
766 foi de 1: 1. Antes da fertilização, os ovócitos reunidos foram peneirados e misturados em
767 15 L de água do mar com adição de espermatozoides (1:7).

768 A análise embriogênica e larval teve sucesso após a confirmação da fertilização.
769 Os zigotos obtidos com o método de desova mais eficiente foram selecionados para
770 avaliação morfológica.

771 2.3. Desenvolvimento embrionário

772 Após a fertilização, os embriões foram transferidos para um tanque de 2.500 litros
773 com densidade de 40.000 embriões por litro, com água do mar previamente filtrada e
774 esterilizada por ultravioleta, temperatura de 25 ± 1 ° C, salinidade de 32 ppt e aeração
775 suave. Os embriões foram monitorados através do seu desenvolvimento e análises

776 morfológicas abrangendo todas as fases embrionárias duraram até atingirem a fase de
777 larvas de D-veliger. As amostras foram coletadas em intervalos de 5 minutos na primeira
778 hora após a fertilização, intervalos de 30 minutos por 8 horas e a cada 3 horas até
779 completar 24 horas, usando uma pipeta de 2 mL e observadas sob uma câmara de
780 Sedgewick-Rafter.

781 2.4. Desenvolvimento larval

782 Transferiu-se as larvas veliger-D para um tanque de fundo plano de 4.000 litros,
783 com salinidade de 32 ppt e aeração branda. Todos os dias, a água foi completamente
784 renovada, registrando a temperatura antes e após as trocas de água e peneirou-se as larvas
785 com malhas variando de 35 μm no início, até 200 μm no final do cultivo, sendo coletadas
786 amostras para análises morfométricas. As larvas foram inicialmente alimentadas com
787 1×10^4 células. mL^{-1} de *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* e *Pavlova lutheri*
788 (proporção: 0,30: 0,35: $0,35 \times 10^4$ células. mL^{-1} , respectivamente), aumentando para 2×10^4
789 células. mL^{-1} com a adição de *Chaetoceros muelleri* (proporção: 0,6: 0,7: 0,35: $0,35 \times 10^4$
790 células. mL^{-1} , respectivamente). Quando todas as larvas atingiram o estágio pediveliger e
791 ficaram retidas em peneiras com malhas de 200 μm , considerou-se que estavam prontas
792 para se assentarem e a fase de larvicultura concluída. O crescimento das larvas foi
793 monitorado diariamente medindo-se o comprimento e a altura da concha de 10 a 20
794 espécimes. Após a observação inicial, as amostras foram fixadas em formaldeído
795 tamponado a 4% para posterior análise em microscopia óptica.

796 2.5. Análises morfométricas

797 Médias de crescimento e desvio padrão (\pm DP) (fase embrionária: diâmetro, fase
798 larval: altura e comprimento larval) e morfologia (divisões celulares e desenvolvimento
799 estrutural) foram avaliadas em espécimes vivos e preservados sob um microscópio Carl

800 Zeiss® (Axio Imager A2) e Leica® DM500 (conectado ao software Leica LAZ EZ) para
801 os estágios embrionário e larval, respectivamente.

802 2.6. Estatísticas

803 A altura e o comprimento dos embriões e larvas foram analisados por meio do
804 Modelo Linear Generalizado, após a confirmação da normalidade e homocedasticidade.
805 Análises de regressão foram feitas para evidenciar padrões dos dados em função do
806 tempo. O modelo de regressão foi selecionado com base no fator de determinação (r^2). O
807 crescimento foi calculado em função dos valores da temperatura média acumulada em
808 cada dia experimental para avaliar a influência das mudanças de temperatura ao longo do
809 tempo no desenvolvimento larval (Graus / Dia). As análises foram realizadas utilizando
810 o software GraphPad Prism 6.

811 3. Resultados

812 3.1 Indução de desova

813 Das três técnicas utilizadas para obtenção de embriões, observou-se que tanto a
814 indução térmica com aumento gradual da temperatura quanto a exposição ao choque
815 térmico não tiveram sucesso. No entanto, a técnica de stripping mostrou um resultado
816 positivo para a coleta de gametas contendo uma visível vesícula germinativa, que
817 confirmou a fertilização.

818 3.1 Desenvolvimento embrionário

819 Os diferentes estágios e mudanças morfológicas ao longo do tempo dos embriões
820 de *A. mactroides* (n = 10 espécimes) são mostrados na Tabela 1 e na Figura 1. Os ovócitos
821 recém fertilizados tinham uma forma esférica, com um diâmetro médio de $51,20 \pm 6,64$
822 μm (Fig. 1A). Vinte minutos após a fertilização, o primeiro corpúsculo polar foi formado
823 (Fig. 1B). Nas próximas 3 horas, ocorreram rápidas mudanças, tais como: formação do
824 segundo corpúsculo polar, primeira divisão embrionária, formação do embrião de 2

825 células e divisões iniciais até a fase de múltiplas divisões (Fig. 1C-H). Blástula e gástrula
 826 apareceram em 4 e 5 horas após a fertilização, respectivamente (Fig. 1I-J). Entre 8-10
 827 horas, o desenvolvimento dos primeiros cílios foi perceptível e as células começaram os
 828 movimentos de rotação leve e natação (Fig. 1K). As primeiras larvas trocóforas com
 829 natação ativa emergiram após 18 horas (Fig. 1L), com os cílios crescendo ao longo do
 830 tempo, o que permitiu movimentos mais rápidos em comparação com os estágios iniciais
 831 (Fig. 1M-N). As primeiras larvas veliger-D apareceram às 24 horas (Fig. 1O).

832 **Tabela 1.** Estágios embrionários de *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854)
 833 em função do tempo, cultivados em $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (n = 10).

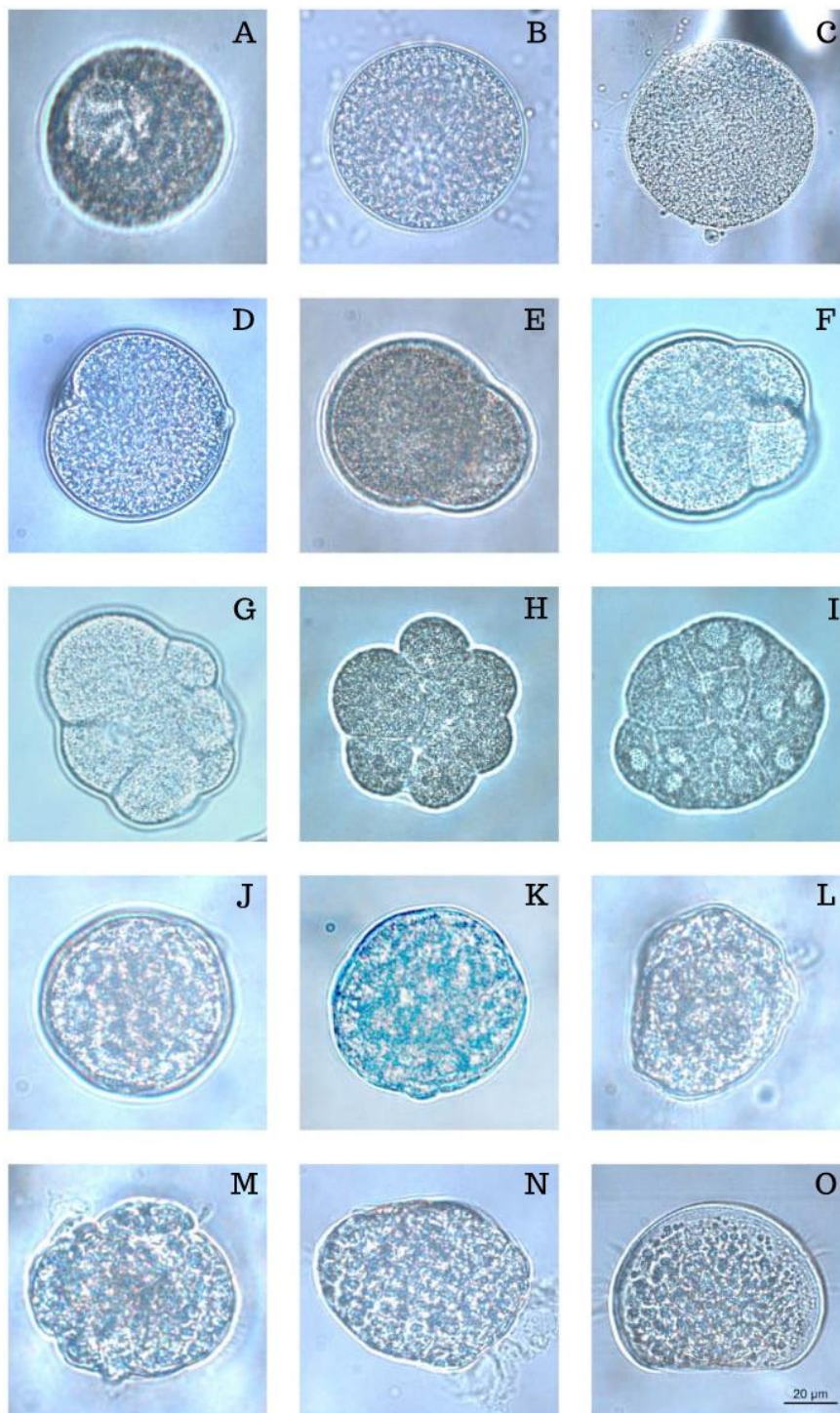
Estágio	Tempo pós fertilização
Ovócito fertilizado	10 min.
Primeiro corpúsculo polar	20 min.
2 - Células	1h 40 min.
4 - Células	2h
8 - Células	2h 20 min.
Estágio Multicelular	3h
Blástula	4h
Gástrula	5h
Trocófora	18h
Larva D	24h

834

835 3.2 Desenvolvimento larval

836 O crescimento larval de *A. mactroides*, incluindo altura e comprimento médio da
 837 concha em função do tempo, é mostrado na Figura 2. A sequência de diferentes estágios
 838 de desenvolvimento larval com o comprimento médio da concha é mostrada na Figura 3.
 839 O estágio D-veliger caracteriza-se pela presença da primeira casca larval dupla
 840 transparente e o surgimento de velum, que auxilia na natação e alimentação. As larvas
 841 possuíam altura média inicial de $62,55 \pm 2,20 \mu\text{m}$ e comprimento de concha de $79,69 \pm$
 842 $3,47 \mu\text{m}$, apresentando uma dobradiça reta e uma forma semicircular ao longo do tempo
 843 como característica da formação do umbo. Essa conformação de conchas em semicírculo
 844 permaneceu até que alcançaram o estágio pediveliger, no qual o umbo tornou-se mais
 845 pronunciado (Fig. 3A-F).

846



847

848 **Figura 1.** Estágios embrionários de desenvolvimento de *Amarilladesma mactroides*: (A)
 849 ovócito; (B) ovócito fertilizado com primeiro corpúsculo polar; (C) segundo corpúsculo
 850 polar; (D) primeira divisão embrionária; (E) embrião de 2 células; (F) divisões iniciais;
 851 (G) múltiplas divisões; (H) múltiplas divisões; (I) blástula; (J) gástrula; (K) primeiro
 852 movimento de cílios e natação; (L) trocófora; (M) trocófora; (N) trocófora; (O) véliger
 853 estágio D.

854

855 As primeiras larvas umbonadas foram observadas no 8° dia, com altura e
856 comprimento médio da concha de $68,86 \pm 6,89 \mu\text{m}$ e $83,07 \pm 3,50 \mu\text{m}$, respectivamente
857 (Fig. 3C). As conchas nesta fase tornaram-se mais arredondadas, são frágeis e
858 transparentes, características específicas da espécie antes da fase adulta. Essas
859 características permitiram observar o desenvolvimento e o movimento de estruturas
860 internas. A formação de arcos branquiais e linhas de crescimento iniciaram-se no 15° dia
861 após a fertilização (Fig. 3E).

862 Ao longo do desenvolvimento larval, o ponto que caracteriza uma larva olhada
863 não foi observado, como um padrão para os moluscos da areia. Portanto, outras
864 características são necessárias para confirmar o assentamento das larvas, como conchas
865 grossas, atividade branquial ativa e aparência do pé. Essas características foram
866 observadas no 25° dia após a fertilização, quando poderiam ser classificadas como
867 pediveliger (Fig. 3F).

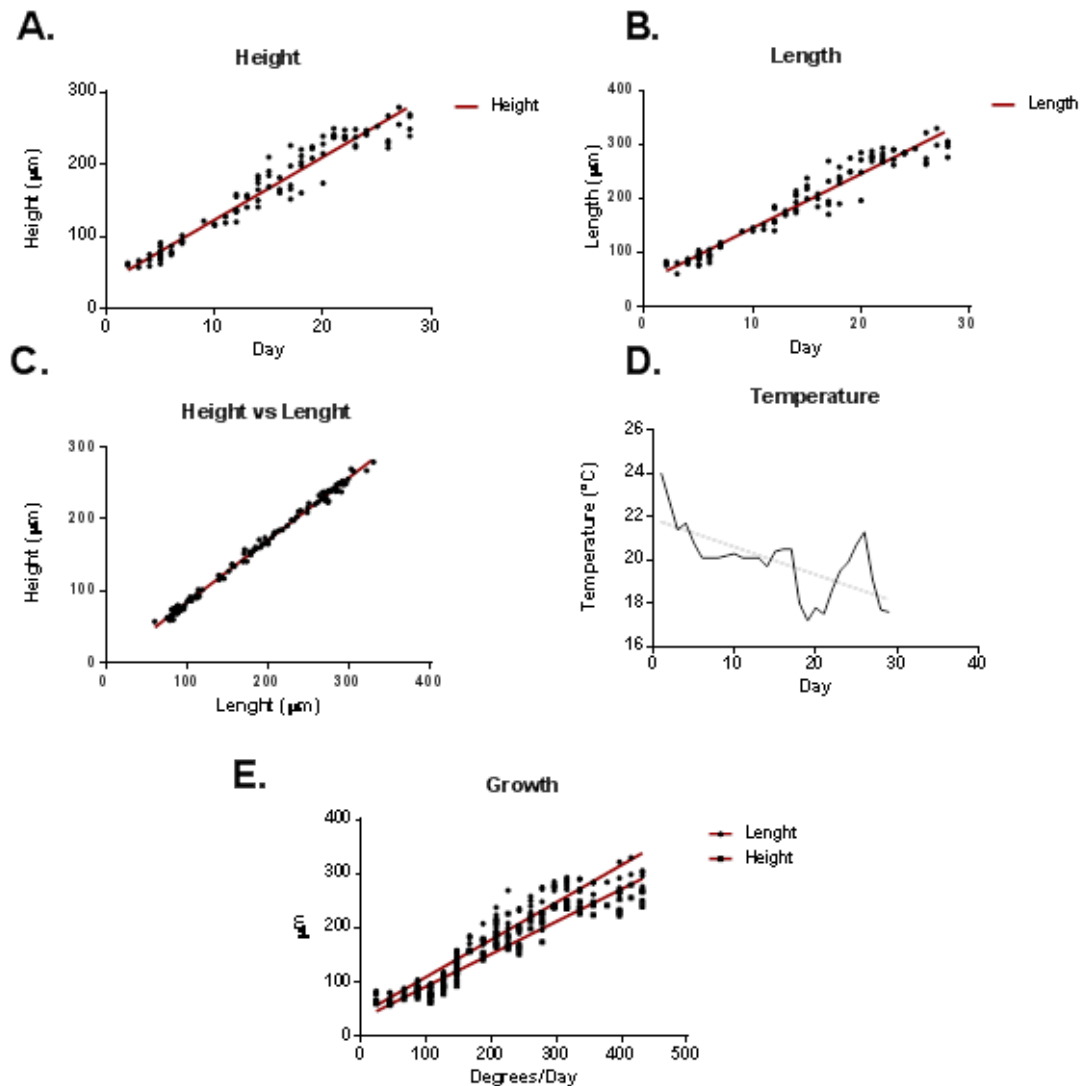
868 No 27° dia, as larvas atingiram uma altura e comprimento médio de concha de
869 $255,94 \pm 14,22 \mu\text{m}$ e $295,14 \pm 13,17 \mu\text{m}$, respectivamente, ficando retidos em peneiras
870 com malha de nylon de $200 \mu\text{m}$. Cada estrutura das conchas neste estágio era visível a
871 olho nu (Fig. 3G). O vélum foi totalmente eliminado e a atividade do pé (tecido muscular
872 denso em forma de seta) foi intensa, demonstrando um comportamento de rastreamento
873 em busca do sedimento, o que caracteriza uma atividade de assentamento.

874 Análises estatísticas demonstraram o desenvolvimento larval positivo através de
875 variáveis biométricas de altura e comprimento em função do tempo (Fig. 2).

876 3.3. *Temperatura*

877 A temperatura de cultivo durante a fase embrionária foi mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$,
878 enquanto a temperatura média durante a larvicultura foi de $20,0 \pm 1,8^\circ\text{C}$, com variações
879 mínimas e máximas de $16,5$ a $24,5^\circ\text{C}$ (Fig. 2D). Houve um desajuste no modelo (r^2)

880 quando os Graus/Dia foram utilizados como preditor de crescimento; portanto, a
 881 temperatura não foi um fator determinante. Mesmo se uma regressão múltipla de mínimos
 882 quadrados foi realizada usando tempo e temperatura como variáveis independentes, a
 883 correlação de ambos os atributos pode não implicar um efeito estatisticamente
 884 significativo no crescimento de concha (Fig. 2E).

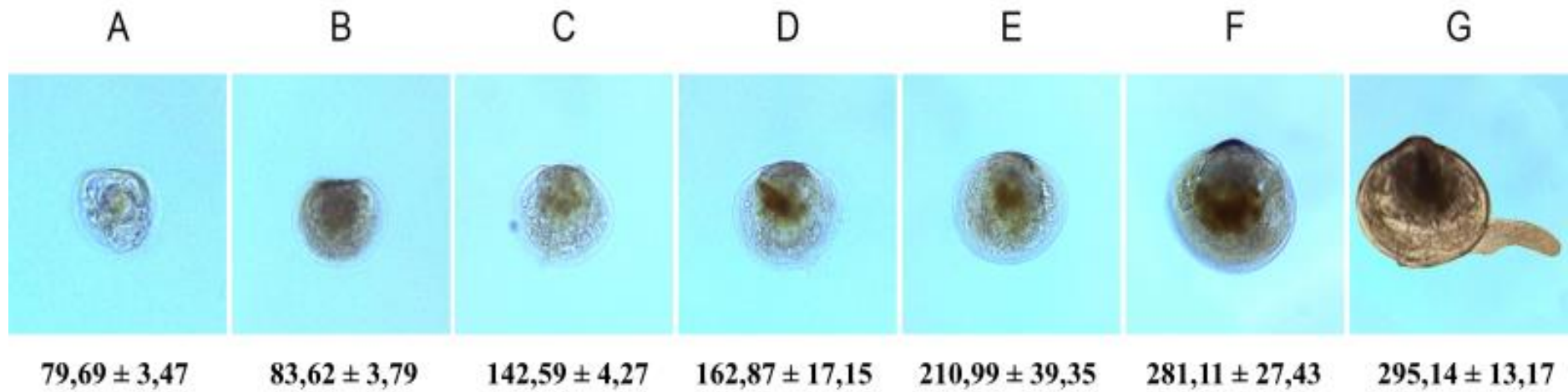


885 **Figura 2.** Dados de crescimento larval da espécie *Amarilladesma mactroides*, regressões
 886 para os dados de crescimento em função do tempo em Graus/Dia. **A.** Altura = $31,05 \pm$
 887 $0,92$; Dia + $12,07 \pm 15,51$; $r^2 = 0,91$; $p < 0,0001$. **B.** Comprimento = $35,78 \pm 1,1$; Dia +
 888 $16,66 \pm 18,0$; $r^2 = 0,91$; $p < 0,0001$. **C.** Altura = $0,86 \pm 0,005$ Comprimento = $1,298 \pm$
 889 $2,96$; $r^2 = 0,99$; $p < 0,0001$. **D.** Médias temperaturas no período experimental. **E.**
 890 Comprimento = $2,5 \pm 0,11$ Graus/Dia + $33,88 \pm 24,66$; $r^2 = 0,83$; $p < 0,0001$, Altura = $2,17$
 891 $\pm 0,09$ Graus/Dia + $27,09 \pm 21,33$; $r^2 = 0,84$; $p < 0,0001$.
 892

893

894

895



896

897 **Figura 3.** Desenvolvimento larval de *Amarilladesma mactroides*, médias (\pm DP) de comprimento de concha (μm), no período de 27 dias. (A)
898 véliger D, 1 dia; (B) véliger D, 2 dias; (C) larvas umbonadas iniciais, 8 dias; (D) larvas umbonadas, 10 dias; (E) larvas umbonadas, 15 dias; (F)
899 pediveliger, 25 dias; e (G) pediveliger, 27 dias.

900 4. Discussão

901 A coleta bem sucedida de gametas maduros durante o estágio gonadal é o fator
902 chave para o controle da desova e da reprodução em laboratório (Reverol et al., 2004).
903 Em um estudo anterior com *A. mactroides* na Argentina, dois eventos de desova
904 ocorreram na primavera e no verão de um ano (Herrmann et al. 2009). O estoque de
905 reprodutores em nosso estudo foi coletado durante o outono e similarmente exibiu
906 condição madura para a reprodução. Esta é uma vantagem para o cultivo de juvenis de
907 marisco branco em laboratório, o que também foi observado por Hooker (1997) com
908 *Paphies australis*. No entanto, ainda faltam informações sobre o que de fato desencadeia
909 a desova em *A. mactroides*.

910 Este é o primeiro estudo sobre o desenvolvimento embrionário e larval de *A.*
911 *mactroides* em laboratório, acrescentando informações essenciais sobre a biologia da
912 família Mesodesmatidae (Gadomski et al. 2015). Coscarón (1959) forneceu uma
913 ilustração parcial sobre o estágio embrionário e espécimes de larvas jovens, obtidas de
914 amostras planctônicas do ambiente, embora a identificação dos espécimes tenha sido
915 incerta. Além disso, a metamorfose para véliger D, nesse caso, não obteve a
916 transformação completa em laboratório. Métodos indiretos utilizados por Coscarón
917 (1959), como a abundância das larvas em amostras planctônicas do ambiente, podem
918 levar a uma identificação incorreta (Hooker 1997), uma vez que a identificação de larvas
919 por amostras de plâncton é precisa somente quando técnicas diretas são utilizadas, por
920 exemplo, com cultivo das larvas em laboratório.

921 Coscarón (1959) observou que o tamanho dos ovócitos maduros variava de 50 a
922 55 μm , semelhante aos nossos resultados com *A. mactroides* (diâmetro médio \pm DP de
923 $51,20 \pm 6,64$; Fig. 1A), menor que outras espécies da família Mesodesmatidae, que
924 possuem diâmetro variando de 60 a 73 μm (Gadomski et al. 2015). Além disso,

925 informações relativas à cronologia dos acontecimentos após a fertilização, por exemplo,
926 conhecimento sobre o tempo de liberação do primeiro corpúsculo polar (Tabela 1, Figura
927 1B), pode ser a base para futuros estudos com o marisco branco, incluindo pesquisas
928 relacionadas à indução a triploidia. Observamos também a ocorrência de metamorfose no
929 estágio veliger D em 24 horas, semelhante ao desenvolvimento embrionário de outras
930 espécies da família Mesodesmatidae, variando de 22 a 45 horas, conforme descrito na
931 Tabela 2.

932 O período de desenvolvimento larval varia de 17 a 31 dias entre espécies da
933 família Mesodesmatidae, e em nosso estudo durou 27 dias, conforme observado na Tabela
934 2. Morfologicamente, o desenvolvimento larval de *A. mactroides* (Fig. 3) foi semelhante
935 a descrição larval de *P. ventricosa* (Gadomski et al. 2015) e *M. donacium* (Ayerbe et al.
936 2017). Isto leva à crença de que tais características são representativas desta família, por
937 exemplo, as modificações de larvas véliger D em larvas umbonadas, com formato
938 arredondado e vélum ativo, assim como o desenvolvimento de larvas pediveliger, com
939 perda do vélum e presença de um pé inicialmente retraído, que posteriormente torna-se
940 mais ativo e funcional em decorrer do tempo. No entanto, o tamanho da altura total e
941 comprimento total das conchas mudaram ao longo do tempo entre *P. ventricosa*
942 (Redfearn, 1982; Gadomski et al., 2015), *P. subtriangulata* (Redfearn, 1987) e *P.*
943 *australis* (Hooker, 1997) em diferentes estágios de desenvolvimento, conforme descrito
944 na Tabela 2.

945 O comprimento final de concha das larvas pediveligers de *A. mactroides* (295,14
946 μm) foi semelhante ao de *P. ventricosa* (270-300 μm) (Redfearn 1982) e maior que as
947 larvas de *P. subtriangulata* (230-260 μm) (Redfearn 1987) e *P. australis* (264,70 μm)
948 (Hooker 1997) (Tabela 2).

949

950 **Tabela 2.** Etapas do desenvolvimento embrionário e larval em *Amarilladesma mactroides*, *Paphies ventricosa*, *Paphies subtriangulata*, *Paphies*
 951 *australis* e *Mesodesma donacium*, com tempos cronometrados (minutos, horas e dias pós fertilização) e medidas médias de altura e comprimento
 952 (μm) em cada estágio.

	<i>A. mactroides</i>			<i>P. ventricosa</i>			<i>P. subtriangulata</i>			<i>P. australis</i>			<i>M. donacium</i>		
T°C	20 \pm 1,8			12 - 25			20			22 \pm 1			18 \pm 1		
	Time	Height	Length	Time	Height	Length	Time	Height	Length	Time	Height	Length	Time	Height	Length
Fertilized oocyte	10min	-----	51,20	-----	-----	67	-----	-----	56-61	-----	-----	56,30	5min	-----	50
Trochophore	18h	-----	57,86	15h	-----	83-102	-----	-----	-----	-----	-----	56,81	23h	-----	-----
D-stage	24h	62,55	79,69	22-37h	126	109-149	24-48h	67-117	88-143	24-36h	79,27	96,94	40-45h	-----	70
Umbonate	8d	68,86	83,07	12-21d	84-282	109-320		97-223	125-265	6d	116,97	134,51	8d	-----	-----
Pediveliger	27d	255,94	295,14	22-31d	-----	270-300	17-18d	-----	230-260	18-22d	219,04	264,70	23d	-----	-----
Authors	This study			(Redfearn,1982); (Gadomski <i>et al.</i> , 2015)			(Redfearn, 1987)			(Hooker, 1997)			(Carstensen <i>et al.</i> ,2006); (Ayerbe <i>et al.</i> , 2017)		

953

954 Médias de temperaturas (\pm DP) referentes apenas a etapa de larvicultura das espécies. Ausência de informações representadas em linhas

955 pontilhadas.

956

957 A semelhança entre *A. mactroides* e *P. ventricosa* também foi observada no
958 desenvolvimento mais lento de transformação para pedivéliger (27d e 22-31d
959 respectivamente) em comparação com outros representantes desta família (Tabela 2).
960 Gadomski et al. (2015) demonstraram que diferentes temperaturas afetavam diretamente
961 a taxa de desenvolvimento embrionário e larval de *P. ventricosa*, com o período de
962 assentamento variando entre 22 e 31 dias. Esses autores relataram que a taxa de
963 desenvolvimento larval depende de inúmeras variáveis além da temperatura, onde as
964 diferenças filogenéticas também podem contribuir para taxas de desenvolvimento lentas
965 ou moderadas, possivelmente atribuindo essas características aos representantes da
966 família Mesodesmatidae. As espécies da família Mesodesmatidae geralmente completam
967 seu desenvolvimento larval em duas a três semanas, como *P. subtriangulata* (17-18d), *P.*
968 *australis* (18-22d); e *M. donacium* (23 d) de acordo com a Tabela 2.

969 Como mencionado anteriormente, a temperatura é um fator determinante para o
970 tempo de desenvolvimento larval em moluscos bivalves (Huo et al. 2017). No presente
971 estudo, a larvicultura foi realizada em temperatura ambiente e não foi possível avaliar em
972 até que ponto essa variável foi decisiva ao final do experimento (fig. 2), que teve duração
973 de 27 dias com larvas vivas, metamorfoseadas em pediveliger e prontas para
974 assentamento. Um estudo preliminar descritivo do desenvolvimento embrionário e larval
975 de *Mesodesma donacium*, com temperatura controlada a 17 ° C, durou 28 dias com 100%
976 de mortalidade (Carstensen et al. 2006).

977 A salinidade é outro fator limitante para o desenvolvimento embrionário e larval
978 de bivalves (Madrones-Ladja 2002) e flutuações entre 14 e 38 ppt afetam os ambientes
979 em que o marisco branco habita (Odebrecht et al. 2010). Embora os juvenis e adultos
980 desta espécie sejam considerados eurihalinos, tolerando salinidades variando de 15 a 35
981 ppt (Carvalho et al. 2015b), é incerto se isso poderia ser aplicado com o desenvolvimento

982 embrionário e larval em laboratório. Além disso, informações de salinidade não foram
983 mencionadas em estudos com outras espécies da família Mesodesmatidae. Nesse sentido,
984 utilizamos uma salinidade de 32 ppt, próxima aos valores médios encontrados por Santos
985 et al. (2016) em análises específicas e sazonais em locais de ocorrência do marisco
986 branco, salinidade esta que permaneceu adequada até o final do experimento.

987 Estes resultados fornecem uma compreensão do desenvolvimento embrionário e
988 larval desta espécie, servindo de base para pesquisas futuras, por exemplo, efeito da
989 salinidade e temperatura na sobrevivência e produção de embriões e larvas, bem como
990 estudos relacionados a dietas, a fim de estabelecer um pacote tecnológico completo para
991 esta espécie.

992 **5. Conclusão**

993 Este experimento mostrou que a desova usando o método de *stripping* é eficiente
994 para a obtenção de gametas viáveis. Assim como, as distintas fases de desenvolvimento
995 embrionário e larval presentes neste estudo demonstraram padrão similar às espécies da
996 família Mesodesmatidae. Sendo assim, estes resultados asseguram a viabilidade na
997 produção de juvenis de *A. mactroides* após o período de 27 dias de criação de larvas em
998 condições específicas de temperatura e salinidade.

999 **Agradecimentos**

1000 Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
1001 Nível Superior) pelo apoio financeiro. L.A. Romano é um pesquisador do CNPq
1002 brasileiro (301245 / 2016-9).

1003 **Referências**

1004 AYERBE R, ZEVALLOS S, CASTAÑEDA V, LOPE F, BENDITA H AND SANZ Y.
1005 2017. Manual para el cultivo de la macha *Mesodesma donacium* (LAMARCK,
1006 1818) en la región Moquega. Instituto del Mar del Perú, Callao, 24p.

- 1007 CÁCERES-MARTÍNEZ J AND VÁSQUEZ-YEOMANS R. 2008. La patología en
1008 moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de
1009 bivalvos en América Latina. In: Lovatelli, A., Farías, A., Uriarte, I. (eds.). Estado
1010 actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores
1011 que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la
1012 FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y
1013 Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. p. 327–337.
- 1014 CARSTENSEN D, OLIVA M, SIELFELD W AND LAUDIEN J. 2006. Larval
1015 development of *Mesodesma donacium* (Macha). XXVI Congreso de Ciencias del
1016 Mar, Iquique, Chile.
- 1017 CARVALHO YBM, POERSCH, LH AND ROMANO LA. 2013a. Rickettsia associated
1018 mortality of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia:
1019 Mesodesmatidae) in southern Brazil. *Malacologia* 56 (1-2): 301-3017.
1020 <http://dx.doi.org/10.4002/040.056.0217>.
- 1021 CARVALHO YBM, POERSCH LH, JUNIOR JP AND ROMANO LA. 2013b.
1022 Histopathological survey of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* from
1023 southern Brazil. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 33(2): 53-58.
- 1024 CARVALHO YB, JETHRO J, POERSCH LH AND ROMANO LA. 2015a. India ink
1025 induces apoptosis in the yellow clam *Amarilladesma mactroides* (Deshayes,
1026 1854). Optical and ultrastructural study. *An Acad Bras Ciênc* 87 (4): 1981-1989.
1027 <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140600>.
- 1028 CARVALHO YBM, ROMANO LA AND POERSCH LHS. 2015b. Effect of low salinity
1029 on the yellow clam *Amarilladesma mactroides*. *Braz J Biol* 75 (1): 8-12.
1030 <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.03213>.

- 1031 CARVALHO YB, SANTOS JJS, RAIBENBERG FR, POERSCH, LH AND ROMANO
1032 LA. 2016. Use of polymerase chain reaction for bivalve pathogen surveillance in
1033 the yellow clam *Amarilladesma mactroides*. J Aquat Anim Health 28 (2): 114-
1034 117. <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2016.1152324>.
- 1035 COSCARÓN S. 1959. La almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*, Deshayes) de la
1036 costa de la Provincia de Buenos Aires. Agro Publ Tec 1(3):1-66.
- 1037 GADOMISK K, MOLLER H, BEENTJES M AND LAMRE M. 2015. Embryonic and
1038 larval development of the New Zealand bivalve *Paphies ventricosa* Gray, 1843
1039 (Veneroidea: Mesodesmatidae) at a range of temperatures. J Mollus Stud 81 (3):
1040 356–364. <http://dx.doi:10.1093/mollus/eyv001>.
- 1041 GIANELLI I, MARTÍNEZ G AND DEFEO O. 2015. An ecosystem approach to small-
1042 scale co-managed fisheries:the yellow clam fishery in Uruguay. Mar Policy 62:
1043 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2015.09.025>.
- 1044 HELM MM, BOURNE N AND LOVATELLI A. 2004. Hatchery culture of bivalves: a
1045 practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. N° 471, Rome, FAO.
- 1046 HERRMANN M, LEPORE LM, PENCHASZADEH EP AND LAUDIEN J. 2009.
1047 Reproductive cycle and gonad development of the Northern Argentinean
1048 *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). Helgol Mar Res 63: 207-
1049 218. <http://dx.doi.org/10.1007/s10152-009-0150-2>.
- 1050 HOOKER SH. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand pipi *Paphies*
1051 *australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). Bull Mar Sci 61(2): 225-240.
- 1052 HUO Z, WANG Z, LIANG J, ZHANG Y, SHEN J, YAO T, SU J AND YU R. 2014.
1053 Effects of salinity on embryonic development, survival, and growth of
1054 *Crassostrea hongkongensis*. J Ocean Univ China 13 (4): 666–670.
1055 <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2206-4>.

- 1056 HUO ZM, GUAN HW, RBBANI MG, XIAO YX, ZHANG XK, FAN C AND YAN XW.
1057 2017. Effects of environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of
1058 geoduck clam (*Panopea japonica* A. Adams, 1850) larvae. Aquaculture reports
1059 (8): 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.001>.
- 1060 LÓPEZ DA, LOPEZ BA AND GONZALEZ ML. 2008. Shellfish culture in Chile. Int J
1061 Environ Pollut 33 (4): 401–431. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2008.02057>.
- 1062 MADRONES-LADJA, JA. 2002. Salinity effect on the embryonic development, larval
1063 growth and survival at metamorphosis of *Placuna placenta* Linnaeus (1758).
1064 Aquaculture 214 (1-4): 411-418. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00401-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5)
1065 [5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5).
- 1066 MCLACHLAN A. 2018. Fisheries. In: McLachlan, A., and Defeo, O. The Ecology of
1067 Sandy Shores. Academic Press 14: 331-372. [http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809467-9.00014-X)
1068 [12-809467-9.00014-X](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809467-9.00014-X).
- 1069 ODEBRECHT C, BERGESCH M, RÖRIG LR AND ABREU, PC. 2010. Phytoplankton
1070 interannual variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-2007), with
1071 emphasis on the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis*. Estuar Coast 33 (2):
1072 570-583. <https://doi.org/10.1007/S12237-009-9176-6>.
- 1073 REDFEARN P. 1982. Larval shell development of the toheroa, *Paphies ventricosa* (Gray
1074 1843) (Mactracea: Mesodesmatidae). New Zeal J Mar Fresh 16 (3-4): 241–252.
1075 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1982.9515967>.
- 1076 REDFEARN P. 1987. Larval shell development of the northern tuatua, *Paphies*
1077 *subtriangulata* (Bivalvia, Mesodesmatidae). New Zeal J Mar Fresh 21(1): 65-70,
1078 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1987.9516201>.

- 1079 REVEROL YM, DELGADO JG, DE SEVEREYN YG AND SEVEREYN HJ. 2004.
1080 Embrionary and larval development of the marine clam *Tivela mactroides*
1081 (Bivalvia: Veneridae) in Zulia State, Venezuela. Rev Biol Trop 52(4): 903-909.
- 1082 RIOS EC. 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio Grande.
1083 368p.
- 1084 SANTOS JJS, CARVALHO YB, LOPES DLDA AND ROMANO LA. 2016.
1085 Immunological profile of the yellow clam *Amarilladesma mactroides*
1086 (Mesodesmatidae) from the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. J Aquat
1087 Anim Health 28 (1): 11-20. <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2015.1116471>.
- 1088 URBAN HJ. 2000. Culture potential of the pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from the
1089 Caribbean. I. Gametogenic activity, growth, mortality and production of a natural
1090 population. Aquaculture 189 (3-4): 361–373. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00394-X)
1091 [8486\(00\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00394-X).
- 1092 URIARTE I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. In: Lovatelli,
1093 A., Farías, A., Uriarte, I. (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos
1094 bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en
1095 América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007,
1096 Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.p.
1097 61–75.
- 1098
- 1099
- 1100
- 1101
- 1102

1103 **Capítulo 2.**

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112 **Efeito da salinidade no desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco**

1113 *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) em laboratório

1114

1115

1116

1117

1118 **Manuscrito submetido para: Anais da Academia Brasileira de Ciências**

1119

1120

1121 **Observação:** Durante a transcrição para esta tese as figuras e tabelas foram colocadas no
1122 corpo do texto para uma melhor compreensão. A normatização deste capítulo seguiu os
1123 padrões estabelecidos pela revista submetida.

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131

1132 Resumo

1133 Neste estudo foi avaliado o efeito da salinidade no desenvolvimento embrionário,
1134 crescimento larval e sobrevivência do marisco branco *Amarilladesma mactroides*, em
1135 laboratório. Os embriões e larvas de *A. mactroides* foram submetidos e mantidos a quatro
1136 salinidades diferentes: 20, 25, 30 e 35 ppt, para determinar as condições ótimas para a
1137 espécie. Através de análise descritiva, os resultados demonstraram que os embriões
1138 toleram salinidades entre 25 - 35 ppt, com rápidas metamorfoses nas salinidades 30 e 35
1139 ppt, no período experimental de 27 horas. O mesmo padrão de tolerância foi observado
1140 na etapa larval (25 - 35 ppt), apresentando melhor desenvolvimento na salinidade de 35
1141 ppt. Este resultado é constatado nas análises biométricas de altura e comprimento de
1142 conchas e taxa de sobrevivência, com maiores médias nos tratamentos com salinidade 35
1143 ppt. O período experimental desta etapa durou 27 dias, quando as larvas estavam aptas
1144 para assentar. Estes resultados indicam que embriões e larvas de *A. mactroides* toleram
1145 salinidades entre (25 - 35 ppt), com o melhor crescimento e sobrevivência em salinidades
1146 elevadas, sendo estas recomendadas para melhores rendimentos da produção desta
1147 espécie em laboratório.

1148 **Palavras-chave:** desenvolvimento embrionário; crescimento; *A. mactroides*; salinidade;
1149 sobrevivência

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157 **1. Introdução**

1158 O molusco de areia *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854), também conhecido
1159 como marisco branco, é um dos principais componentes das comunidades intertidais de
1160 praias arenosas dissipativas ao longo da costa Sudoeste do oceano Atlântico (Fiori et al.
1161 2004). Há relatos de distribuição desta espécie do Rio de Janeiro, Brasil, até o sul de
1162 Buenos Aires, Argentina (Rios, 1994). Este animal é comercialmente explorado
1163 (Herrmann et al., 2011), possuindo um valor histórico como recurso pesqueiro (Coscarón,
1164 1959), para alimentação humana e isca de pesca (Bastida et al., 1991). Além disso, tem
1165 sido considerada uma espécie promissora na aquicultura devido às suas características e
1166 importância socioeconômica (Santos et al., 2016).

1167 Nas últimas décadas, surtos de mortalidades vêm acometendo os estoques naturais
1168 do marisco branco ao longo da sua distribuição geográfica (Ortega et al., 2012), o que
1169 tem motivado pesquisas que visam compreender estes fenômenos. Estudos que avaliam
1170 a prevalência de patógenos (Carvalho et al., 2013), os efeitos da ação antrópica (Santos
1171 et al., 2016) e da variabilidade climática (Manta et al., 2017) já foram realizados, embora
1172 a real causa permaneça indefinida.

1173 Com o objetivo de aliviar a pressão e aumentar as populações naturais de *A.*
1174 *mactroides*, programas de gestão e estratégias para o aprimoramento dos estoques estão
1175 sendo realizados (Gianelli, et al., 2015), bem como o estabelecimento de técnicas
1176 referentes ao desenvolvimento embrionário e larval desta espécie sob condições
1177 controladas em laboratório (Santos et al., dados não publicados).

1178 Para o desenvolvimento da malacocultura de uma nova espécie é importante o
1179 conhecimento dos requerimentos biológicos e ecológicos (Madrones - Ladja, 2002; Huo
1180 et al., 2014). A salinidade é um fator determinante nas atividades biológicas de bivalves,
1181 afetando diretamente o desenvolvimento embrionário e larval (Madrones - Ladja, 2002;

1182 Huo et al., 2014; Fang et al., 2016), e é um importante critério na seleção de áreas para o
1183 crescimento (Madrones - Ladja, 2002).

1184 Flutuações de salinidades são comuns em algumas regiões em que o marisco
1185 branco ocorre (Odebrecht et al. 2010; Santos et al., 2016), e isto pode influenciar tanto no
1186 desenvolvimento quanto no êxito reprodutivo, uma vez que não existem informações
1187 sobre o efeito da salinidade no desenvolvimento embrionário e larval desta espécie.
1188 Mesmo as fases juvenis e adultas sendo classificadas como eurihalina moderada
1189 (Carvalho et al., 2015).

1190 Desta forma, estudos de tolerância ambiental em laboratório são essenciais,
1191 principalmente para os estágios de vida mais complexos de uma espécie (Fang et al.,
1192 2016), considerando como principal referência as taxas de crescimentos apresentadas
1193 para cada salinidade observada (Nell & Holliday, 1988). Estas informações podem definir
1194 condições ótimas para a sobrevivência e crescimento da espécie (Tan & Wong, 1996) e
1195 contribuir com informações para o reabastecimento de estoques e melhora na qualidade
1196 da produção de sementes (Tan & Wong, 1996; Fang et al., 2016).

1197 Sendo assim, com o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito da salinidade
1198 no desenvolvimento embrionário, crescimento larval e na sobrevivência do marisco
1199 branco, *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) em laboratório.

1200 **2. Material e Métodos**

1201 Espécimes adultos de *A. mactroides* (N=50) foram coletados em abril de 2017 no
1202 Rio Grande do Sul, Brasil (2°3'10"S 51°59'26"O), armazenados em caixas térmicas (sem
1203 água e areia) em temperatura ambiente, e conduzidos ao Laboratório de Moluscos
1204 Marinhos, da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (LMM – UFSC), onde
1205 foram realizados os experimentos deste trabalho.

1206 **2.1 Procedimentos laboratoriais e desova**

1207 Após a aclimação em laboratório com a mesma salinidade do ambiente (35 ppt),
1208 10 espécimes de marisco branco com comprimento médio total de concha de 6,5 cm ±
1209 4,43 e peso médio total de 22,68g ± 4,87, foram aleatoriamente selecionados (proporção
1210 de 1:1, machos e fêmeas) para indução à desova pela técnica de “strip” (Helm et al.,
1211 2004). Os gametas femininos (estimado em 11×10^6 ovócitos) e masculinos foram
1212 lavados, peneirados e misturados em água salgada (35 ppt) filtrada e esterilizada com UV,
1213 até os ovos fecundados desenvolverem-se em embriões (Melo et al., 2015).

1214 ***2.2 Desenho experimental***

1215 Uma parte dos embriões foram peneirados em malha de 18 µm e aleatoriamente
1216 submetido a quatro tratamentos com as salinidades de 20, 25, 30 e 35 ppt, referentes ao
1217 experimento de desenvolvimento embrionário. O restante dos embriões foi transferido
1218 para um tanque de 2.500 litros com água do mar (35 ppt) e temperatura de $23,4 \pm 1$ °C,
1219 eles foram mantidos nestas condições até desenvolverem-se em larvas “D”. Após o
1220 desenvolvimento, as larvas “D” foram utilizadas para o experimento de crescimento
1221 larval e sobrevivência, expondo-as, assim como os embriões, a tratamentos com as
1222 salinidades de 20, 25, 30 e 35 ppt. As salinidades testadas foram preparadas a partir da
1223 adição de água doce, sem cloro, na água do mar, até alcançar os valores desejados, e a
1224 determinação deste parâmetro foi realizada com o auxílio de um refratômetro.

1225 ***2.3 Experimento de desenvolvimento embrionário***

1226 Após a desova (*item 2.1*), os embriões foram distribuídos imediatamente de
1227 maneira aleatória nos baldes de 20 L (contendo 15 litros de água salgada e aeração
1228 branda), correspondentes aos tratamentos de diferentes salinidades (20, 25, 30 e 35 ppt)
1229 com quatro repetições para cada tratamento.

1230 Para coleta das amostras, primeiramente homogeneizou-se a água dos baldes, e
1231 em seguida retirou-se amostras com auxílio de pipetas de 2 mL para análises das

1232 modificações de 10 células (aleatórias) por repetições de cada tratamento. Na primeira
1233 hora, amostras foram realizadas e analisadas (em tempo real) continuamente (5 em 5
1234 minutos), por conta das rápidas divisões celulares que ocorrem no início da fase
1235 embrionária; 30 minutos até as primeiras 8h e posteriormente a cada 3 horas (com
1236 divisões e metamorfoses celular mais brandas) até completar 27 h, quando o primeiro
1237 tratamento apresentou todas as larvas metamorfoseadas em larvas D.

1238 O experimento finalizou quando o primeiro tratamento obteve a metamorfose
1239 completa dos embriões para larva D. Neste período analisou-se a temperatura
1240 apresentando médias de $21,0 \pm 0,9$ °C, o tempo das transformações e a qualidade dos
1241 embriões com auxílio de microscópio de luz e câmaras de Sedgewick-Rafter. Os critérios
1242 para avaliação da qualidade e padrões morfológicos dos embriões e larvas (nas duas
1243 etapas experimentais), baseou-se em estudos de Gadamisk et al. (2015) e Ayerbe et al.
1244 (2017), com representantes da família Mesodesmatidae.

1245 ***2.4 Experimento de crescimento larval e sobrevivência***

1246 Coletou-se as larvas D do tanque de 2.500 L após 24 horas do procedimento de
1247 desova. Em seguida as mesmas foram peneiradas em malhas de 35 µm, calculando a
1248 densidade (de $5,9 \times 10^6$ larvas) e distribuindo-as, aleatoriamente (6 larvas por mL para 15
1249 L), nos tratamentos iguais aos descritos no desenvolvimento embrionário (baldes de 20 L
1250 com quatro diferentes salinidades e quatro repetições). Foi realizada a renovação diária
1251 da água (100 %) com as respectivas salinidades dos tratamentos, acompanhada com
1252 medições da temperatura antes e depois dos manejos (médias de $19,4 \pm 1,4$ °C) durante o
1253 período experimental.

1254 ***2.4.1 Manejo e alimentação***

1255 Para o manejo das larvas contidas nos baldes contou-se com auxílio de peneiras
1256 de malhas: 35, 100 e 240 µm. Este processo de peneiramento facilitou tanto a limpeza

1257 dos tratamentos, ocasionada pelo acúmulo de microalgas, quanto à coleta das amostras
1258 para observação do crescimento larval e sobrevivência, realizada de 3 em 3 dias até o
1259 final do experimento. Estas coletas consistiram em acumular as larvas na peneira de
1260 malha de 35 μm , desta forma com uma pipeta de 2 mL retirou-se amostras
1261 significativamente concentradas e aleatórias de cada tratamento, para análises de todo
1262 material biológico deste volume. Após esta etapa, realizou-se análises qualitativas
1263 (morfologia) e quantitativas (porcentagens de sobrevivência e crescimento das larvas nos
1264 diferentes tratamentos e repetições) medindo e registrando imagens usando o Software
1265 LAS EZ, com auxílio de microscópio de luz. Efetuou-se alimentação diária com mix algal
1266 composto por *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* e *Pavlova lutheri* na
1267 concentração inicial de 2×10^4 cells.mL⁻¹ (proporção: 0,67:0,67:0,66x10⁴ cells.mL⁻¹,
1268 respectivamente), aumentando tal concentração para 3×10^4 cells.mL⁻¹, a partir do 7º dia
1269 de larvicultura (proporção de: 1:1:1x 10⁴ cells.mL⁻¹) em decorrer do experimento.

1270 **2.6 Análise Estatística**

1271 Foram feitas regressões lineares do crescimento larval de *A. mactroides* expostos
1272 a diferentes salinidades, e posteriormente comparou-se as inclinações destas,
1273 determinando as diferenças significativas no desenvolvimento das variáveis biométricas
1274 de altura e comprimento dos animais. Realizou-se, também, um ajuste do crescimento
1275 dos mariscos na salinidade de 35 ppt ao modelo de Von Bertalanffy, com a finalidade de
1276 descrever o desenvolvimento da espécie mediante uma curva assintótica biologicamente
1277 mais representativa. Por fim, para determinar diferenças na sobrevivência, foi feita uma
1278 ANOVA de medidas repetidas no tempo (após determinar o tempo como fator de
1279 variação) e uma análise post hoc de Tukey a fim de estabelecer as diferenças entre os
1280 tratamentos.

1281 Para as análises estatísticas de altura e comprimento, foram testados os
 1282 pressupostos de homocedasticidade dos dados e normalidade dos resíduos gerados antes
 1283 da aplicação de testes paramétricos. Considerando uma probabilidade menor a 0,05 como
 1284 estatisticamente significativa.

1285 3. Resultados

1286 3.1 Desenvolvimento Embrionário

1287 Através de análises descritivas, em função do tempo, observou-se as
 1288 metamorfoses dos embriões de *A. mactroides* sob o efeito de diferentes salinidades: 20,
 1289 25, 30 e 35 ppt descritas na **Tabela 1**, totalizando 27 horas para o fim desta etapa.

1290 **Tabela 1.** Descrição do desenvolvimento embrionário da espécie *Amarilladesma*
 1291 *mactroides* em diferentes salinidades: 20, 25, 30 e 35 ppt, no período de 27 horas. Número
 1292 médio de indivíduos por tratamento = 10. Média de temperatura da água (\pm DP), durante
 1293 o período experimental, $21,0 \pm 0,9$ °C.

Estágio	Tempo para atingir o estágio (minutos/horas)			
	Salinidades (ppt)			
	20	25	30	35
1° corpúsculo polar	18 - 39min	18 - 39min	18 - 39min	18 - 39min
1°e 2° corpúsculo polar	39 - 55min	39 - 55min	39 - 55min	39 - 55 min
2° corpúsculo polar completo	1h 22min	-	46 min	46min
1ª divisão celular	1h 45min	1h 22min	1h 22min	1h 22min
2ª divisão celular	1h 45min	1h 45min	1h 45min	1h 45min
4 células	3h 20min	3h 20min	-	-
Múltiplas divisões	4h 35min	4h 35min	3h 20min	3h 20min
Células redondas e ativas - natantes	8h	8 - 14h	8 - 14h	8 - 14h
Metamorfose para Trocófora	-	17h	17h	17h
Trocófora	-	18 - 27h	18 - 24h	18 - 24h
Larvas D	-	-	27h	27h
Células redondas - Defeituosas	18 - 24h	-	-	-
Todas defeituosas	27h	-	-	-

1294 (-) indicam ausência de informação referente ao período de transformação.

1295 Com 18 minutos de experimento já havia iniciado a formação do 1° corpúsculo
 1296 polar, em todos os tratamentos, com estágio mais avançado nas salinidades 30 e 35 ppt.
 1297 Nesta etapa experimental foram observados padrões de velocidade mais rápidos nas
 1298 divisões celulares nos tratamentos de 30 e 35 ppt, e mais lentas nos tratamentos de 20 e
 1299 25 ppt, (**Tabela 1**). Dos 39 aos 55 minutos houve a transição da transformação celular do

1300 1° para o 2° corpúsculo polar, no qual em salinidades 20 e 25 ppt, apenas 50% das células
1301 amostradas encontrava-se com o 2° corpúsculo, enquanto que aos 46 minutos nas
1302 salinidades de 30 e 35 ppt, todas as células já apresentavam o 2° corpúsculo.

1303 Em 1h e 22 minutos na salinidade 20 ppt, todos os embriões estavam com o 2°
1304 corpúsculo polar completo, à medida que nas demais salinidades os embriões estavam no
1305 processo de 1ª divisão celular. Dentro de 1h e 45 minutos as células estavam em 1ª e 2ª
1306 divisão celular nas salinidades de 20 e 25 ppt, com 50% em 1ª divisão, enquanto que em
1307 salinidades 30 e 35 ppt, 50 % em 2ª divisão (**Tabela 1**).

1308 Nas amostras de 3h e 20 minutos, embriões de salinidades 20 e 25 ppt
1309 apresentavam características de células com 4 divisões ou mais, à proporção que as de
1310 salinidade 30 e 35 ppt encontravam-se em divisões avançadas acima de 4. Este processo
1311 de divisão seguiu ativamente e, em 8 horas, amostras de salinidades 20 e 25 ppt se
1312 encontravam em processo de transição para larvas nadantes e ativas, estas que, nesse
1313 período, já estavam presentes nas salinidades superiores deste experimento (30 e 35 ppt).
1314 Entre 8 e 17 horas, as células nadantes presentes em salinidades 20 ppt tornaram-se mais
1315 estáticas e com início de deformidades morfológicas aparente nas suas transformações
1316 (tamanhos, formas e movimentos celulares irregulares), quando comparadas com as
1317 células dos outros tratamentos, que estavam metamorfoseando-se em larvas trocóforas
1318 (**Tabela 1**).

1319 Entre 18 e 27 horas, o defeito na formação e transformação celular foi contínuo
1320 nas amostras de salinidade 20 ppt, com nenhuma célula conseguindo metamorfosear-se
1321 em larvas trocóforas. Em salinidade 25 ppt, todas as células transformaram-se em larvas
1322 trocóforas, com algumas apresentando alterações morfológicas e na motilidade (quando
1323 comparadas com larvas normais). Nas salinidades 30 ppt, foi notório a transição de larvas
1324 trocóforas ativas para larvas D bem formadas e desenvolvidas. Enquanto que em

1325 salinidade 35 ppt, todo o material biológico presente nas amostras encontrou-se
1326 metamorfoseado em larvas D, finalizando esta etapa do experimento em 27 horas (**Tabela**
1327 **1**).

1328 **3.2 Crescimento larval e sobrevivência**

1329 O desenvolvimento larval de *A. mactroides* em diferentes salinidades, 20, 25, 30
1330 e 35 ppt, totalizou 27 dias quando o primeiro tratamento apresentou larvas com
1331 características para o assentamento (sementes).

1332 Nos primeiros dias desta etapa, as larvas desenvolveram-se de forma homogênea,
1333 com um padrão de crescimento característico até o final do experimento: crescimento
1334 mais lento em salinidades de 20 e 25 ppt quando comparadas com espécimes que estavam
1335 condicionadas a salinidades de 30 e 35 ppt. Alterações morfológicas na altura,
1336 comprimento (**Figura 1. A-C**) e sobrevivência das larvas (**Figura 2**), começaram a ser
1337 mais evidente no nono dia experimental, o que resultou na contabilização destas
1338 informações a partir das amostras coletadas nesta data.

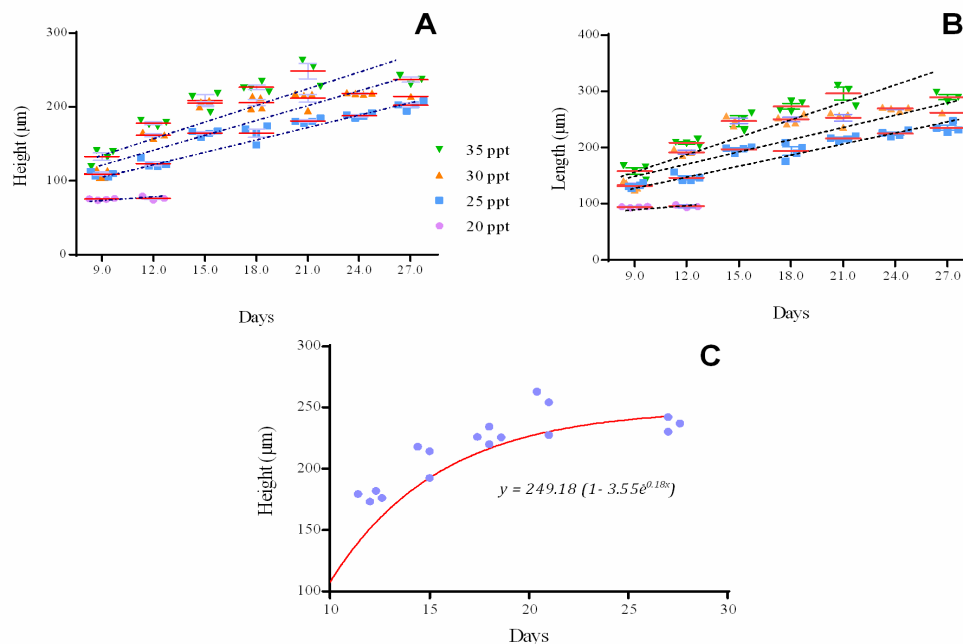
1339 No dia 9, as larvas mantidas em salinidade 20 ppt apresentaram menores tamanhos
1340 e mortalidades acentuadas; quando comparadas com as salinidades de 25 ppt que
1341 possuíam larvas com tamanhos heterogêneos e alta porcentagem de sobrevivência
1342 amostrada e com as salinidades de 30 e 35 ppt, maiores tamanhos homogêneos,
1343 respectivamente (**Figura 1 A-B; Figura 2**). Na amostragem referente ao dia 12,
1344 observou-se que as larvas em salinidade 20 ppt, não se desenvolveram. Enquanto que as
1345 mantidas em salinidade 25 ppt, apresentaram certa adaptação, com demonstração de
1346 estarem se desenvolvendo, bem alimentadas e com o vélum ativo, similarmente às larvas
1347 presentes em 30 e 35 ppt.

1348 Nas amostras do dia 15, não houve sobrevivência no tratamento de salinidade 20
1349 ppt, mas houve heterogeneidade de tamanho nas larvas (vivas e mortas) presente nas

1350 amostras de salinidades 25 ppt; e o mesmo padrão de crescimento e sobrevivência nas de
 1351 larvas de 30 e 35 ppt (**Figura 1 A-B; Figura 2**). Este padrão manteve-se nas amostras
 1352 do dia 18 para os tratamentos de 25, 30 e 35 ppt.

1353 Nas coletas do dia 21 e 24, as larvas de salinidade 30 ppt começaram a ter uma
 1354 diminuição abrupta na sobrevivência, apesar de as larvas vivas (amostradas) estarem bem
 1355 desenvolvidas e ativas (pré - sementes). No último dia de coletas (27), larvas presentes
 1356 em salinidade 25 ppt já possuíam características de pré-sementes enquanto que as larvas
 1357 de salinidade 35 ppt tinham completado a metamorfose para sementes (**Figura 1 A-B;**
 1358 **Figura 2**), por exemplo, com a perda do vélum completa e pés ativos em busca de
 1359 substrato.

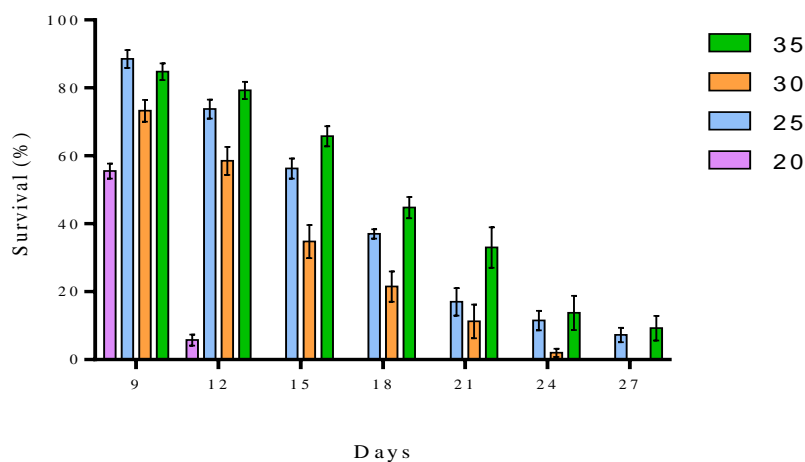
1360 Como afirmação da melhor salinidade para o crescimento da espécie *A.*
 1361 *mactroides*, os valores da altura das larvas condicionadas a esta salinidade, em
 1362 decorrer do tempo, ajustam-se ao modelo estatístico de von Bertalanffy (**Figura 1 C**).



1363

1364 **Figura 1 (A-C)**. Médias de altura (A) e comprimento (B) das larvas de *Amarilladesma*
 1365 *mactroides* expostas a diferentes salinidades: 20, 25, 30 e 35 ppt em laboratório, com
 1366 duração de 27 dias de larvicultura. (C) Médias de altura das larvas em função do tempo
 1367 que ajustam ao modelo estatístico de Von Bertalanffy. Médias de temperatura (\pm DP) de
 1368 $19,4 \pm 1,4$ °C.

1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375



1376 **Figura 2.** Taxa de sobrevivência (%) das larvas de *Amarilladesma mactroides* expostas
1377 a diferentes salinidades: 20, 25, 30 e 35 ppt em laboratório, com duração de 27 de
1378 larvicultura. Médias de temperatura (\pm DP) de $19,4 \pm 1,4$ °C.
1379

1380 4. Discussão

1381 O desenvolvimento embrionário é uma fase importante que precisa ser controlada
1382 minuciosamente em laboratório (hatchery) para aumentar o rendimento de
1383 transformações em larvas véligers D (Huo *et al.*, 2014).

1384 Os resultados do presente estudo indicam que embriões de *A. mactroides* têm o
1385 melhor desenvolvimento em larvas véligers D, na faixa de salinidade de 30 e 35 ppt, assim
1386 como encontrado por Santos *et al.* (dados não publicados) que conseguiram descrever a
1387 fase embrionária desta espécie no período de 24 horas, com salinidade 32 ppt. Observou-
1388 se também uma tolerância dos embriões expostos à salinidade 25 ppt, apresentando
1389 metamorfoses mais lentas em seu desenvolvimento e algumas deformações, já em
1390 salinidades 20 ppt todos os embriões apresentaram deformações. No entanto em ambas
1391 salinidades não foi possível observar a metamorfose completa para larvas D dentro o
1392 tempo de observação de 27h (**Tabela 1**).

1393 Respostas semelhantes foram relatadas para *Crassostrea rhizophorae* (Dos Santos
1394 & Nascimento, 1985), *Placuna placenta* (Madrones-Ladja, 2002) e *Panopea japonica*
1395 (Huo *et al.*, 2017), tanto no quesito tolerância quanto salinidade ótima para o

1396 desenvolvimento embrionário (**Tabela 2**). Em outros estudos com espécies do gênero
 1397 *Crassostrea*, os bivalves apresentaram características mais estuarinas, pois os embriões
 1398 podem tolerar e se desenvolver em salinidades mais baixas, tais como *Crassostrea*
 1399 *belcheri* (Tan & Wang, 1992), *Crassostrea hongkongensis* (Huo *et al.*, 2014) e
 1400 *Crassostrea iredalei* (Fang *et al.*, 2016) (**Tabela 2**). Segundo Davis (1958), um aspecto
 1401 importante para determinar a tolerância dos embriões é a salinidade no qual os
 1402 reprodutores são condicionados e o local que ocorre a desova. Os reprodutores de marisco
 1403 branco utilizados, nesta pesquisa, foram coletados do ambiente e aclimatados em
 1404 laboratório na mesma salinidade 35 ppt, caracterizando uma salinidade ótima para adultos
 1405 desta espécie (Carvalho *et al.*, 2015), porém mais estudos são necessários para
 1406 compreender se o efeito do condicionamento também se aplica para embriões destes
 1407 animais. Estas descobertas fornecem informações base para o melhoramento da produção
 1408 e rendimento de larvas D de *A. mactroides* em laboratório.

1409 **Tabela 2.** Limite de tolerância e salinidades ótimas para o desenvolvimento de
 1410 embriões para larvas D normais de algumas espécies de bivalves.

Espécies	Salinidade (ppt)		Referências
	Limite de tolerância	Ótima	
<i>A. mactroides</i>	25-35	30-35	Presente estudo
<i>C. rhizophorae</i>	16-40	25-37	Dos Santos & Nascimento, 1985
<i>C. belcheri</i>	12-30	24-30	Tan & Wang, 1992
<i>P. placenta</i>	22-34	22-34	Madrones-Ladja, 2002
<i>C. hongkongensis</i>	15-30	15-23	Huo <i>et al.</i> , 2014
<i>C. iredalei</i>	10-30	15-30	Fang <i>et al.</i> , 2016
<i>P. japonica</i>	25-32	32	Huo <i>et al.</i> , 2017

1411

1412 No presente estudo, o desenvolvimento larval de *A. mactroides*, caracterizado pela
 1413 metamorfose das larvas véligers D em pediveligers, demonstrou que diferentes
 1414 salinidades tiveram efeitos na sobrevivência e crescimento nesta espécie. Os resultados
 1415 mostraram que as larvas do marisco branco foram capazes de tolerar as salinidades entre
 1416 25 - 35 ppt. Todavia a metamorfose das larvas para sementes completou-se entre 30 e 35

1417 ppt. Com um desenvolvimento mais rápido em 35 ppt, assim como maior crescimento e
1418 sobrevivência durante o período experimental de 27 dias (**Figura 1 A-C; Figura 2**).

1419 Houve também no início, uma expressiva mortalidade no tratamento com
1420 salinidade 20 ppt (**Figura 2**), sugerindo que estas larvas são sensíveis a baixas salinidades.
1421 Enquanto que as mortalidades, no final do período experimental nos tratamentos com
1422 salinidade 30 ppt podem estar relacionadas às larvas prontas para assentar, embora sem
1423 êxito diante da ausência do substrato, atrelado ao estresse salino, ocasionado por uma
1424 salinidade mais baixa que a ótima (observação pessoal).

1425 Em princípio, os mecanismos sobre o efeito da salinidade nas larvas de moluscos
1426 ainda não são completamente elucidados (Huo et al., 2014; Huo *et al.*, 2017; Wang *et al.*,
1427 2018), contudo estes resultados concordam com estudos anteriores que, quando as larvas
1428 são expostas a níveis extremos de tolerância, resulta no crescimento mais lento e ou pode
1429 afetar a taxa de sobrevivência (Madrones-Ladja, 2002; Huo *et al.*, 2017; Wang *et al.*,
1430 2018). Como outros bivalves marinhos, o marisco branco é osmoconformador (Lopes et
1431 al., 2011). Wang et al. (2018) observaram como um mecanismo de defesa o fechamento
1432 das conchas das larvas de *Crassostrea nippona* quando mantidas em salinidades
1433 estressantes para a espécie (de 14 e 34 ppt), enquanto que no presente estudo 20 e 25 ppt
1434 foi considerado estressante para *A. mactroides*. Este mecanismo tende a gerar gasto
1435 energético em processos osmorregulatórios, interferindo na ingestão de alimentos e
1436 crescimento (Huo *et al.*, 2017) e conseqüentemente na sobrevivência. O crescimento mais
1437 lento, neste estudo, foi observado nas salinidades de 25 ppt, pois as larvas com menor
1438 crescimento (comparado com os tratamentos 30 e 35 ppt) conseguiram se adaptar e
1439 sobreviver nestas condições até o final do experimento.

1440 Apesar das peculiaridades existentes sobre os diferentes efeitos da salinidade nas
1441 espécies de bivalves, estes estudos mencionados anteriormente demonstram que mesmo

1442 as larvas tendo a capacidade de tolerar variações, ainda assim apresentam maior
 1443 crescimento e sobrevivência em salinidades ótimas (Huo *et al.*, 2014). Isto reforça,
 1444 também, uma observação relatada por Tan & Wang (1996), quando postula que a maioria
 1445 dos hatcheries estão localizados pertos de ambiente marinho, onde a água do mar é
 1446 captada para realização da larvicultura, podendo as mesmas serem inadequadas para a
 1447 produção da espécie desejada. A **Tabela 3** resume a faixa de salinidade tolerante e ótima,
 1448 além da melhor taxa de sobrevivência das larvas de algumas espécies de bivalves.

1449 **Tabela 3.** Limite de tolerância e níveis ótimos de salinidade para o crescimento larval e
 1450 sobrevivência de *Amarilladesma mactroides* e outras espécies de bivalves.

Espécies	Salinidade (ppt)		Referências	
	Limite de tolerância	Níveis ótimos		
		Crescimento		Sobrevivência
<i>A. mactroides</i>	25-35	35	35	Presente estudo
<i>C. belcheri</i>	12-30	12-24	12-24	Tan & Wang, 1992
<i>P. placenta</i>	16-34	16-34	22-34	Madrones-Ladja, 2002
<i>P. japonica</i>	25-32	32	32	Huo <i>et al.</i> , 2017

1451

1452 Flutuações de salinidades afetam algumas áreas em que o marisco branco é
 1453 encontrado, com registros de 14 a 38 ppt (Odebrecht *et al.* 2010). Santos *et al.* (2016)
 1454 relacionaram a possível diminuição dos estoques naturais desta espécie à ação antrópica
 1455 ou influência de variáveis ambientais como salinidade e temperatura, visto que as regiões
 1456 mais afetadas, em seu estudo, ficavam perto da desembocadura da Laguna dos Patos
 1457 (32°09'S, 52°06'W), o que influenciou em alterações no sistema imunológico dos animais
 1458 analisados. Nessa premissa, o presente estudo mostra que os embriões e larvas desta
 1459 espécie não toleram salinidades inferiores a 20 ppt, demonstrando que isso pode ser de
 1460 fato um fator determinante no sucesso reprodutivo desta espécie, nestas regiões.

1461 Estudos comprovam que a salinidade também pode interagir diretamente com
 1462 outros parâmetros físico-químicos e.g. na tolerância à temperatura de larvas de bivalves

1463 (Davis & Calabrese, 1964; Cain, 1973). Desta forma, é relevante investigar, em estudos
1464 futuros, o efeito desta variável no desenvolvimento embrionário e larval da espécie *A.*
1465 *mactroides* em laboratório.

1466 **5. Conclusão**

1467 Sendo assim, os resultados apresentados, neste estudo, demonstraram que tanto os
1468 embriões quanto as larvas de *A. mactroides* podem tolerar uma faixa de salinidade entre
1469 25 e 35 ppt. Porém os indivíduos apresentam maior crescimento e sobrevivência em
1470 salinidades de 35 ppt. O uso desta faixa de salinidade no desenvolvimento embrionário e
1471 larval deve permitir a melhor produção de sementes desta espécie em laboratório.

1472 **Agradecimentos**

1473 Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
1474 Nível Superior) pelo apoio financeiro. L.A. Romano é um pesquisador do CNPq
1475 brasileiro (301245 / 2016-9).

1476 **Referências**

- 1477 AYERBE R, ZEVALLOS S, CASTAÑEDA V, LOPE F, BENDITA, H AND SANZ, Y.
1478 2017. Manual para el cultivo de la macha *Mesodesma donacium* (LAMARCK,
1479 1818) en la región Moquega. Instituto del Mar del Perú, Callao, 24pp.
- 1480 BASTIDA RO, ROUX A, BREMEC C, GERPE M AND SORENSEN M. 1991.
1481 Estructura poblacional de la almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*) durante
1482 el verano de 1989 en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Frente Marítimo*,
1483 9(SecA): 83–92.
- 1484 CAIN, TD. 1973. The combined effects of temperature and salinity on embryos and
1485 larvae of the clam *Rangia cuneate*. *Marine Biology*, 21 (1): 1-6.
1486 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00351185>.

- 1487 CARVALHO, YBM, POERSCH, LH, JUNIOR, JP AND ROMANO, LA. 2013.
1488 Histopathological survey of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* from
1489 southern Brazil. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 33(2):
1490 53-58.
- 1491 CARVALHO, YBM, ROMANO, LA AND POERSCH, LHS. (2015). Effect of low
1492 salinity on the yellow clam *Amarilladesma mactroides*. *Brazilian Journal of*
1493 *Biology*, 75 (1): 8-12. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.03213>.
- 1494 COSCARÓN, S. 1959. La almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*, Deshayes) de la
1495 costa de la Provincia de Buenos Aires. *Serie: Agro. Publicación Técnica*, 1(3):1-
1496 66.
- 1497 DAVIS, HC. 1958. Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities.
1498 *The Biological Bulletin*, 114 (3), 296– 297. <http://dx.doi.org/10.2307/1538986>.
- 1499 DAVIS, HC AND CALABRESE, A. 1964. Combined effects of temperature and salinity
1500 on development of eggs and growth of larvae of *Mercenaria mercenaria* and
1501 *Crassostrea virginica*. *Fishery Bulletin*, 63 (3), 643– 655.
- 1502 DOS SANTOS, A.E. AND NASCIMENTO, IA., 1985. Influence of gamete density,
1503 salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove
1504 oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *Aquaculture*, 41(4): 335-352.
1505 [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90219-4](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(85)90219-4).
- 1506 FANG A, PENG, TC, YEN, PK, YASIN, Z AND HWAI A. 2016. Effect of salinity on
1507 embryo and larval development of oyster *Crassostrea iredalei*. *Tropical life*
1508 *sciences research*, 27(supp1), 23-29. <http://dx.doi.org/10.21315/tlsr2016.27.3.4>.

- 1509 FIORI, SM, CAZZANIGA, NJ AND ESTEBENET, AL. 2004. Winter distribution,
1510 density and size of *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia, Maत्रacea) in Monte
1511 Hermoso beach (Argentina). *Brazilian Journal of Oceanography*, 52(1), 1–9.
1512 <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-87592004000100001>.
- 1513 GADOMISK, K, MOLLER, H, BEENTJES, M AND LAMRE, M. 2015. Embryonic and
1514 larval development of the New Zealand bivalve *Paphies ventricosa* Gray, 1843
1515 (Veneroidea: Mesodesmatidae) at a range of temperatures. *Journal of Molluscan
1516 Studies*, 81 (3): 356–364. <http://dx.doi:10.1093/mollus/eyv001>.
- 1517 GIANELLI, I, MARTÍNEZ, G AND DEFEO, O. 2015. An ecosystem approach to small-
1518 scale co-managed fisheries: The yellow clam fishery in Uruguay. *Marine Policy*,
1519 62 (2015), 196–202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2015.09.025>.
- 1520 GIREESH R & GOPINATHAN, CP. 2004. Effect of salinity and pH on larval rearing
1521 and spat settlement of *Paphia malabarica*. *Journal of the Marine Biological
1522 Association of India*, 46 (2): 146-153.
- 1523 HELM, MM, BOURNE, N AND LOVATELLI, A. 2004. Hatchery culture of bivalves:
1524 a practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. N° 471, Rome, FAO.
- 1525 HERRMANN M, ALFAYA J, LEPORE M, PENCHASZADEH P. AND ARNTZ W.
1526 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam
1527 *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy,
1528 temperate beach in northern Argentina. *Helgoland Marine Research*, 65 (3):
1529 285–297. <https://doi.org/10.1007/s10152-010-0222-3>.
- 1530 HUO, Z, WANG, Z, LIANG, J, ZHANG, Y, SHEN, J, YAO, TUO, SU, J AND YU, R.
1531 2014. Effects of salinity on embryonic development, survival, and growth of

- 1532 *Crassostrea hongkongensis*. *Journal of Ocean University of China*. 13 (4): 666–
1533 670. <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2206-4>.
- 1534 HUO ZM, GUAN HW, RBBANI MG, XIAO YX, ZHANG XK, FAN C AND YAN XW.
1535 2017. Effects of environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of
1536 geoduck clam (*Panopea japonica* A. Adams, 1850) larvae. *Aquaculture Reports*,
1537 8 (2017), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.001>.
- 1538 LOPES, TM, BARCAROLLI, IF, DE OLIVEIRA, CB, DE SOUZA, MM AND
1539 BIANCHINI, A. 2011. Mechanisms of copper accumulation in isolated mantle
1540 cells of the marine clam *Amarilladesma mactroides*. *Environmental toxicology*
1541 *and chemistry*, 30 (7): 1586-1592. <https://doi.org/10.1002/etc.527>.
- 1542 MADRONES-LADJA, JA. 2002. Salinity effect on the embryonic development, larval
1543 growth and survival at metamorphosis of *Placuna placenta* Linnaeus (1758).
1544 *Aquaculture*, 214 (1-4): 411-418. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00401-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5)
1545 [5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5).
- 1546 MACKIE, GL. 1984. Bivalves. In ‘The Mollusca’. (Eds A. S. Tompa, N. H. Verdonk and
1547 J. A. M. Van Den Biggelaar) Vol. 7, pp. 351-418. (Academic Press: New York).
1548 <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-092659-9.50012-0>.
- 1549 MANTA, G, BARREIRO, M, ORTEGA, L & DEFEO, O. 2016. The effect of climate
1550 variability on the abundance of the sandy beach clam (*Amarilladesma mactroides*)
1551 in the Southwestern Atlantic. *Journal of Coastal Research*, 33(3): 531-536.
1552 <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-16-00054.1>.
- 1553 MELO, EMC., GOMES, CHAM., SILVA, FC, SÜHNEL, S AND MELO, CMRD. 2015.
1554 Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas*
1555 (Thunberg, 1793). *Boletim do Instituto de Pesca*, 414, 889-98.

- 1556 NELL, JA AND HOLLIDAY, JE. 1988. Effects of salinity on the growth and survival of
1557 Sydney Rock Oyster (*Saccostrea commercialis*) and Pacific Oyster (*Crassostrea*
1558 *gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*, 68 (1), 39 – 44. [https://doi.org/10.1016/0044-](https://doi.org/10.1016/0044-486(88)90289-X)
1559 [486\(88\)90289-X](https://doi.org/10.1016/0044-486(88)90289-X).
- 1560 ODEBRECHT, C, BERGESCH, M, RÖRIG, LR AND ABREU, PC. 2010.
1561 Phytoplankton interannual variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-
1562 2007), with emphasis on the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuaries*
1563 *and Coasts*, 33 (2): 570-583. <https://doi.org/10.1007/S12237-009-9176-6>.
- 1564 ORTEGA, L, CASTILLA, JC, ESPINO, M, YAMASHIRO AND C, DEFEO, O. 2012.
1565 Effects of fishing, market price, and climate on two South American clam species.
1566 *Marine Ecology Progress Series*, 469, 71–85. <https://doi.org/10.3354/meps10016>.
- 1567 RIOS, EC. 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio Grande.
1568 368p.
- 1569 SANTOS, JJS, CARVALHO, YB, LOPES, DLDA AND ROMANO, LA. 2016.
1570 Immunological profile of the yellow clam *Amarilladesma mactroides*
1571 (Mesodesmatidae) from the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal*
1572 *of aquatic animal health*. 28 (1): 11-20.
1573 <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2015.1116471>.
- 1574 TAN, SH AND WONG, TM. 1996. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival
1575 and settling in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). *Aquaculture*,
1576 145, (1-4): 129– 139. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(96\)01338-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(96)01338-5).
- 1577 WANG, T, LI, Q, ZHANG, J AND YU, R. 2018. Effects of salinity, stocking density,
1578 and algal density on growth and survival of Iwagaki oyster *Crassostrea nippona*

1579 larvae. *Aquaculture International*, 26 (4): 947-958.

1580 <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0261-3>.

1581

1582

1583

1584

1585

1586

1587

1588

1589

1590

1591

1592

1593

1594

1595

1596

1597

1598

1599

1600

1601

1602

1603

1604

1605

1606

1607

1608

1609 **Capítulo 3.**

1610

1611

1612

1613

1614

1615

1616

1617

1618 **Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário e larval do marisco branco**

1619 *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) em laboratório

1620

1621

1622

1623

1624 **Manuscrito submetido para: Brazilian Journal of Oceanography**

1625

1626 **Observação:** Durante a transcrição para esta tese as figuras e tabelas foram colocadas no
1627 corpo do texto para uma melhor compreensão. A normatização deste capítulo seguiu os
1628 padrões estabelecidos pela revista submetida.

1629

1630

1631

1632

1633

1634

1635

1636

1637

RESUMO

1638

1639 Neste estudo foi avaliado o efeito de quatro diferentes temperaturas: 18, 20, 23 e 26 °C,
1640 no desenvolvimento embrionário, crescimento larval e sobrevivência do marisco branco
1641 *Amarilladesma mactroides*, em laboratório. Na primeira etapa, observou-se o
1642 desenvolvimento dos embriões para larva D, até todos os tratamentos atingirem as
1643 transformações completas. Este processo durou aproximadamente 28 horas, com maior
1644 velocidade de transformações nos tratamentos de 23 e 26 °C, que finalizaram em 20 horas
1645 e 49 minutos. Na segunda etapa, larvas D também foram submetidas as quatro diferentes
1646 temperaturas já estabelecidas. Houve diferença significativa no crescimento das larvas
1647 mantidas 26 °C quando comparados aos tratamentos 18 e 20 °C. Os tratamentos 18, 20 e
1648 23 °C obtiveram larvas pedivéligers prontas para assentar, no entanto, 18 e 20 °C
1649 mantiveram os melhores crescimentos acompanhado das maiores sobrevivências. Os
1650 resultados deste estudo, indicam que os embriões desta espécie são capazes de tolerar
1651 uma variação de 18 a 26 °C de temperatura, sendo o efeito desta variável um determinante
1652 na velocidade de metamorfose. No entanto, diante das condições experimentais adotadas,
1653 as larvas mantiveram-se dependentes das temperaturas mais baixas (18 e 20 °C) para
1654 estarem aptas ao assentamento em melhores condições de tamanho e sobrevivência.

1655 **Palavras-chave:** *temperaturas; desenvolvimento embrionário; crescimento;*
1656 *sobrevivência; Amarilladesma mactroides.*

INTRODUÇÃO

1657

1658 A espécie *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1984), conhecida como marisco
1659 branco, é um bivalve de areia com importância socioeconômica nas regiões no qual é
1660 endêmica (Herrmann *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2016; McLachlan, 2018). Há décadas é
1661 alvo de várias pesquisas referentes ao seu habitat (Coscarón, 1959), ciclos reprodutivos

1662 no ambiente (Herrmann *et al.*, 2009), dinâmica populacional (Bergonci & Thomé, 2008)
1663 e sobre a diminuição dos estoques naturais e surtos de mortalidades que acometem esta
1664 espécie, ao longo das áreas de sua distribuição (Ortega *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013a;
1665 Carvalho *et al.*, 2013b; Santos *et al.*, 2016). No entanto, apenas recentemente que foram
1666 realizados estudos reprodutivos, relatando e descrevendo o desenvolvimento embrionário
1667 e larval completo em laboratório por Santos *et al.* (dados não publicados) com a finalidade
1668 inicial de contribuir com informações para o cultivo desta espécie.

1669 Para Manoj & Appukuttan (2003), são necessárias informações detalhadas para o
1670 desenvolvimento da aquicultura de uma espécie nova. O que condiz com o marisco
1671 branco, apontado como promissor para esta atividade (Santos *et al.*, 2016). Isto envolve
1672 estudos inicialmente básicos sobre o efeito de variáveis ambientais, como: salinidade,
1673 temperatura e dietas, para otimizar a produção em laboratório (Calabrese & Davis, 1970;
1674 Manoj & Appukuttan 2003; Huo *et al.*, 2017). Pesquisas sobre o efeito da salinidade em
1675 juvenis e adultos da espécie *A. mactroides* já foram realizadas (Carvalho *et al.*, 2015). Tal
1676 como, o efeito desta mesma variável nas etapas embrionária e larval (dados não
1677 publicados), porém nada referente ao efeito da temperatura nestas fases de vida.

1678 A temperatura é considerada um dos fatores mais influentes para moluscos
1679 bivalves (Helm *et al.*, 2004; Huo *et al.*, 2017), exercendo efeito no sistema imunológico
1680 (Santos *et al.*, 2016), em mecanismos fisiológicos (Casas *et al.*, 2018) e reprodutivos dos
1681 animais, como: processos de condicionamento de reprodutores, desenvolvimento
1682 embrionário e larval, crescimento e sobrevivência (Gireesh & Gopinathan, 2004; Barber
1683 & Blake 2006; Gadomski *et al.*, 2015; Gosling, 2015; Huo *et al.*, 2017). O efeito da
1684 temperatura em campo é difícil de ser avaliado, sendo estas informações obtidas com
1685 mais precisão em experimentos realizados em laboratório, sob condições ambientais
1686 controladas (Madrones-Ladja, 2002; Manoj & Appukuttan, 2003; Huo *et al.*, 2014).

1687 Em áreas onde o marisco branco é encontrado, Santos *et al.* (2016) relataram uma
1688 ampla flutuação de temperaturas ao longo do ano, fato que pode exercer influência no
1689 ciclo reprodutivo e fases de vida da espécie no ambiente. Herrmann *et al.* (2009) na
1690 Argentina, registraram duas desovas desta espécie por ano, uma durante a primavera e a
1691 outra no verão, fenômeno atribuído principalmente ao efeito da temperatura. Entretanto,
1692 estudos que avaliem os efeitos desta variável em condições laboratoriais, são limitados
1693 referentes a espécie *A. mactroides*.

1694 Portanto, o presente trabalho avaliou o efeito da temperatura no desenvolvimento
1695 embrionário e larval, assim como na sobrevivência do marisco branco, *A. mactroides* em
1696 laboratório.

1697 MATERIAL E MÉTODOS

1698 Reprodutores adultos foram coletados em novembro de 2017 no Rio Grande do
1699 Sul, Brasil (2°3'10"S 51°59'26"O) e conduzidos ao LMM – UFSC para serem aclimatados
1700 em laboratório. Nesta etapa de aclimação, manteve-se os animais em baldes (5L) com
1701 areia (3kg), alocados submersos em tanques de 40 litros, contendo: aeração e fluxo
1702 contínuo de água do mar (35 ppm), temperatura controlada (18 ± 1 °C) e alimentação
1703 ofertada com as microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* e *Rhodomonas*
1704 *salina* (1:1:1), mantendo nas concentrações de 15 a 20 x10⁴ células.mL⁻¹ por dia. Este
1705 período durou duas semanas antes da realização da desova.

1706 Desova

1707 Utilizou-se aleatoriamente 14 espécimes de marisco branco (proporção 1:1,
1708 machos e fêmeas) com comprimento médio total de concha de 6,2 cm \pm 2,0 e peso médio
1709 total de 20,17g \pm 2,7 para realização da desova pela técnica de “strip” (Helm *et al.*, 2004).
1710 Os gametas femininos (estimado em 27 x 10⁶ ovócitos) e masculinos foram utilizados

1711 para uma fertilização controlada na proporção de aproximadamente 1:7 (Melo *et al.*,
1712 2015).

1713 **Desenho experimental**

1714 Este experimento foi dividido em duas etapas referentes ao efeito da temperatura
1715 no desenvolvimento embrionário (1ª etapa) e larval (2ª etapa).

1716 *1ª etapa:* após a desova (*item 2.2*), parte dos embriões gerados pela fertilização
1717 (10 cells. mL⁻¹) foram imediatamente submetidos aos seus respectivos tratamentos, em
1718 temperaturas: 18, 20, 23 e 26 °C. Cada tratamento possuía 4 repetições e foi desenvolvido
1719 em uma sala climatizada mantida a 20°C, utilizando tanques retangulares de fibra 200L
1720 (150L de água, 35ppt) que serviram para manter em banho maria, baldes de 5 L (4,5L de
1721 água, 35 ppt) no qual alocou-se os embriões. Esta etapa finalizou em 27 horas e 53
1722 minutos.

1723 O restante dos embriões (proveniente da desova) foram transferidos para um
1724 tanque cilíndrico de fundo plano de 6.000 litros composto por: água do mar (35 ppt),
1725 aeração constante e temperatura ambiente de 25 ± 1 °C. Mantendo-os nestas condições
1726 até transformarem-se em larvas “D” para a 2ª etapa.

1727 *2ª etapa:* seguiu o padrão experimental da *1ª etapa*, porém com a densidade de 6
1728 larvas. mL⁻¹ e com renovações diárias de água 100 % em todas as unidades experimentais.
1729 A água utilizada para renovação apresentava a temperatura correspondente ao tratamento,
1730 mantendo a temperatura homogênea em todo o período experimental, que durou 24 dias.

1731 Toda água salgada utilizada foi esterilizada com UV e filtrada (1µm). E todos os
1732 tanques e baldes continham mangueiras de aeração, usando tubos de vidro estéreis para:

1733 oxigenação, evitar a estratificação termal e minimizar depósitos de matéria orgânica que
1734 poderiam ser propícios para o desenvolvimento de bactérias.

1735 **Temperaturas**

1736 Manteve-se as temperaturas de: 18°C com o auxílio de chiller; 20°C através do
1737 aparelho de ar condicionado presente na sala experimental; e 23 e 26°C com aquecedores
1738 regulados em cada temperatura respectivamente. As temperaturas utilizadas foram
1739 baseadas em análises sazonais que podem ser encontradas em alguns pontos de
1740 distribuição do marisco branco (Santos *et al.*, 2016), e foram monitoradas diariamente no
1741 experimento com auxílio do termômetro.

1742 **Alimentação**

1743 Pela ausência de informações sobre dietas da espécie *A. mactroides* em
1744 laboratório, a dieta do experimento baseou-se em microalgas e concentrações utilizadas
1745 para larvicultura de outras espécies no LMM (Turini *et al.*, 2014).

1746 Efetuou-se alimentação diária inicial para fase larval (dia 0), com mix algal
1747 composto de: *Isochrysis galbana* e *Pavlova lutheri*, na concentração de 1×10^4 cells.mL⁻¹
1748 ¹ (proporção: 0,5:0,5 x 10^4 cells.mL⁻¹). Esta concentração foi aumentada no decorrer do
1749 experimento, (dia 6) para 2×10^4 cells.mL⁻¹ (proporção: 1:1 x 10^4 cells.mL⁻¹) e
1750 posteriormente (dia 11), com adição de *Chaetoceros calcitrans*, para 3×10^4 cells.mL⁻¹
1751 (proporção: 1:1:1 x 10^4 cells.mL⁻¹, respectivamente) até o final do período experimental.

1752 **Manejo e Amostragens**

1753 *1ª etapa:* para realização das amostragens, homogeneizou-se a água dos baldes
1754 para retirada de amostras, com auxílio de pipeta de 2 mL, e observou-se as modificações
1755 celulares de cada tratamento, com auxílio de microscópio de luz e câmaras de Sedgewick-

1756 Rafter. As primeiras amostras foram realizadas continuamente em intervalos de 5 minutos
1757 na primeira 1h; 30 minutos até as primeiras 8h e posteriormente a cada 3 horas até
1758 completar aproximadamente 28 h.

1759 *2ª etapa:* o manejo foi realizado diariamente, com renovação 100% da água,
1760 realização da limpeza dos tratamentos e adição da nova alimentação. Para facilitar esta
1761 etapa, contou-se com auxílio de peneiras de malhas: 35, 100 e 240 μm . No final de cada
1762 manejo, os resíduos totais acumulados na peneira (microalgas e larvas, vivas e mortas)
1763 eram devolvidos para cada unidade experimental, no intuito de não interferir no
1764 desenvolvimento experimental.

1765 Para acompanhar o crescimento larval e sobrevivência, coletas de amostras foram
1766 realizadas com auxílio de uma pipeta de 2 mL (durante os manejos), no período de 3 em
1767 3 dias até o final do experimento. Posteriormente realizou-se análises qualitativas para
1768 morfologia e quantitativas para: porcentagens de sobrevivência e médias de crescimento
1769 das larvas nos diferentes tratamentos e repetições, com auxílio de microscópio de luz,
1770 câmaras de Sedgewick-Rafter e registros de imagens usando o Software LAS EZ.

1771 Os critérios para avaliação da qualidade e padrões morfológicos dos embriões e
1772 larvas nas etapas experimentais baseou-se em estudos prévios de Gadamisk *et al.* (2015)
1773 e Ayerbe *et al.* (2017) com espécies representantes da família Mesodesmatidae.

1774 **Análise Estatística**

1775 Avaliou-se os pressupostos de normalidade e homocedasticidade com os testes de
1776 Shapiro-Wilk e Levene respectivamente para todos os dados da 2ª etapa experimental.
1777 Estes dados foram comparados mediante uma ANOVA de medidas repetidas no tempo
1778 (altura, comprimento e mortalidade) e ANOVA simples ou testes t, referente aos dias que
1779 só foi possível comparar dois tratamentos (validos apenas para altura e comprimento).

1780 Para mortalidade, os dados foram transformados da forma $x_t = \arcseno \sqrt{x\%/100}$ onde x_t
 1781 e $x\%$ são os dados transformados e em porcentagens de mortalidade, respetivamente.

1782 Em todos os casos que aplicou-se uma ANOVA, utilizou-se a análise de pos-hoc
 1783 de Tukey para estabelecer as diferencias entre cada tratamento. Todas as análises
 1784 estabelecendo uma probabilidade de significância de 0,05.

1785 RESULTADOS

1786 Desenvolvimento Embrionário

1787 Através de análises descritivas observou-se as metamorfoses dos embriões de *A.*
 1788 *mactroides* para larvas véligers D, sob o efeito de diferentes temperaturas (médias °C ±
 1789 DP) que manteve-se em: 18,2 ± 0,4; 20,2 ± 0,6; 23,2 ± 0,3 e 26,1 ± 0,7 respectivamente,
 1790 descritos na **Tabela 1**. Finalizando esta etapa em um tempo aproximado de 28 horas,
 1791 com salinidades da água do mar mantidas à 35ppt em todos os tratamentos.

1792 **Tabela 1.** Descrição do desenvolvimento embrionário da espécie *Amarilladesma*
 1793 *mactroides* em diferentes temperaturas: 18, 20, 23 e 26 °C (± DP) com duração
 1794 aproximada de 28 horas. Salinidade da água durante o período experimental, 35 ppt.
 1795 Número médio de indivíduos por tratamento = 10.

Estágio	Tempo para atingir o estágio (minutos/horas)			
	Temperaturas (°C)			
	18,2±0,4	20,2±0,6	23,2±0,3	26,1±0,7
1° corpúsculo polar	44min	35min	19min	17min
2° corpúsculo polar	54min	41min	34 min	37min
1ª divisão celular	-	1h 09min	-	57min
2ª divisão celular	1h 45min	-	1h 15min	1h 10min
4 células	1h 57min	1h42min	1h 42min	1h 34min
Múltiplas divisões	2h 22min	2h 20min	2h 20 min	2h 18min
Células redondas e ativas	8h 41min	8h 41min	8h 41min	8h 41min
Metamorfose para Trocófora	20h 49 min	17h 18min	14h 18min	11h 18min
Trocófora	24h30min	20h 49min	17h 18min	14h 18min
Larvas D	27h 53min	24h 30min	20h 49min	20h 49min

1796

1797 O aparecimento de células com o 1° corpúsculo polar foi relatado em 17, 19, 35 e
 1798 45 minutos referente aos tratamentos de 26, 23, 20 e 18°C respectivamente. Este padrão

1799 de velocidade nas transformações, mais rápidas em temperaturas elevadas e mais lentas
1800 em temperaturas mais baixas, observou-se até o final desta etapa experimental (**Tabela**
1801 **1**). Aos 37 minutos (26°C) mais de 50 % das amostras encontrava-se com o 2° corpúsculo
1802 polar desenvolvido; 34 minutos (23°C) poucas células já possuíam esta característica,
1803 enquanto que em 41 minutos (20°C) iniciava-se este processo de transformação; e apenas
1804 em 54 minutos (18°C) que foi observado o 2° corpúsculo polar. Entre o período de tempo
1805 de 57 minutos e 1h e 45 minutos aconteceram as mudanças de 1ª e 2ª divisão celular em
1806 todos tratamentos (**Tabela 1**).

1807 Nas amostras entre 1h e 34 minutos e 1h e 57 minutos, as células de todos os
1808 tratamentos apresentavam 4 ou mais divisões, no entanto em temperatura (18°C) a
1809 presença de 4 divisões ainda era mais perceptível. Entre as amostras de 2h e 18 minutos
1810 e as de 8h e 41 minutos foi o período de sucessivas divisões celulares até o início das
1811 metamorfoses para larvas trocófocas, que tiveram início de fato, as 11h e 18 minutos, 14h
1812 e 18 minutos, 17h e 18 minutos e 20h e 49 minutos nas temperaturas de 26°C, 23°C, 20°C
1813 e 18°C respectivamente (**Tabela 1**).

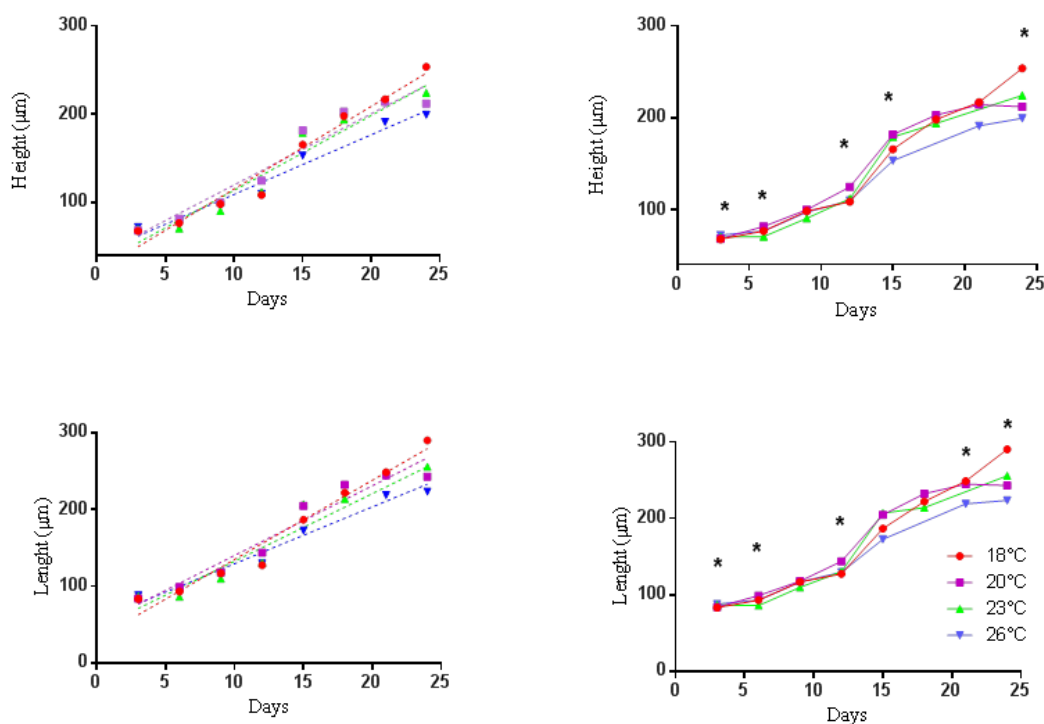
1814 Larvas trocofóras estavam presentes em 14h e 18 minutos, 17h e 18 minutos, 20h
1815 e 49 minutos e 24h e 30 minutos nos tratamentos de 26, 23, 20 e 18°C respectivamente.
1816 E larvas D em 20h e 49 minutos nos tratamentos de 26 e 23°C, enquanto que apenas em
1817 24h e 30 minutos nos tratamentos de 23°C, e finalmente foram observadas as primeiras
1818 larvas D em 27h e 53 minutos nos tratamentos de 18°C (**Tabela 1**). Não foi observado
1819 defeitos morfológicos em nenhum tratamento.

1820 **Crescimento larval e sobrevivência**

1821 O desenvolvimento larval manteve-se nas diferentes temperaturas (médias °C ±
1822 DP): 18,4 ± 0,6; 20,7 ± 0,5; 22,7 ± 0,4; 25,6 ± 0,4, com salinidades da água do mar

1823 mantidas à 35 ppt em todos os tratamentos. Esta etapa finalizou-se em 24 dias, com larvas
 1824 metamorfoseadas em sementes, apresentando características para o assentamento.

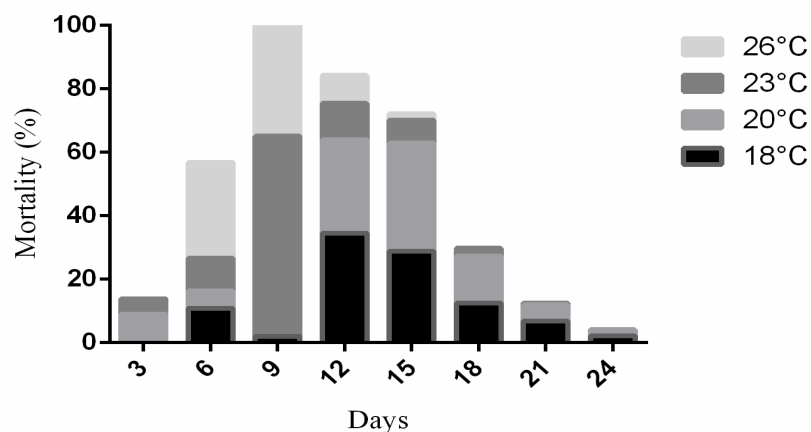
1825 Não houve diferenças em altura e comprimento das larvas entre os tratamentos 18
 1826 e 20 ° C, porém, ambos apresentaram diferenças quando comparados com as larvas
 1827 mantidas no tratamento 26 ° C (**Figura 1**). Padrão observado ao longo do experimento.
 1828 No entanto, na primeira amostragem (3° dia experimental), as larvas de todos os
 1829 tratamentos apresentaram características semelhantes: motilidade, movimentos do véllum
 1830 ativos e alimentadas.



1831 **Figura 1.** Médias de altura e comprimento de conchas de larvas de *Amarilladesma*
 1832 *mactroides*, submetidos a diferentes temperaturas (18, 20, 23 e 26 °C), durante o período
 1833 experimental de 24 dias. Imagens à esquerda representam análise de regressão da altura
 1834 e comprimento (ANOVA de duas vias). Enquanto que as imagens da direita indicam o
 1835 crescimento das larvas, em que (*) expressa diferenças biométricas significativas entre os
 1836 tratamentos 18 e 20 ° C comparados com o tratamento 26 ° C.

1837 Na amostragem coletada no 6° dia experimental, todos os tratamentos continham
 1838 larvas D em transição para larvas umbonadas, com os tratamentos 23 e 26 ° C em estágio
 1839 mais avançado (observação pessoal). Posteriormente (9° dia experimental), todas os

1840 tratamentos já possuíam larvas umbonadas, com dobramentos branquiais bem
 1841 desenvolvidos internamente. Porém, com o ápice de mortalidades nas larvas mantidas em
 1842 23 e 26 °C. Estatisticamente houve maior mortalidade nos tratamentos 23 e 26 °C quanto
 1843 comparados com os de 18 e 20 °C (**Figura 2**).



1844

1845 **Figura 2.** Taxa de mortalidade (%) das larvas de *Amarilladesma mactroides* expostas a
 1846 diferentes temperaturas: 18, 20, 23 e 26 °C em laboratório, com duração de 24 dias de
 1847 larvicultura.

1848

1849 O padrão de mortalidade seguiu-se no 12º e 15º dias experimentais, com maiores
 1850 mortalidades em temperaturas elevadas (23 e 26 °C) (**Figura 2**), sendo evidenciado várias
 1851 conchas vazias (de todos os tamanhos), acúmulo de microalgas e o surgimento de
 1852 protozoários nestes tratamentos. No entanto, nos tratamentos de 18 e 20 °C, as larvas
 1853 mantiveram-se bem ativas e alimentadas. No 18º dia experimental, a mortalidade
 1854 intensificou nos tratamentos 23 e 26 °C, porém as poucas larvas amostradas,
 1855 apresentaram-se bem ativas e desenvolvidas, mas sem o pé bem definido. Fato não
 1856 observado nos outros tratamentos. O surgimento de protozoários no tratamento 20 °C,
 1857 caracterizaram as amostras do 21º dia experimental (**Figura 1**).

1858 O experimento finalizou no 24° dia experimental, com apenas os tratamentos de
1859 18, 20 e 23 °C apresentando larvas com perda do vélu m e pés definidos, prontas para
1860 assentar. Porém apenas os tratamentos 18 e 20 °C apresentaram sobrevivência
1861 significativas comparada aos demais tratamentos (**Figura 2**). As maiores médias finais
1862 de altura e comprimento de conchas (\pm DP) chegaram a: $253,7 \pm 11 \mu\text{m}$ e $290,2 \pm 13 \mu\text{m}$
1863 respectivamente, no tratamento 18° C (**Figura 1**).

1864

DISCUSSÃO

1865 Os resultados deste estudo, demonstraram que a variável de temperatura teve
1866 influência direta no desenvolvimento embrionário, larval e sobrevivência da espécie *A.*
1867 *mactroides* em laboratório.

1868 Os embriões conseguiram alcançar a fase de larva D em todas as temperaturas
1869 testadas (18 - 26°C), no entanto, nas temperaturas mais elevadas (23 e 26 °C) a
1870 metamorfose aconteceu de forma mais acelerada (20h e 49 minutos), quando comparados
1871 com temperaturas mais baixas 20 °C (24h e 30 minutos) e 18 °C (27h e 53minutos).
1872 Sugerindo que mesmo esta variável afetando estes estágios iniciais ontogênicos, os
1873 embriões da espécie *A. mactroides* comprovam uma adaptação para completar esta etapa
1874 do desenvolvimento, nestas condições.

1875 Estes resultados foram diferentes dos relatados por Gadomski *et al.* (2015),
1876 quando submeteram embriões de *P. ventricosa* a 3 diferentes temperaturas (12, 16 e 20
1877 °C). Observando que ocorreu a metamorfose mais rápida para larvas D nas temperaturas
1878 mais frias (12 e 16 °C), com duração de 22 horas, quando comparadas com a temperatura
1879 mais elevada (20 °C), com duração de 37 horas. Em outros representantes desta família,
1880 o tempo de metamorfose em função da temperatura podem variar, como é o caso das
1881 espécies *P. subtriangulata*, que leva de 24 - 48 horas em 20 °C (Redfearn, 1987); *P.*

1882 *australis*, de 24 - 36 horas em 22 ± 1 °C (Hooker, 1997); e *M. donacium* de 40 - 45 horas
1883 em 18 ± 1 °C (Ayerbe *et al.*, 2017).

1884 Neste estudo, diferenças significativas foram observadas desde a etapa inicial do
1885 crescimento larval, com um melhor desempenho ao longo do experimento nos
1886 tratamentos de 18, 20 e 23 °C (**Figura 1**). Para Gadomski *et al.* (2015) é difícil fazer
1887 comparações diretas entre espécies, devido as variações de temperaturas e condições
1888 experimentais diferentes estabelecidas. Contudo, alguns estudos demonstram que existe
1889 um padrão, no qual o aumento de temperatura afeta inicialmente de forma positiva no
1890 crescimento das larvas de bivalves, como: *Crassostrea gigas* (Rico – Villa *et al.*, 2008),
1891 *Mytilus galloprovincialis* (Lazo & Pita, 2011) e o molusco de areia *P. ventricosa*
1892 (Gadomski *et al.*, 2015).

1893 Apesar do padrão de crescimento larval inicial, a partir do 9º dia experimental
1894 (**Figura 1**), as larvas submetidas a temperatura mais elevada (26 °C), começaram a sofrer
1895 diminuição na taxa de crescimento. Fato observado também nas espécies *Pinctada*
1896 *margaritifera* (L.) (Doroudi *et al.*, 1999) e *Crassostrea iredalei* (Peng *et al.*, 2016). No
1897 geral, a elevação da temperatura influencia diretamente no aumento da atividade
1898 metabólica, afetando na assimilação de alimentos (Rico -Villa *et al.*, 2009) e atuando
1899 como regulador energético dos organismos (Kheder *et al.*, 2010). Desta forma, até certo
1900 ponto o aumento da temperatura é benéfico, resultando no rápido crescimento larval,
1901 metamorfoses e sobrevivência. Porém, quando esta relação é saturada pode-se tornar
1902 prejudicial as larvas dos bivalves (Doroudi *et al.*, 1999; Huo *et al.*, 2017), sendo
1903 necessário ocorrer o aumento do consumo de microalgas para manter o balanço
1904 energético (Heasman *et al.*, 1996).

1905 Neste contexto, também observou-se uma rápida mortalidade das larvas mantidas
1906 a 23 e 26 °C (a partir do 9º dia experimental), e com uma maior sobrevivência nos

1907 tratamentos de 18 e 20 °C (**Figura 2**). Segundo Douroundi *et al.* (1999), este tipo de
1908 comportamento é geralmente aceito, no qual baixas temperaturas podem ser ideais para
1909 sobrevivências larvais, mas não necessariamente relacionada ao crescimento. E isto pode
1910 ser considerado inviável em uma possível escala comercial, que vise uma grande
1911 produção em pouco tempo (Rico - Villa *et al.*, 2009). Contudo essas informações
1912 possibilitam entender também, que no ambiente natural as larvas possam se desenvolver
1913 mais lentamente dependendo das condições de temperatura ambientais. Por exemplo,
1914 Gadomski *et al.* (2015) com *P. ventricosa*, observaram que temperaturas mais baixas não
1915 causaram alterações morfológicas, apenas um retardo no desenvolvimento. Para Manoj
1916 & Appukuttan (2003), a menor capacidade das larvas de bivalves se desenvolverem em
1917 baixas temperaturas (menor metabolismo) está relacionada a dificuldade de digerirem
1918 microalgas mesmo que disponíveis. Entretanto, o presente estudo demonstrou contrapor
1919 estas informações. Apesar dos tratamentos 18, 20 e 23 °C terem alcançado um bom
1920 crescimento, apenas nos tratamentos 18 e 20 °C (todas as repetições) que foram
1921 observadas larvas pedvéligers com boas médias de tamanhos e sobrevivência, no final do
1922 período experimental (**Figura 1; Figura 2**).

1923 Outro fator importante referente a maior porcentagem de mortalidade em
1924 temperaturas elevadas, pode estar relaciona ao manejo. O manejo de larviculturas (em
1925 sistema estático) adotados no LMM envolve a separação de larvas por peneiras, mantendo
1926 principalmente as larvas com melhores qualidades (observação pessoal). No presente
1927 estudo, o material biológico (microalgas e larvas, vivas e mortas) foram peneiradas e
1928 lavadas. No entanto, havia o retorno completo para as unidades experimentais. Esse tipo
1929 de procedimento juntamente com temperaturas elevadas, podem acarretar o acúmulo de
1930 metabólitos larvais e degradação do fitoplâncton, proporcionando a proliferação de
1931 patógenos e conseqüentemente mortalidade. Esse tipo de problema já foi relatado por

1932 Helm & Millican (1977) com *C. gigas*, mostrando que as microalgas eram afetadas em
1933 temperaturas altas, tornando o meio de cultivo repleto de detritos e com excessivas
1934 florações bacterianas. Rico - Villa *et al.* (2009), sanaram esse tipo de problema, ao testar
1935 diferentes dietas e temperaturas no desenvolvimento larval de *C. gigas*, adotando um
1936 sistema de fluxo de água contínuo, que foi capaz de evitar assim a deposição de
1937 microalgas durante o período experimental, não alterando a qualidade de água
1938 independente das variações experimentais adotadas.

1939

CONCLUSÃO

1940 Sendo assim, embriões da espécie *A. mactroides* demonstraram tolerar e se
1941 adaptar a uma variação ampla de temperatura (18 - 26°C) adotadas neste experimento,
1942 com rápidas metamorfoses para larvas D nas temperaturas mais elevadas (23 e 26 °C).
1943 Contudo, no desenvolvimento larval, o crescimento máximo de concha e sobrevivência
1944 foi melhor entre as faixas de temperaturas baixas (18 e 20 °C) no período de 24 dias, o
1945 que nos levou a considerar, no presente estudo, tais temperaturas favoráveis para
1946 desenvolvimento da larvicultura desta espécie em laboratório.

1947

AGRADECIMENTOS

1948 Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
1949 Nível Superior) pelo apoio financeiro. L.A. Romano é um pesquisador do CNPq
1950 brasileiro (301245 / 2016-9).

1951

REFERÊNCIAS

1952 AYERBE, R., ZEVALLOS, S., CASTAÑEDA, V., LOPE, F., BENDITA, H. & SANZ,
1953 Y. 2017. Manual para el cultivo de la macha *Mesodesma donacium* (LAMARCK,
1954 1818) en la región Moquega. Instituto del Mar del Perú, Callao, 24pp.

- 1955 BARBER, B.J. & BLAKE, N.J. 1991. Reproductive physiology. *Scallops: biology,*
1956 *ecology and aquaculture*, 21, 377-409.
- 1957 BERGONCI, P.E.A. & THOMÉ, J.W. 2008. Vertical distribution, segregation by size
1958 and recruitment of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* Deshayes, 1854
1959 (Mollusca, Bivalvia, Mesodesmatidae) in exposed sandy beaches of the Rio
1960 Grande do Sul state, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(2): 297-305.
1961 <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842008000200010>.
- 1962 CALABRESE, A. & DAVIS, H.C. 1970. Tolerances and requirements of embryos and
1963 larvae of bivalve molluscs. *Helgoländer Wissenschaftliche*
1964 *Meeresuntersuchungen*, 20 (1), 553-564. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01609928>.
- 1965 CARVALHO, Y.B.M., POERSCH, L.H. & ROMANO, L.A. 2013a. Rickettsia
1966 associated mortality of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia:
1967 Mesodesmatidae) in southern Brazil. *Malacologia*, 56 (1-2): 301-3017.
1968 <http://dx.doi.org/10.4002/040.056.0217>.
- 1969 CARVALHO, Y.B.M, POERSCH, L.H., JUNIOR, J.P. & ROMANO, L.A. 2013b.
1970 Histopathological survey of the yellow clam *Amarilladesma mactroides* from
1971 southern Brazil. *Bull. Eur. Ass. Fish Patho Bulletin- European Association of Fish*
1972 *Pathologists*, 33(2): 53-58.
- 1973 CASAS, S. M., FILGUEIRA, R., LAVAUD, R., COMEAU, L. A., LA PEYRE, M. K.
1974 & LA PEYRE, J. F. 2018. Combined effects of temperature and salinity on the
1975 physiology of two geographically-distant eastern oyster populations. *Journal of*
1976 *Experimental Marine Biology and Ecology*, 506, 82-90.
1977 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.06.001>.
- 1978 DOROUDI, M.S., SOUTHGATE, P.C. & MAYER, R.J. 1999. The combined effects of
1979 temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster,

- 1980 *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture Research*, 30(4): 271-277.
- 1981 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00324.x>.
- 1982 GADOMISK, K., MOLLER, H., BEENTJES, M. & LAMRE, M. 2015. Embryonic and
1983 larval development of the New Zealand bivalve *Paphies ventricosa* Gray, 1843
1984 (Veneroida: Mesodesmatidae) at a range of temperatures. *Journal of Molluscan
1985 Studies*, 81 (3): 356–364. <http://dx.doi:10.1093/mollus/eyv001>.
- 1986 GIREESH, R. & GOPINATHAN, C.P. 2004. Effect of salinity and pH on the larval
1987 development and spat production of *Paphia malabarica*. *Journal of the Marine
1988 Biological Association of India*, 46(2): 146-153.
- 1989 GOSLING, E. 2015. Reproduction, settlement and recruitment. In: *Marine bivalve
1990 molluscs*. John Wiley & Sons. Ltd., Oxford, Chap. 5: 157-202.
- 1991 HEASMAN, M.P., O'CONNOR, W.A., & FRAZER, A.W. 1996. Ontogenetic changes
1992 in optimal rearing temperatures for the commercial scallop, *Pecten fumatus*
1993 Reeve. *Journal of Shellfish Research*, 15(3), 627-634.
- 1994 HELM, M.M., BOURNE, N. & LOVATELLI, A. 2004. Hatchery culture of bivalves: a
1995 practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. N° 471, Rome, FAO.
- 1996 HELM, M. M. & MILLICAN, P. F. 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific
1997 oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 11(1): 1-12.
1998 [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90149-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90149-1).
- 1999 HERRMANN, M., ALFAYA, J.E., LEPORE, M.L., PENCHASZADEH, P. E., ARNTZ
2000 & W. E. 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam
2001 *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy,
2002 temperate beach in northern Argentina. *Helgoland Marine Research*, 65(3), 285-
2003 297. <http://10.1007/s10152-010-0222-3>.

- 2004 HERMANN, M, ALFAYA, J.E.F, LEPORE, M.L, PENCHASZADEH, P.E &
2005 LAUDIEN, J. 2009. Reproductive cycle and gonad development of the Northern
2006 Argentinean *Amarilladesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Helgoland*
2007 *Marine Research*, 63:207–218. [http:// 10.1007/s10152-009-0150-2](http://10.1007/s10152-009-0150-2).
- 2008 HOOKER, S.H. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand pipi
2009 *Paphies australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Bulletin of marine science*, 61(2):
2010 225-240.
- 2011 HUO Z. M., GUAN H. W., RBBANI M. G., XIAO Y. X., ZHANG X. K., FAN C. &
2012 YAN X. W. 2017. Effects of environmental factors on growth, survival, and
2013 metamorphosis of geoduck clam (*Panopea japonica* A. Adams, 1850) larvae.
2014 *Aquaculture reports*, 8 (2017): 31–38. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.001)
2015 [10.1016/j.aqrep.2017.09.001](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.001).
- 2016 KHEDER, R.B., MOAL, J. & ROBERT, R. 2010. Impact of temperature on larval
2017 development and evolution of physiological indices in *Crassostrea*
2018 *gigas*. *Aquaculture*, 309(1-4): 286 -
2019 289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.005>.
- 2020 LAZO, C. S. & PITA, I. M. 201). Effect of temperature on survival, growth and
2021 development of *Mytilus galloprovincialis* larvae. *Aquaculture Research*, 43(8):
2022 1127-1133. <https://doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02916.x>.
- 2023 MADRONES-LADJA, J.A. 2002. Salinity effect on the embryonic development, larval
2024 growth and survival at metamorphosis of *Placuna placenta* Linnaeus (1758).
2025 *Aquaculture*, 214 (1-4): 411-418. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00401-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5)
2026 [5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00401-5).
- 2027 MANOJ NAIR, R. & APPUKUTTAN, K.K. 2003. Effect of temperature on the
2028 development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis*

- 2029 (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 34(12): 1037-1045.
2030 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00906.x>.
- 2031 MCLACHLAN, A. 2018. Fisheries. In: McLachlan, A., and Defeo, O. The Ecology of
2032 Sandy Shores. Academic Press, Chap. 14: 331-372.
2033 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809467-9.00014-X>.
- 2034 MELO, E. M. C., GOMES, C. H. A. M., SILVA, F. C., SÜHNEL, S., MELO, C. M. R.
2035 D. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea*
2036 *gigas* (Thunberg, 1793). *Boletim do Instituto de Pesca*, 414, 889-98.
- 2037 ORTEGA, L., CASTILLA, J.C., ESPINO, M., YAMASHIRO, C. & DEFEO, O. 2012.
2038 Effects of fishing, market price, and climate on two South American clam species.
2039 *Marine Ecology Progress Series*, 469, 71–85. <https://doi.org/10.3354/meps10016>.
- 2040 PENG, T.C., VENGATESEN, T. & HWAI, A.T.S. 2016. Assessment of Temperature
2041 Effects on Early Larval Development Survival of Hatchery-reared Tropical
2042 Oyster, *Crassostrea iredalei*. *Tropical life sciences research*, 27(supp1): 111-116.
2043 <http://dx.doi.org/10.21315/tlsr2016.27.3.15>.
- 2044 REDFEARN, P. 1982. Larval shell development of the toheroa, *Paphies ventricosa* (Gray
2045 1843) (Mactracea: Mesodesmatidae). *New Zealand Journal of Marine and*
2046 *Freshwater Research*, 16 (3-4): 241–252.
2047 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1982.9515967>.
- 2048 REDFEARN, P. 1987. Larval shell development of the northern tuatua, *Paphies*
2049 *subtriangulata* (Bivalvia, Mesodesmatidae). *New Zealand Journal of Marine and*
2050 *Freshwater Research*, 21(1): 65-70,
2051 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1987.9516201>.
- 2052 RICO-VILLA, B., WOERTHER, P., MINGANT, C., LEPIVER, D., POUVREAU, S.,
2053 HAMON, M. & ROBERT, R. 2008. A flow-through rearing system for

- 2054 ecophysiological studies of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*,
2055 282 (1-4): 54-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.016>.
- 2056 RICO-VILLA, B., POUVREAU, S. & ROBERT, R. 2009. Influence of food density and
2057 temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae,
2058 *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 287(3-4) 395-01.
2059 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.054>.
- 2060 RIOS, E.C. 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio Grande.
2061 368p.
- 2062 SANTOS, J. J. S., CARVALHO, Y. B., LOPES, D. L. D. A. & ROMANO, L. A. 2016.
2063 Immunological profile of the yellow clam *Amarilladesma mactroides*
2064 (Mesodesmatidae) from the southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal*
2065 *of aquatic animal health*, 28 (1): 11-20.
2066 <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2015.1116471>.
- 2067 TURINI, C. S., SÜHNEL, S., LAGREZE-SQUELLA, F. J., FERREIRA, J. F. & MELO,
2068 C. M. R. D. 2014. Effects of stocking-density in flow-through system on the
2069 mussel *Perna perna* larval survival. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 36(3):
2070 247-252. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v36i3.236>.
- 2071
- 2072
- 2073
- 2074
- 2075
- 2076
- 2077
- 2078
- 2079
- 2080

2081 **Capítulo 4.**

2082

2083

2084

2085

2086

2087

2088

2089

2090

2091 **Efeitos de diferentes dietas com microalgas vivas, no crescimento e sobrevivência**
2092 **de sementes do marisco branco *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) em**
2093 **laboratório**

2094

2095

2096

2097

2098 **Artigo formatado para submissão na revista: Aquaculture**

2099

2100

2101 **Observação:** Durante a transcrição para esta tese as figuras e tabelas foram colocadas no
2102 corpo do texto para uma melhor compreensão.

2103

2104

2105

2106

2107

2108

2109

2110 **Resumo**

2111 Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes proporções, quantidades e concentrações
2112 de três microalgas vivas, consolidadas na aquicultura como fonte de alimentação:
2113 *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) (Iso); *Chaetoceros muelleri* (Cm) e *Tetraselmis suecica*
2114 (Ts), no crescimento e sobrevivência de sementes do marisco branco *Amarilladesma*
2115 *mactroides*, em laboratório. O 1^a experimento consistiu em ofertar estas dietas de forma
2116 monoalgal e bialgal, durante 28 dias. Os maiores crescimentos e ganho de peso foram
2117 obtidos com as dietas monoalgais: Iso e Cm e a bialgal Iso/Cm. Os tratamentos bialgais:
2118 Cm/Ts e Iso/Ts apresentaram valores intermediários, enquanto que dieta monoalgal de
2119 Ts (diferentes concentrações), assim como, o tratamento sem alimento (S/A)
2120 apresentaram resultados inferiores. Não houveram diferenças significativas, nesta etapa,
2121 na sobrevivência das sementes. No segundo experimento utilizou-se as duas microalgas
2122 que apresentaram maior resultado no estudo anterior. Portanto, Iso e Cm foram testadas
2123 de forma bialgal nas proporções 30/70, 50/50 e 70/30 e porcentagens 3, 6 e 10 %, no
2124 período experimental de 21 dias. Não houveram diferenças significativas nas médias de
2125 altura, comprimento e sobrevivência das sementes de marisco branco. Sendo assim, este
2126 estudo constatou que dietas compostas por *I. galbana* e *C. muelleri* ofertadas de forma
2127 isolada ou misturadas entre si (diversas proporções) são favoráveis ao crescimento
2128 positivo e sobrevivência das sementes de *A. mactroides* em laboratório.

2129 **Palavras-chave:** nutrição de moluscos, bivalve, Mesodesmatidae, hatchery, surf clam

2130

2131

2132

2133 1. Introdução

2134 O marisco branco, *Amarilladesma mactroides*, é uma espécie nativa que pode ser
2135 encontrada no Brasil, Uruguai e na Argentina (Rios, 1994), com o centro de distribuição
2136 geográfica localizado no litoral sul do Rio Grande do Sul, Brasil (Fiori & Defeo, 2006).
2137 Estes animais há décadas são alvo de estudos, devido sua importância como recurso
2138 pesqueiro (Coscarón, 1959) e alimentação humana (Bastida *et al.*, 1991), sendo um
2139 representante da família Mesodesmatidae considerado promissor para aquicultura.

2140 Em razão da importância socioeconômica desta espécie para várias regiões da
2141 costa Oeste do Sul do Oceano Atlântico, estudos estão sendo desenvolvidos direcionados
2142 para produção em laboratório. Informações referentes ao efeito de variáveis ambientais
2143 como salinidade e temperatura no desenvolvimento embrionário e larval, avaliando
2144 crescimento e sobrevivência tem sido avaliada por Santos *et al.* (dados não publicados).

2145 A manutenção de bivalves envolve sua nutrição, de forma que garanta suas
2146 necessidades durante as diferentes etapas de vida. Neste contexto, a produção de
2147 microalgas é uma das atividades mais importantes em laboratórios de produção de
2148 moluscos, pois são as principais fontes de alimento para: condicionamento de
2149 reprodutores (Pronker *et al.*, 2008; González-Araya *et al.*, 2012), desenvolvimento de
2150 larvas e sementes (Helm *et al.*, 2004). Estima-se que os custos de 30 a 50% da produção
2151 total de sementes é direcionada para produção de microalgas (Albentosa *et al.*, 1996;
2152 Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007). Logo, a dieta ofertada deve proporcionar o
2153 desenvolvimento dos bivalves em uma escala de tempo que reduza os custos e viabilize
2154 a produção de formas jovens em laboratório (Rivero- Rodríguez *et al.*, 2007).

2155 Estudos específicos sobre qualidade nutricional de microalgas e sua interferência
2156 durante o cultivo de sementes de moluscos em laboratório, das espécies de areia:
2157 *Venerupis pullastra* (Albentosa *et al.*, 1993); *Ruditapes decussatus* (Albentosa *et al.*,

2158 1996); e *Panopea generosa* (Ren *et al.*, 2015) foram realizados com sucesso. Desta forma,
2159 dietas que obtiveram sucesso para outros bivalves vêm auxiliar com informações
2160 alimentares de moluscos com carência de dados de sua manutenção em laboratório (Viet
2161 Le *et al.*, 2014), independente das necessidades específicas nutricionais da espécie
2162 trabalhada (Albentosa *et al.*, 1996; Pettersen *et al.*, 2010). No caso do marisco branco, *A.*
2163 *mactroides*, as informações sobre o efeito do valor nutricional das espécies de microalgas
2164 no crescimento e sobrevivência de sementes em laboratório, são inexistentes.

2165 Para formas adultas e jovens de bivalves é essencial a diversificação de microalgas
2166 na alimentação como mecanismo compensatório dos limites nutricionais que apresenta
2167 cada espécie fornecida de maneira isolada (Ren *et al.*, 2015). Desta forma, nutrientes
2168 como carboidratos (White *et al.*, 1989) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA)
2169 encontrados em diferentes concentrações (Langdon & Waldock, 1981), aumentam a
2170 capacidade de suprir as necessidades dos organismos (Utting & Millican., 1997;
2171 Ronquillo *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2015).

2172 Devido à dificuldade que os bivalves possuem na síntese de PUFA's (Knauer &
2173 Southgate, 1999), estes nutrientes demandam uma atenção especial na dieta. Dentre os
2174 PUFA's destacam-se os ácidos graxos essenciais: eicosapentaenóico (EPA), araquidônico
2175 (ARA) e docosaheptaenóico (DHA) (Ronquillo *et al.*, 2012), que podem ser encontrados
2176 em microalgas diatomáceas, com níveis elevados de EPA, assim como, em microalgas
2177 flageladas que destacam-se pelos níveis elevados de DHA (Dalsgaard *et al.*, 2003). Fato
2178 este, que justifica o uso comum dos gêneros *Isochrysis* (Prymnesiophyta); *Chaetoceros*
2179 (Diatomeae); e *Tetraselmis* (Chlorophyta) para cultivo de bivalves (Coutteau & Sorgeloos
2180 1992; Lavens & Sorgeloos, 1996; Helm *et al.*, 2004).

2181 Todavia o efeito nutricional das microalgas variam de acordo estágio de vida dos
2182 bivalves, em que as combinações de dietas em suas concentrações ótimas podem

2183 promover um bom crescimento e alta taxa de sobrevivência em laboratório (Helm *et al.*,
2184 2004; Ronquillo *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016), Rodriguez *et al.*, 2007)

2185 Desta forma, o objetivo do presente estudo foi determinar o efeito de dietas mono
2186 e bialgal em diferentes proporções, quantidades e concentrações, durante o cultivo de
2187 sementes da espécie *A. mactroides* em laboratório, usando como parâmetro métodos que
2188 avaliam o: crescimento, peso total, peso seco e sobrevivência.

2189 **2. Material e Métodos**

2190 **2.1. Sementes**

2191 As sementes utilizadas neste experimento foram produzidas a partir de
2192 reprodutores de *A. mactroides* coletados no Rio Grande do Sul, Brasil (2°3'10"S
2193 51°59'26"O) e condicionados no Laboratório de Moluscos Marinhos, da Universidade
2194 Federal de Santa Catarina, Brasil (LMM – UFSC), local onde foram realizados todos os
2195 experimentos.

2196 Utilizou-se espécimes de marisco branco (proporção 1:1, machos e fêmeas) para
2197 realização da desova pela técnica de “strip” (Helm *et al.*, 2004). Os gametas femininos e
2198 masculinos foram utilizados para uma fertilização controlada na proporção de
2199 aproximadamente 1:7 (Melo *et al.*, 2015). Após a fertilização alocou-se os embriões em
2200 um tanque de 17.000L com média de temperatura (\pm DP) de $23,0 \pm 1,1$ °C e salinidade
2201 de 35 ppt. A larvicultura foi concluída quando as larvas estavam prontas para assentar.

2202 A partir do 16° dia, as larvas pedivéligeras ficaram retidas em peneiras com malhas
2203 de 200 μ m e foram transferidas para 9 cilindros de PVC com 200mm de diâmetro,
2204 possuindo malhas de 180 μ m no fundo, de forma que possibilitasse a passagem da água e
2205 retenção de 150g de areia (autoclavada), em um tanque de fibra de 500L (100L de água
2206 do mar). Nesta etapa utilizou-se aproximadamente 75.600 larvas.cilindro⁻¹, em sistema

2207 de “airlift” para circulação por “downwelling” de forma que a água com alimento
2208 recirculasse com um volume total de 1400L, com fluxo de 300 ± 40 L/h. Neste sistema,
2209 tanto a água do mar quanto o alimento ofertado foram trocados diariamente (100%). A
2210 água do mar foi filtrada ($1 \mu\text{m}$) e esterilizada (UV), com salinidade (\pm DP) de 35 ± 1 ppt
2211 e temperatura ambiente (\pm DP) de 24 ± 1 °C. As microalgas utilizadas foram compostas
2212 por *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros mulleri* (1:1) na concentração inicial de 10 e, ao
2213 final, 15×10^4 células.mL⁻¹. Após 90 dias (pós assentamento), os animais foram retirados
2214 dos cilindros e selecionados por tamanho e transferidos para as unidades experimentais.

2215 **2.2. Condições experimentais**

2216 O estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro, selecionando-se
2217 aleatoriamente 190 sementes retidas em peneiras com malha de 1,5 mm, no qual 100
2218 destas serviram para obtenção das médias biométricas iniciais (\pm DP) de: $2,29 \pm 0,2$ mm
2219 e $3,14 \pm 0,3$ mm de altura e comprimento de conchas respectivamente. As 90 sementes
2220 restantes, foram separadas em grupos com 30 indivíduos para análise do peso vivo total
2221 (PVT) e peso seco, com médias totais (\pm DP) de $0,1219 (\pm 0,0072)$ g, $0,0693 (\pm 0,0004)$
2222 g respectivamente. Esses valores médios foram usados para calcular a quantidade de
2223 microalgas ofertadas nos diferentes tratamentos. Esta experimento utilizou baldes de
2224 plástico de 5 L (3,5 L de água do mar 35 ppt) contendo 150 g de areia no fundo, com
2225 aeração constante, divididos em oito tratamentos (com três repetições). Foram testadas
2226 dietas monoalgal, bialgal e um tratamento sem alimentação (*item 2.4*). Após determinar
2227 a média de peso inicial, alocou-se 30 animais por tratamento. O período experimental
2228 desta etapa foi de quatro semanas.

2229 O segundo experimento foi desenvolvido a partir dos resultados do primeiro.
2230 Repetiu-se a análise inicial (*1ª etapa*), com dimensões médias (\pm DP) de 100 sementes
2231 de: $4,37 \pm 0,4$ mm e $6,33 \pm 0,6$ mm de altura e comprimento de conchas respectivamente;

2232 e médias totais (\pm DP) do PVT e peso seco das 90 sementes restante, de: $1,0178 \pm 0,0234g$
2233 e $0,6701 \pm 0,0437g$, respectivamente.

2234 Para esta etapa foram necessárias adaptações estruturais, mediante ao volume e
2235 biomassa de microalgas adotados ao longo do período experimental, fazendo-se uso de
2236 recipientes retangulares com volume de 500mL (dimensões de 142 x 98 x 47mm),
2237 contendo 150g de areia no fundo, os quais foram alocados em baldes maiores de 20L e
2238 ou tanques de 40L (dependendo do volume adotado, *item 2.4*). Oito tratamentos
2239 (triplicata), com dietas bialgal foram realizados, todos com 30 animais por tratamento. O
2240 período experimental desta etapa foi de três semanas.

2241 **2.3 Manejo e sobrevivência**

2242 A renovação de água dos tratamentos foi realizada diariamente (100%), com
2243 avaliação de temperatura (termômetro) e salinidade (refratômetro) antes e depois dos
2244 manejos, com médias (\pm DP) de $23,0 \pm 1,2$ °C e $36,0 \pm 0,8$ ppt (*1ª etapa*); e $21,1 \pm 0,1$
2245 °C e $36,9 \pm 0,8$ ppt (segundo experimento) durante o período experimental.
2246 Semanalmente realizou-se pesagem das sementes de cada unidade experimental dos
2247 tratamentos (balança de precisão 0,0001g) e analisou-se a mortalidade. A partir destas
2248 informações houve o ajuste da biomassa de microalga ofertada compensando com volume
2249 de água adicionada, mantendo constante a concentração inicial de alimento para cada
2250 tratamento. No final de cada etapa experimental, imagens das sementes foram registradas
2251 usando o Software LAS EZ com auxílio da lupa (Leica, LAS EZ4HD, GER) e obteve-se
2252 o PVT das sementes. Em seguida foram colocadas em uma estufa (60 °C) por 24 horas
2253 obtendo assim, o peso seco (segundo experimento).

2254 **2.4 Dietas**

2255 As três espécies de microalgas vivas utilizadas neste estudo, foram: *Isochrysis* aff.
 2256 *galbana* (T-ISO) (Iso), *Chaetoceros muelleri* (Cm) e *Tetraselmis suecica* (Ts), seguindo
 2257 as seguintes composições e estruturas gerais (**Tabela 1**).

2258 **Tabela 1.** Microalgas utilizadas no experimento. Medidas de comprimento e largura (μm)
 2259 descritos por Nell & O'Connor (1991). Medidas de peso seco, proteínas, lipídeos e
 2260 carboidratos (pg.célula^{-1}) descritos por Brown (1991).

Espécies	Tamanho (μm)		Peso seco	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos
	Comprimento	Largura				
<i>C. muelleri</i>	$7,4 \pm 1,2$	$5,4 \pm 1,1$	74,8	9,0	5,2	2,0
<i>I. galbana</i>	$8,5 \pm 1,6$	$5,4 \pm 1,1$	29,7	6,8	29,7	1,8
<i>T. suecica</i>	$9,7 \pm 1,4$	$7,1 \pm 0,9$	168,2	52,1	16,8	20,2

2261

2262 Estas microalgas foram cultivadas no LMM em sistema semi-contínuo, utilizando
 2263 o meio F/2 (Guillard, 1975), modificado com adição de sílica (para diatomáceas), e
 2264 coletadas na fase exponencial de crescimento. Avaliou-se o efeito das microalgas
 2265 selecionadas, nas sementes de *A. mactroides* em duas etapas experimentais (**Tabela 2**).

2266 **Tabela 2.** Diferentes proporções, porcentagens e volumes de microalgas utilizadas para
 2267 as etapas experimentais de sementes de *Amarilladesma mactroides*.

1° Experimento (Mono e bialgal)			2° Experimento (Bialgal)		
Tratamentos			Tratamentos		
1	100 Iso (3%)		1	30 Iso (0,9%)	70 Cm (2,1%)
2	100 Cm (3%);		2	50 Iso (1,5%)	50 Cm (1,5%)
3	100 Ts (3%)		3	70 Iso (2,1%)	30 Cm (0,9%)
4	50 Cm (1,5%)	50 Ts (1,5%)	4	30 Iso (1,8%)	70 Cm (4,2%)
5	50 Iso (1,5%)	50 Ts (1,5%)	5	50 Iso (3%)	50 Cm (3%)
6	50 Iso (1,5%)	50 Cm (1,5%)	6	70 Iso (4,2%)	30 Cm (1,8%)
7	100 Ts (6%)		7	30 Iso (3%)	70 Cm (7%) (13L)
8	S/A		8	30 Iso (3%)	70 Cm (7%) (18L)

2268 Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO); Cm: *Chaetoceros muelleri*; Ts: *Tetraselmis suecica*;
 2269 S/A: sem fornecimento de microalgas.

2270 As porcentagens adotadas no presente estudo (3, 6, 10 e 200 %) são referentes a
2271 porcentagem do PVT em peso de microalga seca (item 2.5). Enquanto que 13 e 18L na
2272 segunda etapa experimental, são os volumes iniciais adotados nos tratamentos 7 e 8, para
2273 compreender a quantidade superior sem modificar a concentração de microalga ofertada
2274 (10%).

2275 **2.5 Quantificação do alimento**

2276 Para determinar a quantidade de alimento a ser oferecida para as sementes de *A.*
2277 *mactroides*, seguiu-se a metodologia proposta por Ronquillo *et al.* (2012). Em que, a
2278 partir do PVT das sementes de cada unidade experimental, porcentagens destes pesos (3,
2279 6, 10 e 200%) foram divididas pelo peso seco das microalgas descritas por Brown (1991)
2280 (**Tabela 1**), obtendo desta forma o número de células algais necessárias para dieta das
2281 etapas experimentais. Posteriormente calculou-se, o volume no qual continha este número
2282 de células a ser ofertado, baseando-se na contagem diária da microalga específica
2283 desejada.

2284 **2.6. Estatística**

2285 Para a aplicação da estatística testou-se os pressupostos de normalidade e
2286 homecedasticidade pelos métodos de Shapiro-Wilk e Levene respectivamente. No caso
2287 das regressões lineares, também testou-se a independência dos dados pelo método de
2288 Durbin-Watson. Com o fim de estabelecer as diferenças entre os tratamentos para altura
2289 e comprimento, realizou-se análises de ANOVA de uma via e testes pos-hoc de Tukey,
2290 utilizando o software Past®. Da mesma maneira para estabelecer as diferenças entre
2291 tratamentos na variável de peso dos animais, através do tempo experimental, realizou-se
2292 análises de medidas repetidas no tempo, junto com o teste pos-hoc de Tukey no programa
2293 Statgraphics XVI ®. Teste de Kruskal-Wallis com pos-hoc de Dunn também foram

2294 utilizados para encontrar as diferenças do peso final no primeiro experimento. Por fim,
2295 para os dados de sobrevivência realizou-se uma ANOVA de uma via junto como teste
2296 pos-hoc de Tukey para o primeiro experimento assim como, uma análise de Kruskal-
2297 Wallis com pos-hoc de Dunn para o segundo experimento. Sempre depois de serem
2298 transformados os dados percentuais com a formula $y = \arcseno * \sqrt{y\%/100}$.

2299 3. Resultados

2300 No final da primeira etapa experimental, as sementes de marisco branco
2301 alimentadas com as dietas monoalgais (Iso e Cm), assim como, a biagal (Iso/Cm),
2302 apresentaram as maiores médias (\pm DP) de altura e comprimento (Iso: $2,77 \pm 0,2\text{mm}$ e
2303 $3,72 \pm 2,9\text{mm}$; Cm: $2,86\text{mm}$ e $3,78 \pm 2,9\text{mm}$; Iso/Cm: $2,96 \pm 0,3\text{mm}$ e $4,07 \pm 1,0\text{mm}$);
2304 seguidos de valores intermediários nas dietas: Cm/Ts ($2,52 \pm 0,1\text{mm}$ e $3,38 \pm 2,5\text{mm}$) e
2305 Iso/Ts ($2,42 \pm 0,1\text{mm}$ e $3,27 \pm 0,4\text{mm}$); e por fim, apresentando os menores resultados
2306 quando alimentadas com as dietas de Ts nas diferentes concentrações ($2,33\text{mm}$ e $3,18 \pm$
2307 $2,4\text{mm}$; $2,31 \pm 0,1\text{mm}$ e $3,21 \pm 0,2\text{mm}$) e o tratamento sem alimento (S/A: $2,14\text{mm}$ e
2308 $2,97\text{mm}$) (**Tabela 3**). Este mesmo padrão de crescimento pode ser observado com as
2309 médias finais de PVT, em que as dietas monoalgais de Iso ($0,2178 \pm 0,0736\text{g}$) e Cm
2310 ($0,2363 \pm 0,0083\text{g}$), bem como a dieta bialgal de Iso/Cm ($0,3335 \pm 0,1451\text{g}$) apontam os
2311 maiores resultados (**Figura 1**). Diferenças significativas encontradas entre os tratamentos
2312 para PVT, foram iguais as diferenças significativas apresentadas em altura (**Tabela 3**).
2313 As taxas de mortalidade, entre os oito tratamentos desta etapa, variaram entre $3,3 \pm 3,4$ e
2314 $45 \pm 54,2$ %, porém, não apresentaram diferenças significativas (**Tabela 3**).

2315 No final da 2ª etapa experimental (baseado nas melhores dietas da etapa anterior),
2316 os tratamentos com dietas bialgais (Iso/Cm) em diferentes proporções, concentrações e
2317 volumes, não apresentaram diferenças significativas nas médias de altura e comprimento
2318 de conchas, assim como nas médias de mortalidades das sementes de *A. mactroides*

2319 (Tabela 3). Fato observado também nas médias de peso total e peso seco (Figura 2), no
2320 período experimental de 21 dias.

2321 4. Discussão

2322 No primeiro experimento, juvenis de *A. mactroides* apresentaram maior
2323 crescimento e peso, quando alimentados com *I. aff. galbana* e *C. muelleri* separadamente
2324 e combinadas; valores intermediários com dietas combinadas por *I. aff. galbana*/*T.*
2325 *suecica* e *C. muelleri*/*T. suecica*; e valores inferiores quando alimentados com *T. suecica*
2326 em diferentes concentrações, e sem alimentação (S/A) (Tabela 3). Em relação à
2327 sobrevivência, não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

2328 Vários fatores podem contribuir com o valor nutricional das microalgas ofertadas
2329 durante a dieta, como: tamanho, forma, digestibilidade, composição bioquímica, toxinas,
2330 enzimas e os requisitos alimentares específicos do animal (Hemaiswarya *et al.*,2011;
2331 Yang *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2015). Formas juvenis de bivalves possuem uma ingestão
2332 seletiva de certas espécies de microalgas (Ward & Shumway, 2004). Neste contexto, o
2333 tamanho celular e forma de *T. suecica*, comparados com de *I. galbana* e *C. muelleri*
2334 (Tabela 1) pode ser um ponto inicial para compreender o desempenho inferior das
2335 sementes de marisco branco alimentadas com esta microalga na primeira etapa
2336 experimental, visto que, não possui informações específicas referente a este fator para *A.*
2337 *mactroides*. Contudo, mesmo com estas dimensões *T.suecica* mostrou-se a melhor dieta
2338 para sementes de *Ruditapes decussatus* quando comparadas com *I. galbana*, clone T-ISO
2339 e *Phaeodactylum tricornutum* (Albentosa *et al.*,1996), sendo desconsiderado o efeito do
2340 tamanho desta microalga, tendo em vista apenas o benefício do alto teor de carboidrato
2341 (97,1 pg.célula⁻¹) presente em sua composição. Valor este, diferente do encontrado por
2342 Brown (1991) (Tabela 1).

2343

2344

2345

2346

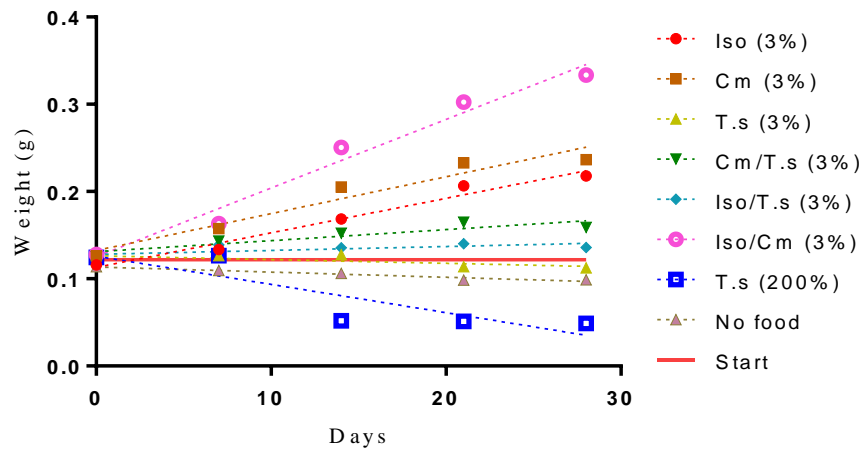
Tabela 3. Médias (\pm desvio padrão) de altura (A) e comprimento (C) de conchas e mortalidade (M%) de sementes de *Amarilladesma mactroides*, alimentado com diferentes dietas de microalgas, ao final de cada etapa experimental.

1ª etapa experimental				2ª etapa experimental			
Dia 28				Dia 21			
Dietas	A (mm)	C (mm)	M (%)	Proporção Iso/Cm	A (mm)	C (mm)	M (%)
Iso/Cm (3%)	2,96 \pm 0,3 ^a	4,07 \pm 1,0 ^a	3,3 \pm 3,4	30/70 (3%)	6,20 \pm 0,1	9,23 \pm 0,1	3,3 \pm 3,4
Cm (3%)	2,86 \pm 0,1 ^a	3,78 \pm 2,9 ^{ab}	6,7 \pm 2,0	50/50 (3%)	6,25 \pm 0,4	9,41 \pm 0,7	1,1 \pm 1,2
Iso (3%)	2,77 \pm 0,2 ^a	3,72 \pm 2,9 ^{ab}	13,3 \pm 12,0	70/30 (3%)	6,52 \pm 0,3	9,96 \pm 0,5	0
Cm/Ts (3%)	2,52 \pm 0,1 ^{abc}	3,38 \pm 2,5 ^{abc}	4,4 \pm 7,7	30/70 (6%)	6,26 \pm 0,7	9,33 \pm 1,0	0
Iso/Ts (3%)	2,42 \pm 0,1 ^{ab}	3,27 \pm 0,4 ^{abc}	12,2 \pm 6,9	50/50 (6%)	6,89 \pm 0,3	10,57 \pm 0,5	0
Ts (3%)	2,38 \pm 0,1 ^{bc}	3,18 \pm 2,4 ^{bc}	17,7 \pm 7,7	70/30 (6%)	6,87 \pm 0,2	10,65 \pm 0,3	0
Ts (200%)	2,31 \pm 0,1 ^c	3,21 \pm 0,2 ^{bc}	45,0 \pm 54,2	30/70 (10%)/13L	6,44 \pm 0,3	9,69 \pm 0,4	0
S/A	2,14 \pm 0,1 ^c	2,97 \pm 0,1 ^c	13,3 \pm 1,5	30/70 (10%)/18L	6,23 \pm 0,7	9,56 \pm 1,2	3,3 \pm 5,8

2347

2348

Letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO); Cm: *Chaetoceros muelleri*; Ts: *Tetraselmis suecica*; S/A: sem fornecimento de microalgas.



2349

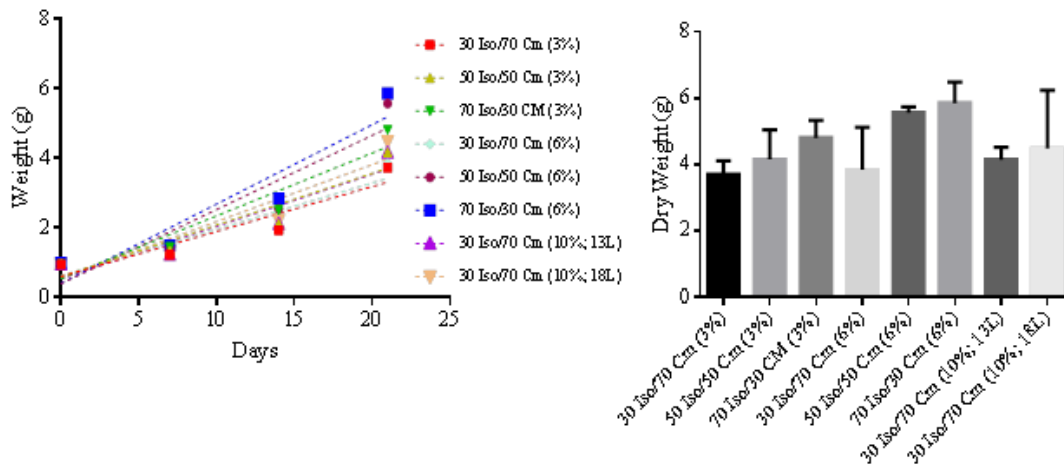
2350 **Figura 1.** Médias de peso vivo total (g) de sementes de *Amarilladesma mactroides*
 2351 alimentadas com diferentes dietas, durante 28 dias. Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO);
 2352 Cm: *Chaetoceros muelleri*; Ts: *Tetraselmis suecica*; S/A: sem fornecimento de
 2353 microalgas.

2354

2355

2356

2357



2358

2359 **Figura 2.** Médias de peso vivo total (g) e peso seco (g) de sementes de *Amarilladesma*
 2360 *mactroides* alimentadas com dietas bialgais em diferentes proporções, concentrações e
 2361 volumes, no período experimental de 21 dias. Iso: *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) e Cm:
 2362 *Chaetoceros muelleri*.

2363

2364

2365 No entanto outros estudos apresentaram resultados distintos, como Epifanio
2366 (1979), com sementes de *Crassostrea virginica* e *Mercenaria mercenaria*, Romberger &
2367 Epifanio (1981), sementes de *C. virginica* e Albentosa *et al.* (1993), com sementes do
2368 molusco de areia *Venerupis pullastra*, no qual, obtiveram com *T. suecica* os menores
2369 desempenhos (de peso e tamanho) dentre as dietas testadas em seus respectivos
2370 experimentos. Estes estudos, no geral, atribuem tais deficiências nas dificuldades das
2371 taxas de ingestão e digestão desta microalga.

2372 Epifanio (1979) relaciona a menor digestibilidade de *T. suecica* à estrutura celular
2373 externa rígida, que retarda ou impede a absorção dos nutrientes desta microalga. Este
2374 processo é intensificado quando a concentração do alimento fornecido é maior. Nestas
2375 condições, o estômago atinge a atividade máxima de suporte (podendo obstruir a
2376 passagem de alimento) e, conseqüentemente, gera maiores quantidades de alimentos
2377 parcialmente digeridos. Embora no presente estudo não tenha sido realizado estudos
2378 específicos, e.g. histologia de brânquias ou taxa de ingestão, esta explanação pode
2379 explicar os resultados desta etapa experimental, assim como, o menor desenvolvimento
2380 das sementes submetidas às diferentes concentrações desta dieta (**Tabela 3; Figura 1**).

2381 Em contrapartida, quando *T. suecica* foi ofertada de forma bialgal (Ts/Iso; Ts/Cm)
2382 demonstraram um crescimento moderado em comparação a ela ofertada isoladamente
2383 (**Tabela 3**). Isto pode ser resultado da menor quantidade desta microalga (Ts) combinada
2384 às microalgas que apresentaram maiores resultados de crescimento e peso, quando
2385 ofertadas sozinhas (Iso/Cm). A hipótese de Romberger & Epifanio (1981) é que a
2386 combinação de uma microalga facilmente digerível com uma indigesta pode resultar em
2387 uma digestão mais eficaz. Enquanto que Albentosa *et al.* (1993) afirmam que geralmente
2388 bivalves alimentados em dietas constituídas por mais de uma espécie de microalgas,
2389 podem obter micronutrientes adicionais, complementando a dieta e conseqüentemente

2390 promovendo um crescimento mais acelerado quando comparados com animais
2391 alimentados com uma única espécie na dieta.

2392 Epifanio (1979) classificou a combinação de duas microalgas na dieta em “não-
2393 aditiva”, quando o efeito do crescimento das sementes, não é igual ao previsto pela
2394 combinação das mesmas; e “sinérgico”, quanto a resposta do crescimento com a mistura
2395 de dietas, for maior que o produzido isoladamente. Dito isto, no presente estudo as dietas
2396 bialgais com Ts, ainda assim, apresentaram efeitos não-aditivos enquanto que as dietas
2397 bialgais de Iso e Cm pode-se dizer que apresentaram efeito sinérgico.

2398 Dietas compostas por *I. galbana* e *C. muelleri* são comumente usadas em
2399 hatcherys de bivalves (Helm *et al.*, 2004). Ambas possuem características peculiares em
2400 sua composição, e.g. *I. galbana* (flagelada) maior teor de lipídeos já a *C. muelleri*
2401 (diatomácea) maior teor de proteínas (Brown, 1991) (**Tabela 3**). Entretanto, a composição
2402 química bruta destas dietas (individualmente e ou misturadas entre si, neste estudo) não
2403 explica o alto desempenho de crescimento e peso, quando comparadas com as
2404 composições de *T. suecica*, que em teoria (pelo balanço de nutrientes) também teria
2405 requisitos nutricionais para suprir as necessidades dos animais (**Tabela 3**).

2406 Na segundo experimento, testaram-se combinações com as microalgas que
2407 apresentaram melhores resultados da 1ª etapa, *I. galbana* e *C. muelleri* (**Tabela 2**), em
2408 sementes com médias iniciais (\pm DP) de altura e comprimento $4,37 \pm 0,4$ mm e $6,33 \pm$
2409 $0,6$ mm e médias (\pm DP) do PVT e peso seco de $1,0178 \pm 0,0234$ g e $0,6701 \pm 0,0437$ g,
2410 respectivamente. No entanto as diferentes proporções, quantidades e concentrações de *I.*
2411 *galbana* e *C. muelleri* não apresentaram diferenças estatísticas no crescimento, peso e
2412 sobrevivência de sementes de *A. mactroides* (**Tabela 3; Figura 2**). Estes resultados são
2413 semelhantes aos encontrado por Ren *et al.* (2015) com *P. generosa*, demonstrando que

2414 existe uma flexibilidade na escolha das concentrações destas dietas (Iso/Cm) em
2415 laboratório, mesmo não descartando a importância de outros fatores nutricionais.

2416 Isto sugere que o fator que contribui para as diferenças observadas no crescimento
2417 do marisco branco pode ser a presença ou ausência de outros componentes presentes na
2418 dieta. Neste sentido, apesar da escolha da dieta baseada na composição bioquímica bruta
2419 ser importante, a mesma muitas vezes não responde o efeito de alguns fatores, como:
2420 nutrientes específicos e digestibilidade (Epifânio, 1979; Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007),
2421 tornando-se relevante quando outros níveis de nutrientes essenciais são considerados
2422 (Brown, 1991).

2423 Segundo Ren *et al.* (2015), a digestibilidade dos componentes nutricionais
2424 presentes na microalga depende (em parte) da atividade enzimática específica do
2425 organismo. Ou seja, uma possível explicação do efeito positivo das dietas compostas por
2426 *I. galbana* e *C. muelleri*, ofertadas isoladas e combinadas, pode ser porque estes alimentos
2427 tenham desencadeado uma atividade e ou produção enzimática específica, o que resultou
2428 em um aproveitamento nutricional adequado para sementes de marisco branco. Outro fato
2429 importante, a ser mencionado, é que o marisco branco possui o estilete cristalino bem
2430 desenvolvido (característico de moluscos de areia), que é responsável por realizar a
2431 digestão enzimática e digestão mecânica de alguns alimentos para serem absorvidos no
2432 estômago (Kristensen, 1972). Neste estudo a ação desta estrutura, ou não, foi efetiva (para
2433 *T.suecica*) ou a digestão desta microalga pelo estilete foi insuficiente para completar os
2434 requisitos nutricionais de forma satisfatória ao animal.

2435 Epifanio (1979) não conseguiu explicar o crescimento de *C. virginica* e *M.*
2436 *mercenaria* apenas com dados brutos da dieta. Contudo, Knuckey *et al.* (2002)
2437 demonstraram que proteínas provenientes de diatomáceas refletiram em um bom
2438 crescimento para sementes de *C. gigas*; Albentosa *et al.* (1996), como já mencionado,

2439 relacionaram o crescimento ótimo ao teor de carboidrato presente na dieta (*T. suecica*)
2440 para *R. decussatus*; enquanto que Enright *et al.* (1986), provaram que *Chaetoceros* spp.
2441 está entre as melhores dietas para *Ostrea edulis*, devido seus níveis de carboidratos e
2442 ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's) essenciais.

2443 Apesar da importância de todos estes componentes nutricionais mencionados
2444 (proteínas, carboidratos e ácidos graxos), os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) são
2445 classificados como fundamentais para a maior parte dos animais marinhos (Dustan *et al.*,
2446 1994). Possuindo sua síntese limitada em bivalves, sendo adquiridos principalmente por
2447 ingestão de alimentos (Knauer & Southgate, 1999). Langdon & Waldock (1981), apontam
2448 a disponibilidade e equilíbrio dos ácidos graxos, como um dos principais componentes
2449 para o efeito sinérgico das dietas. Dentre os PUFA's destacam-se os ácidos graxos
2450 essenciais: docosahexaenóico (DHA), araquidônico (ARA) e eicosapentaenóico (EPA)
2451 (Ronquillo *et al.*, 2012).

2452 As microalgas flageladas possuem níveis elevados de DHA, enquanto que as
2453 diatomáceas têm de EPA (Dalsgaard *et al.*, 2003). Estes elementos exercem um papel
2454 crítico (estrutura de membrana, energia e crescimento) na fisiologia de bivalves (Ren *et*
2455 *al.*, 2015). Fato importante, já que a biossíntese destes ácidos graxos, assim como seus
2456 precursores não foram demonstrados em *A. mactroides* (De Moreno *et al.*, 1976).

2457 O presente estudo não teve a intenção de estudar as exigências de PUFA's para
2458 sementes de *A. mactroides*, porém a correlação entre esses conteúdos poderia facilitar a
2459 compreensão do bom desempenho de *I. galbana* e *C. muelleri* isoladamente ou em
2460 combinação bialgal. Por exemplo, Langdon & Waldock (1981) relacionaram a deficiência
2461 de EPA e DHA nas microalgas como fator limitante para o crescimento de *C. gigas*;
2462 Enright *et al.* (1986) relataram que as necessidades nutricionais de DHA e EPA são mais
2463 altas para juvenis de *O. edulis*; Rivero-Rodríguez *et al.* (2007) observaram que a dieta

2464 que apresentou maior crescimento para sementes de *C. corteziensis* foi a composta por *C.*
2465 *calcitrans*, espécie rica em ARA. Além de perceberem que as sementes alimentadas com
2466 esta alga apresentaram apenas 9 % de DHA em seus tecidos, enquanto que as alimentadas
2467 com *I. galbana* 33%, concentração que não resultou no maior crescimento, levando a
2468 acreditar que esta espécie possui um limite de absorção ótimo para esses nutrientes; Ren
2469 *et al*, (2015) com *Panopea generosa*, observaram que a dieta bialgal fornecida de *I.*
2470 *galbana* (rica em DHA e pobre em EPA) com *T. suecica* (rica em EPA), resultou em um
2471 crescimento sinérgico maior que a dieta ofertada isolada. Fato não visto quando
2472 combinado *C. muelleri* e *T.suecica* (ambas com níveis baixos de DHA), no qual resultou
2473 no menor crescimento do que dieta de *C. muelleri* ofertada sozinha.

2474 Neste contexto, estas informações também servem de pressuposto para estudos
2475 nutricionais da dieta do marisco branco no ambiente. Odebrecht *et al.* (2010) fizeram um
2476 levantamento de variabilidade interanual de fitoplâncton na praia do Cassino – RS, local
2477 no qual o marisco branco é endêmico, no período de 1992 – 2007, e encontraram seis
2478 grupos, com maior abundância da diatomácea *Asterionellopsis glacialis*. Através destas
2479 análises, observaram a diminuição ou desaparecimento do fitoplâncton vinculados à
2480 fenômenos climáticos (El Niño e ação dos ventos), ação antrópica e fenômenos incomuns,
2481 recorrentes, de deposição de lama que acometem o litoral. Isto pode vir a ser informação
2482 complementar para compreender o sucesso ou fracasso reprodutivo do marisco branco
2483 nestas regiões, baseados na presença ou ausência de microalgas capazes de suprir seus
2484 requisitos nutricionais.

2485 **5. Conclusão**

2486 Dietas compostas por *I. galbana* e *C. muelleri* ofertadas de forma isolada ou
2487 misturadas entre si (em diversas concentrações), são benéficas ao crescimento e
2488 sobrevivência das sementes de *A. mactroides*. Contudo, mais pesquisas devem ser

2489 realizadas para examinar composições bioquímicas das espécies de microalgas, além de
2490 estudos de perfis enzimáticos, determinando assim, quais os componentes nutricionais
2491 são mais importantes para potencializar o crescimento desta espécie em laboratório.

2492 **Agradecimentos**

2493 Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
2494 Nível Superior) pelo apoio financeiro. L.A. Romano é um pesquisador do **CNPq**
2495 brasileiro (301245 / 2016-9).

2496 **Referências**

2497 Albentosa, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., 1996.
2498 Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using
2499 physiological and biochemical parameters. *Aquaculture* 148 (1): 11-23.
2500 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01405-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01405-6).

2501 Albentosa, M., Perez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R., Fernández-Reiriz, M.
2502 J. 1993. Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Mar. Ecol. Prog.*
2503 *Ser.*, 97: 261-269. <https://doi.org/10.3354/meps09726>.

2504 Bastida RO, Roux A, Bremec C, Gerpe M, Sorensen M., 1991. Estructura
2505 poblacional de la almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*) durante el verano de 1989
2506 en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Frente Marit.* 9(A): 83–92.

2507 Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of
2508 microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145(1), 79-99.
2509 [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90007-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90007-J).

2510 Coscarón, S. 1959. La almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*, Deshayes) de
2511 la costa de la Provincia de Buenos Aires. *Agro. Publ. Tec.* v. 1, n. 3, p. 1-66.

2512 Coutteau, P., & Sorgeloos, P.,1992. The use of algal substitutes and the
2513 requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an
2514 international survey. *J. Shellfish Res.*, 11(2): 467-476.

2515 Dalsgaard, J., John, M.S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty
2516 acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol.*, 46: 225-340.
2517 [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(03\)46005-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(03)46005-7).

2518 Epifanio, C.E., 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or
2519 more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)
2520 and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*, 18(1): 1-12.
2521 [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90095-4).

2522 Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S., Castell, J.D., 1986. Evaluation of
2523 phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96(1): 1-13.
2524 [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90009-2).

2525 Fiori, S., Defeo, O., 2006. Biogeographic patterns in life-history traits of the
2526 yellow clam, *Amarilladesma mactroides*, in sandy beaches of South America. *J. Coast.*
2527 *Res.*, 22(4):872-880. <https://doi.org/10.2112/04-0409.1>.

2528 González-Araya, R., Lebrun, L., Quéré, C., Robert, R., 2012. The selection of an
2529 ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part B). *Aquaculture*, 362: 55-
2530 66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.029>.

2531 Guillard, R.R.L. 1975. Cultures of phytoplankton for feeding marine
2532 invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. *Culture of marine invertebrates*
2533 *animals*. New York: Plenum Publishing Corporation. p.29-60.

2534 Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves: a
2535 practical manual. *FAO Fisheries Technical Paper*. N° 471, Rome, FAO.

- 2536 Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R.R., Ganesan, V., Anbazhagan, C. 2011.
2537 Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol.*
2538 *Biotechnol.*, 27(8): 1737-1746. <http://10.1007/s11274-010-0632-z>.
- 2539 Knauer, J., & Southgate, P. C., 1999. A review of the nutritional requirements of
2540 bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture.
2541 *Rev. Fish. Sci.*, 7(3-4): 241-280. <https://doi.org/10.1080/10641269908951362>.
- 2542 Knuckey, R.M., Brown, M.R., Barrett, S.M., Hallegraeff, G.M., 2002. Isolation
2543 of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific
2544 oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 211(1-4): 253-274.
2545 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00010-8).
- 2546 Kristensen, J.H., 1972. Structure and function of crystalline styles of
2547 bivalves. *Ophelia*, 10(1): 91-108. <https://doi.org/10.1080/00785326.1972.10430106>.
- 2548 Langdon, C., Waldock, M.J., 1981. The effect of algal and artificial diets on the
2549 growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.*
2550 *K.*, 61(2), 431-448. <https://doi.org/10.1017/S0025315400047056>.
- 2551 Lavens P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food
2552 for aquaculture. *FAO Fish Tech Pap*, 361:7-42.
- 2553 Melo, E.M.C., Gomes, C.H.A.M., Silva, F.C., Sühnel, S., Melo, C.M.R.D., 2015.
2554 Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg,
2555 1793). *Bol. Inst. Pesca*, 414, 889-98.
- 2556 Nell, J.A., O'Connor, W.A., 1991. The evaluation of fresh algae and stored algal
2557 concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale
2558 & Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99 (3-4): 277-284. [https://doi.org/10.1016/0044-](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90248-6)
2559 [8486\(91\)90248-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90248-6).

- 2560 Odebrecht, C., Bergesch, M., Rörig, L.R., Abreu, P.C., 2010. Phytoplankton
2561 interannual variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992-2007), with emphasis on
2562 the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuar. Coast.*, 33 (2): 570-583.
2563 <https://doi.org/10.1007/S12237-009-9176-6>.
- 2564 Oliveira, B.I., Rodrigues, S.N.S., Lavander, H., Lima, P., Olivera-Gálvez, A.,
2565 2016. Growth and survival of *Anomalocardia brasiliiana* larvae (Bivalvia: Veneridae) fed
2566 with microalgal diets. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, 44(1): 34-38. [http:// 10.3856/vol44-issue1-](http://10.3856/vol44-issue1-fulltext-3)
2567 [fulltext-3](http://10.3856/vol44-issue1-fulltext-3).
- 2568 Pettersen, A. K., Turchini, G. M., Jahangard, S., Ingram, B. A., Sherman, C. D.,
2569 2010. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty
2570 acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*, 309(1-
2571 4): 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.024>.
- 2572 Pronker, A. E., Nevejan, N. M., Peene, F., Geijssen, P., Sorgeloos, P., 2008.
2573 Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part
2574 I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquacult. Int.*,
2575 16(4): 297-307. [https://doi.org/ 10.1007/s10499-007-9143-9](https://doi.org/10.1007/s10499-007-9143-9).
- 2576 Ren, Y., Liu, W., Pearce, C.M., Forster, I., McKinley, R.S., 2015. Effects of
2577 selected mixed-algal diets on growth and survival of early postset juveniles of the Pacific
2578 geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). *Aquacult. Nutr.*, 21(2):152-161.
2579 [https://doi.org/ 10.1111/anu.12145](https://doi.org/10.1111/anu.12145).
- 2580 Rios, E.C., 1994. Sea shell of Brazil. Rio Grande, Fundação Universidade Rio
2581 Grande. 368p.
- 2582 Rivero-Rodríguez, S., Beaumont, A. R., Lora-Vilchis, M. C., 2007. The effect of
2583 microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of

- 2584 *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*, 263(1-4): 199-210.
2585 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.038>.
- 2586 Romberger, H.P., Epifanio, C.E., 1981. Comparative effects of diets consisting of
2587 one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters,
2588 *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture*, 25(1): 77-87.
2589 [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90101-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(81)90101-0).
- 2590 Ronquillo, J. D., Fraser, J., McConkey, A. J., 2012. Effect of mixed microalgal
2591 diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*)
2592 juveniles. *Aquaculture*, 360: 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.018>.
- 2593 Utting, S. D., Millican, P. F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of
2594 bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability.
2595 *Aquaculture*, 155 (1-4): 45-54. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(97\)00108-7](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(97)00108-7).
- 2596 Viet Le, D., Alfaro, A. C., King, N., 2014. Broodstock conditioning of New
2597 Zealand geoduck (*Panopea zelandica*) within different temperature and feeding ration
2598 regimes. *New. Zeal. J. Mar. Fresh*, 48 (3): 356-370.
2599 <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.2014.918548>.
- 2600 Yang, F., Chen, S., Miao, Z., Sheng, Z., Xu, J., Wan, J., Ran, Z., Zhou, L., Zhou,
2601 H., Zhou, C., Yan, X., 2016. The effect of several microalgae isolated from East China
2602 Sea on growth and survival rate of post set juveniles of razor clam, *Sinonovacula*
2603 *constricta* (Lamarck, 1818). *Aquacult. Nutr.*, 22(4): 846-
2604 856. <https://doi.org/10.1111/anu.12310>.
- 2605 Ward, J. E., Shumway, S. E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle
2606 selection in suspension-and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 300 (1-2),
2607 83-130. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002>.

2608 Whyte, J.N.C., Bourne, N., Hodgson, C.A., 1989. Influence of algal diets on
2609 biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae.
2610 Aquaculture, 78(3-4): 333-347. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90110-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90110-5).

2611

2612

2613

2614

2615

2616

2617

2618

2619

2620

2621

2622

2623

2624

2625

2626

2627

2628

2629

2630

2631

2632

2633 **Considerações Gerais**

2634 Os estudos realizados nos diferentes capítulos desta tese tiveram como objetivo,
2635 contribuir com o desenvolvimento da aquicultura do marisco branco, *Amarilladesma*
2636 *mactroides*, em condições laboratoriais.

2637 Apesar das inúmeras pesquisas referentes a ecologia e biologia desta espécie,
2638 informações sobre sua reprodução em laboratório permaneciam escassas. Neste sentido,
2639 no primeiro capítulo, nós buscamos abordar formas de aclimatar e condicionar
2640 reprodutores retirados do ambiente em laboratório, para posteriormente conhecer os
2641 possíveis “starts” reprodutivos, e conseqüentemente iniciar o acompanhamento dos
2642 estágios de vida iniciais do marisco branco.

2643 Diferentes técnicas, referentes a variação de temperaturas foram adotadas para
2644 realização da desova, no entanto, apenas pela técnica de “*stripping*” obtivemos êxito. Este
2645 resultado levanta hipóteses que mais pesquisas relacionadas as formas de desovas desta
2646 espécie precisam ser esclarecidas, a fim de compreender como o processo reprodutivo
2647 ocorre no ambiente, assim como, evitar o sacrifício de reprodutores para reprodução,
2648 como ocorre com a técnica de “*stripping*”.

2649 Pós desova, de forma inédita, acompanhou-se todas as etapas do desenvolvimento
2650 embrionário e larval de *A. mactroides* em laboratório. Em específico para larvicultura,
2651 adotou-se os métodos padrões de manejo e dietas do LMM, que consiste na utilização de
2652 um sistema estático, com renovação de água 100 % de água do mar, temperatura ambiente
2653 e peneiramento diário das larvas com melhor qualidade para retornar ao sistema, até as
2654 mesmas estiverem aptas para assentar, caracterizando o fim desta etapa.

2655 Este primeiro experimento demonstrou que é possível realizar a larvicultura
2656 completa desta espécie em laboratório, com manejo e alimentação adequada, com
2657 duração de 27 dias, tempo que se enquadra com os demais representantes da família
2658 Mesodesmatidae. Contudo, abriu-se inúmeros questionamentos sobre variáveis que
2659 poderiam influenciar diretamente a velocidade de transformações que ocorrem no
2660 desenvolvimento embrionário e larval de *A. mactroides* em laboratório, e
2661 conseqüentemente aumentar a velocidade de produção.

2662 Neste sentido, o capítulo 2 e 3 foram abordados o efeito da salinidade e
2663 temperatura no desenvolvimento embrionário e sobrevivência no desenvolvimento larval,
2664 respectivamente. Para isto, desenvolvemos uma metodologia experimental para que
2665 pudéssemos acompanhar estas etapas iniciais. As salinidades e temperaturas adotadas
2666 basearam-se em estudos ambientais das regiões que o marisco branco é endêmico.

2667 Desta forma, o efeito das diferentes salinidades e temperaturas no
2668 desenvolvimento embrionário e larval, demonstrados nos capítulos desta tese, foi crucial
2669 no tempo de transformação, formação estrutural e sobrevivência desta espécie.

2670 Contudo, apesar de variáveis ambientais não agirem de forma isoladas no
2671 ambiente natural e em um sistema de produção, estes estudos iniciais possibilitam ter
2672 informações bases para estudos futuros, além de, mostrar níveis de adaptações, tolerância
2673 e o ótimo destas variáveis nestas fases iniciais de vida dos organismos.

2674 No capítulo 4, utilizamos sementes assentadas em laboratório e fizemos testes com
2675 3 diferentes microalgas utilizadas mundialmente na aquicultura de moluscos bivalves, as
2676 espécies *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) (Iso); *Chaetoceros muelleri* (Cm) e *Tetraselmis*
2677 suecica (Ts). Este capítulo foi dividido em dois experimentos e mostrou o efeito de dietas
2678 monoalgais e bialgais no desenvolvimento das sementes de *A. mactroides*. O marisco
2679 branco é uma espécie filtradora, desta forma, a diversificação e efeito das diferentes
2680 microalgas ofertadas no desenvolvimento das sementes (crescimento, ganho de peso e
2681 sobrevivência) é de suma importância em uma escala produtiva, visto que, o custo de
2682 produção de microalgas é oneroso principalmente nesta etapa de desenvolvimento de
2683 bivalves em laboratório. Observamos que as microalgas *I. galbana* e *C. muelleri* ofertadas
2684 de forma isolada ou misturadas entre si (diversas proporções) obtiveram os melhores
2685 resultados, contudo, a dieta bialgal tende a suprir mais as necessidades nutricionais do
2686 marisco branco.

2687 Sendo assim, podemos dizer que foi possível realizar um protocolo básico de
2688 cultivo de *A. mactroides*, finalizando todas as etapas de produção em laboratório como:
2689 aclimação e condicionamento, técnica de desova, descrição do desenvolvimento
2690 embrionário e larval, além de testes destas etapas com diferentes salinidades e
2691 temperaturas, e por fim, análises de diferentes dietas no desenvolvimento de sementes do
2692 marisco branco. Estas informações podem contribuir para futuros programas de
2693 repovoamento do ambiente natural e produção de sementes para fins do cultivo desta
2694 espécie.

2695 **Conclusões Finais**

2696 Demonstrou-se formas de aclimação e condicionamento de reprodutores em
2697 laboratório, em recipientes com areia, temperatura baixa controlada e fluxo de água e
2698 alimentos contínuo, o que pode possibilitar a realização da desova desta espécie em
2699 diferentes épocas do ano;

2700 Realizou-se a desova pela técnica de “stripping”, o que proporcionou o inédito
2701 acompanhamento e descrição do desenvolvimento embrionário e larval desta espécie em
2702 laboratório, concluindo esta primeira larvicultura em 27 dias, sem interferência da
2703 variação de temperatura ambiente em função do tempo no crescimento larval;

2704 Salinidades afetam diretamente o desenvolvimento ontogênico desta espécie, com
2705 embriões e larvas tolerando salinidades entre (25 - 35 ppt), contudo, com o melhor
2706 crescimento e sobrevivência em salinidades elevadas de 35 ppt, considerando esta
2707 salinidade (dentre as analisadas), ótima para larvicultura do marisco branco;

2708 Embriões desta espécie são capazes de tolerar uma variação de 18 a 26 °C de
2709 temperatura. Nesta fase o efeito desta variável é determinante na velocidade de
2710 metamorfose, contudo, sem causar alterações morfológicas. Na fase larval (diante das
2711 condições experimentais adotadas), temperaturas mais baixas (18 e 20 °C) indicam ser as
2712 mais viáveis para o assentamento, com larvas em melhores condições de tamanho e
2713 sobrevivência;

2714 Sementes de marisco branco alimentadas com as dietas compostas por *I. galbana*
2715 e *C. muelleri* ofertadas de forma isolada ou misturadas entre si (diversas proporções),
2716 apresentaram maior crescimento e sobrevivência em laboratório. No entanto, a mistura
2717 de algas possibilita maior segurança em termos de balanço nutricional necessários para
2718 esta espécie em laboratório;

2719 Através dos estudos realizados foi possível desenvolver um protocolo base da
2720 aquicultura de *A. mactroides*, com informações que podem contribuir com estudos
2721 futuros, tanto no intuito de repovoamento do desta espécie em ambiente natural quanto
2722 para produção de sementes para fins do cultivo desta espécie.