

HENRIQUE DAVID LAVANDER

**VIABILIDADE TECNOLÓGICA DA TRIPLOIDIA EM *Anomalocardia brasiliiana*
(BIVALVIA: VENERIDAE) EM ESCALA LABORATORIAL**

RECIFE, PE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

VIABILIDADE TECNOLÓGICA DA TRIPLOIDIA EM *Anomalocardia brasiliana*
(BIVALVIA: VENERIDAE) EM ESCALA LABORATORIAL

Henrique David Lavander

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. MARIA RAQUEL MOURA COIMBRA
Orientadora

Prof. Dr. ALFREDO OLIVERA GÁLVEZ
Co-orientador

Recife,
Fevereiro de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

L395v Lavander, Henrique David
Viabilidade tecnológica da triploidia em *Anomalocardia
brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) em escala laboratorial / Henrique
David Lavander. – 2018.
75 f.

Orientador: Arnaldo José Correia Magalhães Júnior.
Coorientador: Alfredo Olivera Gálvez.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura,
Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Triploidia 2. Malacocultura 3. Moluscos I. Magalhães Júnior,
Arnaldo José Correia, orient. II. Gálvez, Alfredo Olivera, coorient.
III. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

VIABILIDADE TECNOLÓGICA DA TRIPLOIDIA EM *Anomalocardia brasiliiana*
(BIVALVIA: VENERIDAE) EM ESCALA LABORATORIAL

Henrique David Lavander

Tese julgada adequada para obtenção do título de doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Defendida e Aprovada em 23/02/2018 pela seguinte Banca Examinadora.

Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra
Orientadora / PPG - Recursos Pesqueiros e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos
Departamento de Oceanografia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Vilma Loreto da Silva
Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Silvio Ricardo M. Peixoto
PPG - Recursos Pesqueiros e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Luís Otávio Brito da Silva
PPG - Recursos Pesqueiros e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado pai,
Marco Antônio Lavander.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha esposa Carina Mendes e filha Catarina Lavander.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade oferecida e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo consentimento da bolsa. Ao Laboratório de Genética Aplicada pelo acolhimento e apoio durante toda a pesquisa, a minha orientadora Raquel Coimbra por confiar e me orientar nesta etapa. E ao professor Alfredo Gálvez pelas contribuições e por permitir a utilização do Laboratório de Maricultura Sustentável durante o doutorado.

Aos professores Reginaldo de Carvalho (UFRPE) e Marcelo Guerra (UFPE) por contribuírem significativamente com este trabalho e por permitirem a utilização de seus respectivos laboratórios. Ao colega Genialdo Ramos por me auxiliar durante as análises no laboratório de citogenética. Ao professor Gustavo (UFPE) por contribuir com este trabalho durante as análises com citometria de fluxo. Aos professores do Departamento de Pesca e Aquicultura e do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da UFRPE, em especial ao professor José Carlos e a professora Suzianny Cabral pelas importantes contribuições.

Aos colegas dos Laboratórios de Genética Aplicada e de Maricultura Sustentável. Aos estagiários e técnicos do Laboratório de Produção de Alimento Vivo e Laboratório de Maricultura Sustentável, em especial a Emília Carneiro e Luís Otávio. Aos meus amigos e companheiros Leônidas Oliveira e Sérgio Rodrigues, por todo apoio na execução desta pesquisa, assim como Ricardo Oliveira, Leilane Gomes, Fabiana Penalva e Hozana Dantas. Aos colegas de equipe (estagiários) Jonas Gonçalves, Igor Figueiredo e Wilker Fonseca, por contribuírem durante as coletas em Mangue Seco e na produção de microalgas e de juvenis de mariscos no laboratório, em especial à Priscilla Celes.

Aos amigos e colegas de trabalho do Ifes campus Piúma, que me apoiaram e contribuíram para finalização desta etapa, André Batista, Marcelo Polese, Rodrigo Guedes, Leilane Gomes, Lucas Comasseto, Douglas Mattos e Paulo Aride. Assim como os estagiários Sérgio Picone, Higor Julian e Lídia Gava.

E a todos que colaboraram de maneira especial com este trabalho.

Resumo

A poliploidia, por meio da manipulação cromossômica, é uma das ferramentas mais importantes para melhorar o desempenho zootécnico na malacocultura e é responsável pelos maiores avanços nesse setor. Estudos citogenéticos podem fornecer informações essenciais para a manipulação cromossômica direcionada à produção de organismos poliploides. No presente estudo, os momentos pós-fecundação em que os corpos polares são expelidos foram identificados, bem como o número mais frequente de cromossomos em *Anomalocardia brasiliiana*. A indução à triploidia por indução química e física foi avaliada usando-se os indutores Citocalasina B (CB) e 6 -Dimetilaminopurina (6-DMAP), assim como por choque térmico frio e por choque hiposmótico, respectivamente. Os espécimes foram capturados no litoral norte de Pernambuco, região nordeste, na praia de Mangue Seco, e no sul do Espírito Santo, região sudeste, na praia de Piúma, Brasil. Os gametas foram obtidos por indução, as amostras de solução de ovócitos foram tomadas antes e após as fertilizações a cada dois minutos. O material foi fixado em Carnoy, corado em DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole) a 2µg/mL, e fotografado em microscópio de epifluorescência. A indução à triploidia por CB foi realizada a 1 mg. L⁻¹, enquanto que a indução por 6-DMAP foi feita a 450 µmols.L⁻¹. As induções por choque térmico frio foram realizadas a 2, 5 e 7°C, e as por choque hiposmótico realizadas a 12‰ de salinidade. Foram observados 19 bivalentes em 50 ovócitos no estágio de metáfase I. Em 70% dos ovos, a saída do primeiro corpo polar foi detectada aos dez minutos após a fertilização, e em 62% dos ovos o segundo corpo polar foi expelido aos 16 minutos. Estes percentuais foram obtidos a uma temperatura média de 26°C e 35‰ de salinidade. As induções químicas à triploidia apresentaram baixa sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, diferentemente dos tratamentos físicos, que obtiveram mais de 90% de sobrevivência. Os resultados obtidos nesta pesquisa podem auxiliar outros estudos envolvendo a manipulação genética para fins de poliploidia na aquicultura.

Palavras-chave: Triploide, meiose, malacocultura, bivalves.

Abstract

Polyploidy, through chromosome manipulation, is one of the most important tools to improve zootechnical performance in poultry farming and is responsible for the greatest advances in this sector. Cytogenetic studies may provide essential information for chromosome manipulation directed to the production of polyploid organisms. In the present study, the post-fertilization moments in which the polar bodies are expelled were identified, as well as the most frequent number of chromosomes in *Anomalocardia brasiliiana*. Induction to triploidy by chemical and physical induction was evaluated using the inducers Cytochalasin B (CB) and 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), as well as by cold thermal shock and hyposmotic shock, respectively. The specimens were captured on the north coast of Pernambuco, northeast, on the beach of Mangue Seco, and south of Espírito Santo, southeast region, on the beach of Piúma, Brazil. The gametes were obtained by induction, oocyte solution samples were taken before and after fertilizations every two minutes. The material was fixed in Carnoy stained in DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) at $2\mu\text{g} / \text{mL}$, and photographed under an epifluorescence microscope. Induction to triploidy by CB was performed at 1 mg. L^{-1} , whereas induction by 6-DMAP was done at $450 \mu\text{mol.L}^{-1}$. The inductions by cold thermal shock were performed at 2, 5 and 7°C , and by hyposmotic shock performed at 12‰ of salinity. A total of 19 bivalents were observed in 50 oocytes at the metaphase I stage. In 70% of the eggs, the first polar body was detected at ten minutes after fertilization, and in 62% of the eggs the second polar body was expelled at 16 minutes. These percentages were obtained at a mean temperature of 26°C and 35‰ of salinity. The chemical inductions to triploidy presented low larval survival after the first 24 hours, unlike the physical treatments, which obtained more than 90% survival. The results obtained in this research may support other studies involving genetic manipulation for the purpose of polyploidy in aquaculture.

Key words: Triploid, meiosis, malacoculture, bivalves.

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Exemplos de <i>Anomalocardia brasiliensis</i>	14
Figura 2. Distribuição e ocorrência de <i>Anomalocardia brasiliensis</i>	15
Artigo I	
Figura 1. Eggs behavior at different temperatures in the first 25 minutes after fertilization.....	48
Figura 2. Eggs behavior in different salinities in the first 25 minutes after fertilization.....	49
Figura 3. Stages of meiosis in oocytes of <i>A. brasiliensis</i> . Cells in final diplotene stained with DAPI (A and B) showing 19 bivalents and metaphase I stained with CMA/DAPI (C). (D) Seven cells in metaphase I. Arrow shows a single bivalent marked with CMA in early anaphase I.....	50
Figura 4. Polar bodies and first mitosis. (A) Prometaphase II, with first polar body outside cell and spermatid nucleus inside cell (arrow). (B) Anaphase II, with two anaphasic plates on periphery of oocyte and first polar body outside cell. Note spermatid nucleus inside cell (arrow). (C) First and second polar body. (D) Cells with nuclei of male and female gametes in interphase stage, with non-condensed chromatin (arrow on left) and chromosomes in metaphase (arrow on right).....	51
Figura 5. Timing of PB1 and PB2 releases and first mitosis in embryonic development of <i>A. brasiliensis</i> . OO - oocytes; PB 1 – first polar body; PB 2 – second polar body; MT – first mitosis.....	52
Artigo II	
Figura 1. Gametes of <i>Anomalocardia brasiliensis</i> . (A) Em destaque no círculo, a liberação do primeiro corpo polar dez minutos pós-fertilização do ovo e seta indicando material genético masculino. (B) Ovócito com espermatozoides na parte externa em destaque nos círculos, momento antes da fertilização. Imagens obtidas em microscopia de epifluorescência com corante 4'6-diamidino-2-fenylindole (DAPI).....	65
Figura 2. Sobrevivência larval após 24 horas de indução à triploidia. Tratamento químico (CB) citocalasina B; (6-Dmap) 6 dimetilaminopurina (Pernambuco); Tratamento controle (C1e C2) Pernambuco, (C3) Espírito Santo ; Tratamento físico (°C) choque térmico frio (5°C) Pernambuco, (2°C e 7°C) Espírito Santo; Tratamento físico (‰) salinidade (12‰) Pernambuco e Espírito Santo.....	66

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Principais espécies de bivalves induzidos à triploidia no mundo.....	22
Tabela 2. Principais métodos de indução à poliploidia em moluscos bivalves.....	23
Tabela 3. Número de cromossomos dos principais grupos de bivalves.....	24

Artigo II

Tabela 1. Percentual de sobrevivência em ovos de <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	66
--	----

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de figuras	9
Lista de tabelas	10
Introdução.....	12
Revisão de literatura..	14
Objetivos.....	26
Referências bibliográficas	28
Artigo I	42
Introduction	43
Materials and Methods.	43
Results and Discussion	47
References	55
ARTIGO II	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	63
Resultados e Discussão.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
Conclusão.	70
Referências	70
Considerações finais.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1. Introdução

O pescado representa uma valiosa fonte de proteínas para uma nutrição equilibrada e saudável. No mundo, muitos estoques estão sobreexplotados ou se encontram perto dos limites máximos de exploração sustentável. Um dos fatores responsáveis pela diminuição desses recursos é a pesca excessiva em determinadas regiões (FAO, 2016). Outro efeito da captura desordenada é a seleção por tamanho, tornando mais vulneráveis os espécimes maiores (DULVY et al., 2003).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação a aquicultura é uma alternativa viável para redução do esforço de pesca de alguns estoques, suprimindo a demanda por pescado no mundo. Em 2014, a produção mundial de animais aquáticos foi maior que 73 milhões de toneladas e, desse valor, o cultivo de moluscos foi superior a 16 milhões de toneladas (FAO, 2016).

No Brasil, a produção comercial de moluscos está restrita apenas a mexilhões, ostras e vieiras. Em 2014, foram produzidas aproximadamente 22 mil toneladas, destacando-se o Estado de Santa Catarina com 98% da produção nacional, e um único município produziu 65% do total do país (IBGE, 2017). Esse Estado também é considerado o maior produtor de sementes de moluscos provenientes de laboratório (IBGE, 2017).

Os moluscos diploides, aqueles que apresentam dois conjuntos cromossômicos, são os mais frequentes no ambiente natural. Estes herdam um conjunto materno de cromossomos e outro paterno, porém esta condição pode ser alterada através da manipulação cromossômica a fim de melhorar o crescimento (GUO et al. 2009). A poliploidia é uma estratégia adotada pela aquicultura mundial desde a década de 1980 é a utilização de organismos triploides, organismos que apresentam um conjunto a mais de cromossomos, objetivando um crescimento mais rápido no cultivo de bivalves. Nos últimos anos, 20% da produção de ostras da Europa foram compostas por ostras triploides, sendo a França a maior produtora, enquanto nos Estados Unidos este valor chega a 50% (PIFERRER et al., 2009). Segundo Matt e Allen

(2014), atualmente mais de 50% da produção de sementes de ostras no mundo, provenientes de laboratórios, são triploides.

Segundo a União Européia, organismos poliploides não devem ser confundidos com organismos geneticamente modificados (OGMs), uma vez que os primeiros apenas apresentam um conjunto ou mais de cromossomos, do que o número mais frequente encontrado no ambiente natural (PIFERRER et al., 2009), enquanto o segundo termo se aplica a organismos que tiveram a estrutura dos seus genes modificada.

O extinto Ministério Brasileiro da Pesca e Aquicultura autorizou a importação de sêmem de ostras *Crassostrea gigas* tetraploides do Chile para a produção de ostras exóticas triploides. Desde 2012, sementes de moluscos triploides são produzidas no país, no entanto, não há registros do cultivo de bivalves nativos triploides apesar de já existir tecnologia para produção de juvenis de algumas espécies.

Anomalocardia brasiliiana (Gmelin, 1791) é um molusco bivalve pertencente à família Veneridae, que se distribui desde o sul do México e Mar das Antilhas (Guadalupe) até o sul do Brasil (TURGEON et al., 2009). Destaca-se entre os bivalves marinhos do Brasil por ser uma das espécies mais exploradas comercialmente pela pesca artesanal, e considerada um importante recurso pesqueiro para comunidades tradicionais do litoral brasileiro (SILVA-CAVALCANTI e COSTA, 2009; PEZUTTO et al., 2010).

A espécie é mais conhecida por “berbigão”, “vôngole” ou “marisco”, em Pernambuco, onde comunidades pesqueiras, que vivem de sua coleta, perceberam a diminuição do tamanho dos indivíduos (SILVA-CAVALCANTI e COSTA, 2011). Mesmo em áreas de Unidades de Conservação como as Reservas Extrativistas em Santa Catarina, Pernambuco e Paraíba, nenhuma medida regulamentar se mostrou eficaz para assegurar a extração sustentável desta espécie, demonstrando que esta ainda apresenta diminuição do tamanho e peso em suas coletas (PEZZUTO e ECHTERNACHT, 1999; SILVA-CAVALCANTI e COSTA, 2009).

Diante da importância socioeconômica deste recurso pesqueiro e da diminuição do tamanho dos indivíduos encontrados no ambiente natural, o desenvolvimento de técnicas que sejam capazes de melhorar o desempenho zootécnico no cultivo desses animais será imprescindível para a sustentabilidade da aquicultura podendo mitigar os impactos causados pela pesca.

2. Revisão de literatura

Bivalvia é a segunda maior classe de moluscos, e são predominantemente marinhos e apresentam um corpo comprimido lateralmente envolvido por uma concha com duas valvas. Dentre os bivalves, destaca-se a família Veneridae por apresentar uma diversidade com mais de 500 espécies encontradas em todos os mares do mundo, muitas das quais são comercialmente importantes e ecologicamente fundamentais em virtude de sua posição bentônica dominante (CANAPA et al., 2003).

Essas espécies estão adaptadas a uma grande variedade de ambientes arenosos de baías, praias, manguezais, lagoas, estuários e recifes de corais (CANTERA, 1991). Estas adaptações a diferentes ambientes e estilos de vida esta relacionada com sua ampla distribuição latitudinal (CRAME, 2000), e podem ter influenciado fortemente a evolução dos venerídeos (CANAPA et al., 1996).

No Brasil, uma das principais espécies da família Veneridae é a *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) (Figura 1), que pode ser encontrado nas regiões costeiras do Atlântico, desde o sul do México, Belize, Costa Rica, Colômbia, Venezuela, Mar do Caribe, nas Ilhas de Cuba e Jamaica, Mar das Antilhas, Porto Rico, Guadalupe até o sul do Brasil (RIOS, 1994; TURGEON et al., 2009; WORMS, 2016) (Figura 2).

Devido a sua ampla distribuição no país, a espécie é conhecida principalmente por berbigão, vôngole, marisco, búzio, maçunim e sarnambi e está entre os bivalves marinhos mais explorados comercialmente na costa brasileira (ARRUDA-SOARES et al., 1982; BOEHS et al., 2010). Em outros países, a espécie é conhecida por chabette, pointed venus ou clam. Esta espécie foi descrita por Gmelin (1791) como *Venus brasiliiana*, e posteriormente reposicionada para o gênero *Anomalocardia* por Dall (1902).



Figura 1 – Exemplares de *Anomalocardia brasiliana*. Fonte: Lavander. H.D.

A espécie possui uma concha extremamente rígida, com a lúnula bem impressa e sino palial pequeno, sua coloração varia entre amarelo, branco e marrom podendo apresentar ou não pequenas faixas radiais que cobre todas as valvas do indivíduo (NARCHI, 1972; RIOS, 1994). *A. brasiliana* é um molusco filtrador com hábitos suspensívoros (NARCHI, 1972; MATTOS e CARDOSO, 2012), vivendo em locais costeiros localizados em enseadas, baías e estuários, movendo-se horizontalmente e verticalmente no substrato (NARCHI, 1972).



Figura 2 – Distribuição e ocorrência de *Anomalocardia brasiliana*.
Fonte: Sealifebase.org

São encontrados em áreas protegidas da ação de ondas e correntes mais fortes, na faixa intermareal entre o limite superior do mesolitoral e áreas rasas do sublitoral, onde se enterram superficialmente em substratos arenosos e lamosos (NARCHI, 1972; SCHAEFFER-NOVELLI, 1980). Eurihalina e osmorreguladora, os indivíduos são tolerantes às variações de salinidade do meio com mínimas alterações na concentração osmótica da hemolinfa (LIMA et al., 2009). Segundo Schaeffer-Novelli (1980), esta espécie apresenta grande resistência a

baixos níveis de oxigênio e é euriérmica, suportando grandes amplitudes de temperatura (SCHAEFFER-NOVELLI, 1976).

Diversas pesquisas foram realizadas no Brasil com *A. brasiliiana*, avaliando principalmente sua distribuição e densidade populacional, no Paraná (BOEHS et al., 2008), em São Paulo (SCHAEFFER-NOVELLI, 1980; CORTE et al., 2015), no Maranhão (SANTOS et al., 2014), no Ceará (ARAUJO, 2004), no Rio Grande do Norte (BELÉM et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013a), e em Pernambuco (EL-DEIR et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; SILVA-CAVALCANTI e COSTA 2011; RODRIGUES et al., 2013b). Aspectos relativos ao crescimento foram abordados por Monti et al. (1991), Rodrigues et al. (2013a) e Oliveira et al. (2013), simbiontes e patologias por Boehs e Magalhães, (2004) e da Silva et al. (2012).

A reprodução da espécie começou a ser estudada por Narchi (1976) e posteriormente por Corte et al. (2014), em São Paulo, em Santa Catarina (ARAÚJO, 2001) e no Paraná (FERREIRA JR et al., 2015). Na região Nordeste, Grotta e Lunetta (1980) na Paraíba foram os pioneiros, no Ceará (BARREIRA e ARAÚJO, 2005), em Pernambuco (LAVANDER et al., 2011) e na Bahia (LUZ e BOEHS, 2011). De maneira geral, o período de reprodução para os moluscos bivalves ocorre com um pico reprodutivo na primavera e desovas parciais ao longo do ano (RIOS, 1994). Entretanto, o período reprodutivo para uma mesma espécie pode variar substancialmente de região para região, principalmente em função de diferentes condições climáticas e ambientais, no litoral brasileiro *A. brasiliiana* se reproduz o ano inteiro com maior incidência na primavera (GROTTA e LUNETTA, 1980). Com relação ao tamanho de primeira maturação, Arruda - Soares et al. (1982) recomendaram a captura de espécimes com comprimento acima de 20 milímetros, quando os indivíduos já têm alcançado um grau de desenvolvimento das gônadas que possibilite a sua reprodução. Alguns estudos foram realizados sobre a pesca e o manejo da espécie (SILVA-CAVALCANTI e COSTA 2009; 2011; PEZUTTO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; PEZUTTO e SOUZA, 2015; ROCHA e PINKERTON, 2015).

A primeira Reserva Extrativista Marinha do Brasil, RESEX do Pirajubaé em Santa Catarina, foi criada em 1992 como uma ferramenta sustentável para melhor gerenciar principalmente a captura de *A. brasiliiana*. Mas alguns anos depois de sua criação, esta Unidade de Conservação sofreu um grande impacto ambiental provocado pela dragagem de sedimentos e aterro para uma construção viária (PEZZUTO e SOUZA, 2015). Os mesmos autores ao compararem o comprimento dos mariscos capturados dentro da Reserva Extrativista observaram que aproximadamente 26% apresentavam comprimento de concha entre 21 e 27 mm, e 67% entre 27 e 35 mm. Já em 2005, depois de dez anos, 82% dos

mariscos capturados estavam entre 21 e 27 mm e apenas 15% entre 27 e 35 mm. Alguns anos de desestruturação no manejo causaram extrema redução no tamanho dos mariscos capturados, assim como diminuição da abundância (PEZZUTO e SOUZA, 2015). Após sucessivas tentativas de regulamentações na RESEX, uma Portaria do ICMBio de 2013 regulamentou o tamanho mínimo de captura da espécie para 20 milímetros de comprimento de concha, o uso de apetrechos de pesca, a rotação de áreas de captura e controle do número de pessoas aptos a pescar marisco, afim de mitigar os impactos da atividade pesqueira.

Silva-Cavalcanti e Costa (2009) estudaram a captura de *A. brasiliana* em áreas protegidas, dentro da RESEX Acaú-Goiana, na divisa de Pernambuco e Paraíba e áreas não protegidas em Pernambuco, com intensa atividade de coleta de marisco. E relataram que, em ambas as áreas os espécimes apresentaram diminuição do tamanho de captura, identificando o aumento do número de pescadores como a causa provável.

Nos últimos anos as populações tradicionais costeiras no Brasil têm percebido o declínio dos estoques de *A. brasiliana* e diminuição do comprimento de concha, que em Pernambuco, fica entre 16 e 22 milímetros (SILVA-CAVALCANTI e COSTA, 2011). As autoras ainda descreveram a necessidade de gerenciamento do recurso pesqueiro dentro e fora de áreas protegidas no Brasil.

O aumento do esforço de pesca e descontrole da atividade têm contribuído para a sobrepesca da espécie, colocando em risco a sustentabilidade da pesca tradicional (PEZZUTO et al., 2010). Rocha e Pinkerton (2015) relatam que não é fácil alcançar sucesso no manejo de recursos pesqueiros, mesmo em estoques sedentários como mariscos. Mas as iniciativas recentes realizadas no Brasil como o Projeto “Gente da Maré” proporcionou mais visibilidade às pescadoras “marisqueiras” e à própria atividade. Rocha e Pinkerton (2015) também apontam a produção de sementes como uma importante ferramenta para reabastecer áreas sobreexploradas.

Produção de juvenis de *Anomalocardia brasiliana* em laboratório (Aquicultura)

Na costa brasileira, a comercialização de *A. brasiliana*, molusco de areia está baseada na pesca dos estoques naturais. Essa atividade é realizada principalmente por comunidades litorâneas, sendo, em alguns casos, a fonte de proteína mais importante na alimentação familiar (LAGREZE et al., 2015). Como alternativa a essa limitação, a produção de sementes desse molusco em laboratório torna-se essencial, principalmente para iniciativas ligadas ao repovoamento de populações naturais e maricultura (LAGREZE et al., 2015). Mouëza et al. (1999) e Boehs et al. (2008) também apontaram a espécie como potencial para maricultura.

Nos últimos anos, pesquisadores estão adaptando e desenvolvendo metodologias para produção de *A. brasiliiana* em laboratório. Inicialmente, os melhores resultados foram obtidos através da liberação espontânea de gametas (MOUËZA et al., 1999). Entretanto, o aprimoramento dos protocolos de produção de juvenis de moluscos bivalves possibilitou a obtenção de larvas da espécie através da indução à liberação dos gametas (LAVANDER et al., 2014; LAGREZE et al., 2015).

Este método foi alcançado por estímulos como a variação da temperatura da água, adição de microalgas e gametas após um período de maturação ou aclimação dos reprodutores em laboratório (LAVANDER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016a). A outra forma de se obter larvas por indução é através do choque térmico após a aclimação de 24h, e manutenção dos reprodutores por 12h ou overnight até coleta dos embriões (LAGREZE et al., 2015).

O tamanho médio dos ovócitos é de aproximadamente 60 μm durante o período de liberação dos gametas, com o surgimento do primeiro corpo polar após dez minutos da fertilização, as primeiras clivagens em 30 minutos, a gastrulação com seis horas pós-eclosão e larvas trocófora após nove horas (MOUËZA et al., 1999). Porém este foi o único estudo referente ao desenvolvimento embrionário da espécie até os dias de hoje, e não se sabe o período de liberação do segundo corpo polar, assim como possíveis alterações na meiose sob condições ambientais distintas.

Após 24 horas do período de fertilização, já no estágio inicial de larva véliger, conhecido como D-véliger devido ao seu formato, apresentam cerca de 70 μm (OLIVEIRA et al., 2016b). Nesta fase, a larva é planctônica e o assentamento se inicia com o surgimento do pé (larvas pé de véliger). Após oito ou dez dias de vida, já com 180 μm , tornam-se bentônicas (MOUËZA et al., 1999).

Recentemente, alguns estudos sobre a larvicultura de *A. brasiliiana* foram realizados, com o objetivo de aprimorar a sobrevivência e o crescimento durante esta fase, e avaliaram principalmente a influência de diferentes dietas e densidades larvais (LAGREZE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016a; OLIVEIRA et al., 2016b; LIMA, 2016). Um dos fatores de maior importância para o crescimento e sobrevivência das larvas é a composição nutricional da dieta fornecida durante a larvicultura (MARTÍNEZ- FERNÁNDEZ et al., 2006). As microalgas fornecem a energia e os nutrientes específicos para síntese de tecidos e acúmulo de reserva de energia para o crescimento larval. Esta fase inicial é considerada crítica, pois as larvas são frágeis e susceptíveis a doenças durante o manejo (OLIVEIRA et al., 2007). A sobrevivência e crescimento de moluscos são afetados principalmente por parâmetros físicos como

temperatura e salinidade (KINNE, 1964), assim como o manejo e alimentação (DEVAKIE e ALI, 2000).

Poucos estudos foram direcionados à manutenção de reprodutores em laboratório, a fim de avaliar o desempenho de exemplares adultos de *A. brasiliensis*. Lavander et al. (2014) observaram que mariscos adultos apresentam maior atividade de filtração e ingestão de microalgas na ausência de luz, em temperatura de 27°C, e na salinidade 30‰ para exemplares provenientes de Pernambuco ou região Nordeste do Brasil.

Poliploidia

A poliploidização é um processo natural na evolução das plantas, onde a maioria é poliplóide (GONG et al., 2004). A poliploidia também é bastante utilizada na agricultura moderna, com a finalidade de melhorar a produtividade, resistência a doenças e produção de frutas sem sementes, como a cana de açúcar (aneuploide), a beterraba, maçã, banana, laranja, limão e melão (triploides), o algodão, café, amendoim e batata (tetraploides), o trigo, alho, kiwi e ameixa (hexaploides), morangos (octaploides) entre outros (PIFERRER et al., 2009).

Segundo Gregory e Mable (2005), a poliploidia pode ocorrer naturalmente, mas em animais não é tão frequente como em plantas. Mesmo assim os autores relatam a poliploidia em diversas espécies de peixes principalmente nas famílias Salmonidae, Ciprinidae e Poeciliidae. A poliploidia ocorre espontaneamente em baixas frequências em quase todas as espécies de animais. Isso acontece através da mutação do número de cromossomos, embora letal ou responsável por anormalidades em aves e mamíferos, a triploidia em invertebrados, anfíbios e peixes é viável e indistinguível morfológicamente em relação aos diploides mais frequentes (GONG et al., 2004).

Na China, foi detectada a ocorrência natural de peixes tetraploides, diploides e, em menor escala, triploides na população selvagem da espécie *Misgurnus anguillicaudatus* (LI et al., 2012). No Brasil, foi identificada a ocorrência natural de triploidia em bagres da espécie *Rhamdia quelen*, jundiá (SILVA et al., 2011).

No entanto, a poliploidia natural é muito escassa em bivalves, porém ocorre em algumas espécies presentes nos gêneros *Corbicula* e *Lasaea*, na família Sphaeriidae e no mexilhão *Mytilus trossulus* (GONZÁLEZ-TIZÓN et al., 2000; GREGORY e MABLE, 2005). Segundo Guo et al. (1992), a triploidia também pode ser encontrada em populações naturais da ostra *Crassostrea gigas*, de forma muito escassa.

O uso de poliploides mais especificamente triploides na aquicultura se originou com a necessidade de impedir a maturação sexual dos peixes antes que eles atinjam o tamanho de comercialização (BENFEY, 2001). Em peixes, a manipulação cromossômica na piscicultura

já passou pelas fases experimental e piloto, atingindo a escala comercial principalmente com os salmonídeos (FLAJSHANS et al., 2010), sendo considerada uma alternativa viável no cultivo de salmão (FRASER et al., 2013). A otimização das técnicas de indução à triploidia em salmonídeos estão constantemente sendo pesquisadas (PRESTON et al., 2013). Já a produção de peixes triploides como o bacalhau, ainda está longe de ser estabelecida como uma alternativa para a produção comercial (DERAYAT et al., 2013).

Dentre suas aplicações, carpas triploides foram produzidas nos Estados Unidos para o uso como controle biológico no ambiente natural (PAPOULIAS et al., 2010). No Brasil, a triploidia foi utilizada no cultivo de fêmeas de Truta Arco-Íris em São Paulo (TABATA et al., 1999), mas poucos estudos no país são direcionados para esta área na aquicultura.

A triploidia em crustáceos, mais especificamente em camarões, se desenvolveu lentamente se comparada a peixes e moluscos, devido às suas características reprodutivas, mas Kir et al. (2014) ao utilizarem a temperatura na indução à triploidia alcançaram bons resultados. Alguns pesquisadores estão desenvolvendo a tecnologia para a triploidia em ouriços do mar, com objetivo de se cultivar no futuro, como uma alternativa sustentável para a pesca (BÖTTGER et al., 2011).

Apesar da triploidia tornar muitos animais estéreis, alguns são capazes de produzir gametas funcionais e descendentes viáveis, com potencial impacto para populações selvagens (GONG et al., 2004). Os mesmos autores concordam que a utilização de triploides, quando estes são 100% estéreis na aquicultura, é seguro e impede a interação com populações selvagens, protegendo assim a biodiversidade. A interação entre organismos cultivados e selvagens, ambos diploides, representa um dos principais desafios ambientais enfrentados na aquicultura. A triploidia surge como uma alternativa aos escapes de animais provenientes de sistemas de cultivo (FJELLDAL et al., 2014).

A superioridade dos moluscos triploides na aquicultura é reconhecida, principalmente por causa da sua esterilidade e melhor taxa de crescimento, além de apresentarem sabor e textura superiores aos diploides (NELL, 2002; KONG et al., 2007). O maior ganho de peso dos triploides advém da distribuição energética, que é dirigida exclusivamente para o crescimento, uma vez que apresentam esterilidade total ou parcial (ALLEN et al., 1986; GUO e ALLEN, 1994a; CHENEY, 2010).

Três hipóteses têm sido propostas para explicar o crescimento superior nos moluscos triploides (WANG et al., 2002). A primeira sugere que a esterilidade dos triploides faz com que a energia que seria usada na reprodução é transferida para o crescimento somático. Esta hipótese foi descrita em estudos onde os triploides foram maiores do que os diploides somente após o período reprodutivo (ALLEN e DOWNING, 1986; EVERSOLE et al., 1996).

Entretanto, esta hipótese não explica o melhor desempenho de triploides antes de atingirem a idade de maturação sexual (GUO e ALLEN, 1994a; GUO et al., 1996).

A segunda hipótese aponta que o aumento da heterozigosidade dos triploides poderia ser a causa do melhor crescimento. Triploides obtidos a partir da retenção da meiose I são mais heterozigotos do que aqueles produzidos pela retenção da meiose II e de que os diploides de acordo com os resultados de Stanley et al. (1984) e Hawkins et al. (1994). Por outro lado, resultados de outros estudos não mostram correlação entre o desempenho superior no crescimento e a heterozigosidade (ALLEN et al., 1982; BEAUMONT et al., 1995; LI et al., 1992).

A terceira hipótese sugere que o aumento do tamanho das células é a causa fundamental para o melhor crescimento em moluscos triploides, já que as células triploides têm 50% a mais DNA, apresentando mais citoplasma para manter a relação citoplasma e núcleo. Assim, as células triploides são maiores do que as diploides (WANG et al., 2002).

Wang et al. (2002) demonstraram que triploides obtidos a partir da retenção do segundo corpo polar, durante a meiose II, apresentaram menor desempenho no crescimento por serem mais homozigotos, e os melhores resultados foram obtidos com o aumento da heterozigosidade. E concordaram com a hipótese que sugere o deslocamento de energia para o crescimento somático como um dos fatores que contribuem para o melhor crescimento dos triploides após atingirem o período maturação. Eles ainda relataram que em ambientes com limitação de nutrientes o desempenho no crescimento pode não ser expresso nos triploides.

Em moluscos, a triploidia pode ser obtida por diferentes métodos, quando os ovócitos são liberados na água, eles se encontram em prófase da meiose I. A interrupção das divisões celulares para evitar a saída dos corpos polares pode ocorrer durante a I (1º corpo polar) ou II (2º corpo polar) meiose, através da aplicação de choques físicos e químicos (COLAS e DUBÊ, 1998; CHENEY, 2010). A chave para induzir a triploidia artificialmente, consiste em conhecer o período de saída dos corpos polares, e reter sua saída. Quando não se tem o controle na fertilização, a técnica fica comprometida e o percentual de sucesso diminui (PIFERRER et al., 2009).

Outra forma de se obter triploides é através do cruzamento de tetraploides e diploides, método aplicado na ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (CHENEY, 2010). Atualmente este método é o mais usado na produção comercial de triploides nos Estados Unidos e União Européia, pois além de produzir 100% de triploides, o método diminui o risco de contaminação do técnico manipulador por químicos como a Citocalasina B, um antibiótico fúngico (PIFERRER et al., 2009). Neste caso, os gametas dos machos tetraploides são diploides (2n), ao invés de haploides (n). Estes são misturados com gametas femininos

normais (haploides) resultando em organismos geneticamente triploides ($3n$), com dois conjuntos cromossômicos oriundos do macho e um conjunto da fêmea. Além disso, ao contrário dos triploides, os tetraploides são férteis e por isso são usados para a produção contínua de juvenis ($3n$) nos laboratórios para atender a demanda da aquicultura (GUO et al., 1996).

Recentemente pesquisadores estão produzindo híbridos triploides através do cruzamento de fêmeas da ostra *Crassostrea hongkongensis* e machos de *Crassostrea gigas*, por inibição do segundo corpo polar com tratamento hipotônico, e os resultados demonstraram um rápido crescimento e alta sobrevivência (ZHANG et al., 2014).

Os gametas provenientes de bivalves triploides apresentam baixíssima viabilidade, assim como os eventuais cruzamentos de triploides e diploides (GUO e ALLEN, 1994bc; GONG et al., 2004; CHENEY, 2010). Não há evidências até o momento de que bivalves triploides se reproduzam naturalmente e, em todos os estudos realizados em laboratório, as desovas só foram possíveis artificialmente com raspagem das gônadas, demandando o sacrifício do animal (JOUAUX et al., 2013). Zhang et al. (2010) relataram a perda de cromossomos em alguns triploides, durante as divisões mitóticas, ocasionando uma reversão. Guo (2009) também observaram a reversão de triploides para diploides em um baixo percentual.

A produção mundial de bivalves triploides é direcionada principalmente para a ostra *C. gigas* (NELL, 2002), isto se mantém até os dias atuais. A produção de ostras triploides na Europa é de 20%, principalmente na França, enquanto nos Estados Unidos este valor chega a 50% (PIFERRER et al., 2009). Alguns países destacam-se na produção mundial de moluscos triploides, como os Estados Unidos, França, China e Austrália.

A produção comercial de ostras triploides da espécie *C. gigas*, na costa oeste da América do Norte, iniciou-se em 1985, e quinze anos depois já era responsável por mais de 30% dos cultivos (NELL, 2002). Nos Estados Unidos, em 2010, mais de 90% da produção de ostras na Virgínia (costa leste) foram de *Crassostrea virginica* triploides (DÉGREMONT et al., 2012). Atualmente, mais de 50% da produção mundial de sementes de ostras em laboratórios são de triploides (MATT e ALLEN, 2014).

Na Austrália, a *C. gigas* triploide responde por 30% da produção (DOVE e O'CONNOR, 2009), e duas outras espécies de ostras triploides também são produzidas *Saccostrea glomerata* e *Saccostrea commercialis* (NELL et al., 2002; HAND et al., 2004). Diversas espécies de bivalves foram investigadas para manipulação cromossômica com fins comerciais na aquicultura, algumas estão descritas na tabela 1.

No Brasil, desde 2012 se produz sementes de moluscos triploides em Santa Catarina, no entanto, não há registros no país de cultivo de bivalves nativos triploides.

Tabela 1 – Principais espécies de bivalves induzidos a triploidia no mundo.

Espécies	País	Autores
<i>Crassostrea virginica</i>	Estados Unidos	(DÉGREMONT et al., 2012; WALTON et al., 2013; MATT e ALLEN, 2014)
<i>Crassostrea gigas</i>	Estados Unidos, França, China, Coréia	(GUO et al., 1996; GARNIER-GÉRÉ et al., 2002; WANG et al., 2002; KONG et al., 2007; KANG et al., 2013)
<i>Crassostrea ariakensis</i>	Estados Unidos	(HARDING, 2007)
<i>Crassostrea madrasensis</i>	Índia	(MALLIA et al., 2006)
<i>Saccostrea glomerata</i>	Austrália	(HAND et al., 2004)
<i>Pinctada martensii</i>	Japão, China	(WADA et al., 1989; JIANG et al., 1993)
<i>Placopecten magellanicus</i>	Canadá	(DESROSIERS et al., 1993)
<i>Argopecten ventricosus</i>	México	(RUIZ-VERDUGO et al., 2001)
<i>Argopecten purpuratus</i>	Chile	(LOHRMANN e VON BRAND, 2005)
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Estados Unidos	(EVERSOLE et al., 1996; YANG e GUO, 2006a)
<i>Ruditapes decussatus</i>	França	(GERARD et al., 1994)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Reino Unido	(BEAUMONT e CONTARIS, 1988; GOSLING e NOLAN, 1989)
<i>Mulinia lateralis</i>	Estados Unidos	(YANG e GUO, 2006b)
<i>Panopea abrupta</i>	Estados Unidos	(VADOPALAS e DAVIS, 2004)
<i>Tapes dorsatus</i>	Austrália	(NELL et al., 1995)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Japão	(SCARPA et al., 1994)
<i>Mytilus edulis</i>	Canadá, Japão	(YAMAMOTO e SUGAWARA 1988; BEAUMONT, 2000; BRAKE et al., 2004)

No início na década de 80, a triploidia era induzida quimicamente por Citocalasina B - CB ($C_{29}H_{37}NO_5$) para inibir a saída do segundo corpo polar, e posteriormente, passou a utilizar Dimetilaminopurina 6-DMP ($C_7H_9N_5$). Contudo, estes métodos não produziam 100% de indivíduos $3n$, devido ao desenvolvimento assincrônico dos ovos (Li et al., 2000). Somente na década seguinte, os primeiros moluscos $4n$ foram produzidos (Guo e Allen, 1994c). Os resultados foram melhorando quando os triploides passaram a ser obtidos por cruzamentos de fêmeas diploides com machos tetraploides (GUO et al., 1996). Alguns anos depois, Eudeline et al. (2000) indicaram a aplicação dessa técnica, assim que 50% dos ovos

estivessem com primeiro corpo polar aparente. Assim a manutenção de 4n em laboratórios se tornou essencial para produção de 3n (MCCOMBIE et al., 2005). Esta técnica para produção de ostras *C. gigas* 4n obteve uma patente nos Estados Unidos, onde os pesquisadores Ximing Guo e Standish Allen Jr foram os inventores.

Ao longo de quase quatro décadas, desde o desenvolvimento do primeiro método de manipulação cromossômica em bivalves, diferentes técnicas foram usadas. Além da indução química, pesquisadores obtiveram êxitos por manipulação principalmente da temperatura e em alguns casos da salinidade durante a meiose (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais métodos de indução a poliploidia em moluscos bivalves.

Indução	Concentração	Período após fertilização *	Período de exposição	Autores
CB	0,5 a 1 mg/L			(PIFERRER et al., 2009; GUO et al., 2009; MELO et al., 2015)
6-DMAP	300 a 600 µM/L			(DESROSIERS et al., 1993; GUO et al., 2009; MELO et al., 2015)
Temperatura	1 a 7 °C	10 a 45 minutos	15 a 20 minutos	(YANG e GUO, 2006; MELO et al., 2015)
	35 a 38 °C			
Salinidade	8 a 20 ‰			(KONG et al., 2011; MENG et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

*Período de aplicação da indução para reter a meiose I ou II.

Dentre os métodos para se verificar o sucesso da poliploidia está a cariotipagem, caracterizada pela contagem do número de cromossomos, análise de sua morfologia e tamanho, constantes e únicas para cada espécie (EBIED e ALY, 2004). O número mais frequente de cromossomos para a família Veneridae é de $2n = 38$, mas este número diploide pode variar de 12 a 46 cromossomos entre os bivalves (THIRIOT-QUIEVREUX, 2002) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de cromossomos dos principais grupos de bivalves.

Bivalves	Espécies	2n	Autores
	<i>Mercenaria mercenaria</i>	38	(LIN et al., 2008)
Bivalves	<i>Meretrix meretrix</i>	38	(DENG et al., 2008)
de areia	<i>Ruditapes decussatus</i>	38	(RODRIGUEZ JUIZ et al., 1996)
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	38	(BORSA e THIRIOT-QUIEVREUX,

			1990)
	<i>Perna perna</i>	28	(JACOBI et al., 1990)
Mexilhões	<i>Mytilus edulis</i>	28	(THIRIOT-QUIEVREUX e AYRAUD,
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	28	1982)
	<i>Argopecten irradians</i>	16	(WANG e GUO, 2004)
Vieiras	<i>Chlamys farreri</i>	19	(WANG e GUO, 2004)
	<i>Nodipecten nodosus</i>	38	(PAULS e AFFONSO, 2000)
	<i>Crassostrea gigas</i>	20	(THIRIOT-QUIEVREUX e INSUA, 1992)
Ostras	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	20	(MARQUEZ, 1992)
	<i>Crassostrea gasar</i>	20	(LEITÃO et al., 1999)

O número de cromossomos é mais conservado na família Ostreidae e Veneridae, e menos constante para Mytilidae e Pectinidae (PÉREZ-GARCÍA et al., 2010).

Os estudos cromossômicos também podem fornecer informações básicas para compreensão da organização do genoma, indicando se a espécie sofreu mudanças evolutivas (RODRÍGUEZ-JUÍZ et al., 1996) bem como variabilidade interespecífica (FERNÁNDEZ-TAJES et al., 2008).

A perda ou ganho de cromossomos é conhecida como aneuploidia, este fenômeno também está sendo estudado em uma série de espécies de bivalves com importância econômica para aquicultura com objetivo de avaliar o efeito no crescimento (SOUZA et al., 2012). Assim a citogenética em moluscos bivalves, se faz fundamental para o melhoramento genético como técnicas de poliploidia (ZHENXING et al., 2003).

A identificação de espécies de bivalves apenas com base na morfologia, como ostras do gênero *Crassostrea*, muitas vezes se tornam difíceis. Portanto outros métodos tais como análises moleculares e cariológicas são complementos úteis (LAPÈGUE et al., 2002). Deng et al. (2008) estudaram populações da espécie *Meretrix meretrix* da família Veneridae através da comparação por morfometria e o cariótipo. Eles observaram que os índices morfométricos foram diferentes entre as populações, assim como características específicas dos cromossomos, mas o número de cromossomos foi o mesmo, $2n = 38$.

A microscopia eletrônica e de fluorescência é bastante empregada em estudos com moluscos bivalves, esta técnica permite acompanhar o comportamento dos cromossomos dentro dos ovócitos, antes e após a fertilização (LI et al., 2000; THIRIOT-QUIEVREUX, 2002).

No Brasil, não existem muitos estudos sobre a citogenética de bivalves nativos. Os poucos estudos limitam-se a avaliar apenas o período de liberação do primeiro corpo polar,

através do acompanhamento da embriogênese em larviculturas experimentais ou comerciais, e poucos dados sobre o cariótipo foram registrados.

Além do cariótipo, o tamanho do genoma também apresenta características importantes para definir as características genéticas de uma espécie. A citometria de fluxo é uma outra técnica amplamente utilizada para se estudar o genoma, teor ou conteúdo de DNA, de forma rápida e precisa (RODRÍGUEZ-JUÍZ et al., 1996).

Atualmente, poucas informações estão disponíveis sobre a citogenética de espécies comerciais de moluscos na aquicultura brasileira ou de importancia comercial na pesca, à exceção da espécie exótica *C.gigas*, amplamente cultivada e estudada no mundo. Espécies nativas como *A.brasiliana* apresentam importancia comercial para atividade pesqueira artesanal e potencial aquícola no Brasil, porém não existem estudos sobre a caracterização meiótica, números de cromossomos correspondentes aos descritos para mesma família Veneridae e poucos dados sobre a manipulação poliploide.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de indução à triploidia para *Anomalocardia brasiliiana*.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar o período do surgimento dos corpos polares durante a meiose;
- 2) Identificar o número mais frequente de cromossomos;
- 3) Avaliar diferentes métodos químicos e físicos de indução à triploidia;

4. Referências bibliográficas

- ALLEN JR, S.K.; DOWNING, S.L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. **Journal Experimental Marine Biology Ecology**. v.102, p.197-208, 1986.
- ALLEN JR., S.K., GAGNON, P.S., HIDU, H. Induced triploidy in the soft-shell clam: cytogenetic and allozymic confirmation. **Journal of Heredity**. v.73, p.421-428, 1982.
- ARAÚJO, C.M.Y. Biologia reprodutiva do berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé. 2001. 204p. **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- ARAÚJO, M. R. L. Ciclo reprodutivo e distribuição espacial de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará. 2004. 77p. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
- ARRUDA-SOARES, H.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; MANDELLI JR, J. “Berbigão” *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791), bivalve comestível da região da Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo, Brasil: Aspectos biológicos de interesse para a pesca comercial. **Boletim do Instituto Pesca**. v. 9, p.21-38, 1982.
- BARREIRA, C.A.R.; ARAÚJO, M.L.R. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1971) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil. **Boletim do Instituto Pesca**. v.31, n.1, p.9-20, 2005.
- BEAUMONT, A.R.; FAIRBROTHER, J.E.; HOARE, K. Multilocus heterozygosity and size: a test of hypotheses using triploid *Mytilus edulis*. **Heredity** v.75, p.256-266, 1995.
- BEAUMONT, A.R.; CONTARIS, M.H. Production of triploid embryos of *Tapes semidecussatus* by the use of Cytochalasin B. **Aquaculture**, v.73, p.37-42, 1988.
- BEAUMONT, A. Genetic considerations in transfers and introductions of scallops. **Aquaculture International**. v. 8, p.493-512, 2000.
- BELÉM, T.P.; MOURA, R.S.T.; HENRY-SILVA, G.G. Distribuição e densidade do bivalve *Anomalocardia brasiliana* em praias do Rio Grande do Norte durante um período de pluviosidade atípica. **Biotemas**. v.26, n.1, p.109-122, 2013.
- BENFEY, T. J. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. **Journal of Marine Science**. v.58, p.525-529, 2001.
- BOEHS, G.; ABSHER, T.M.; CRUZ-KALED, A.C. Ecologia Populacional de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto Pesca**. v.34, n.2, p.259-270, 2008.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.21, n.4, p.865-869, 2004.

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, R.J. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**. v.103, n.1, p.43-47, 2010.

BORSA, P.; THIRIOT-QUICVREUX, C. Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum*, *R. aureus* and *R. decussatus* (Bivalvia, Veneridae). **Aquaculture**. v.90, p.209-227, 1990.

BÖTTGER, S. A.; ENO, C. C.; WALKER, C. W. Methods for generating triploid green sea urchin embryos: An initial step in producing triploid adults for land-based and near-shore aquaculture. **Aquaculture**. v.318, p.199-206, 2011.

BRAKE, J.; DAVIDSON, J.; DAVIS, J. Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. **Aquaculture**. v.236, p.179-191, 2004.

CANAPA, A.; MAROTA, I.; ROLLO, F.; OLMO, E. Phylogenetic Analysis of Veneridae (Bivalvia): Comparison of Molecular and Palaeontological Data. **Journal of Molecular Evolution**. v.43, p.517-522, 1996.

CANAPA, A.; SCHIAPARELLI, S.; MAROTA, I.; BARUCCA, M. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). **Marine Biology**. v.142, p.1125-1130, 2003.

CANTERA, J. R. Shallow-water venerid clams (Bivalvia: Veneridae) from the Pacific coast of Colombia. **The Veliger**. v.34, p.78-84, 1991.

CHENEY, D. P. Bivalve Shellfish Quality in the USA: From the Hatchery to the Consumer. **Journal of the World Aquaculture Society**. v.41, n.2, p.192-206, 2010.

COLAS, P.; DUBÉ, F. Meiotic maturation in mollusc oocytes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.9, p.539-548, 1998.

CORTE, G.N.; YOKOYAMA, L.Q.; AMARAL, A.C.Z. An attempt to extend the Habitat Harshness Hypothesis to tidal flats: A case study of *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) reproductive biology. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v.150, p. 136-141, 2014.

CORTE, G.N.; YOKOYAMA, L.Q.; COLEMAN, R.A.; AMARAL, A.C.Z. Population dynamics of the harvested clam *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Cidade Beach, south-east Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v.95, n.6, p.1183-1191, 2015.

CRAME, J. A. Evolution of taxonomic diversity gradients in the marine realm: evidence from the composition of Recent bivalve faunas. **Paleobiology**. v.26, p.188-214, 2000.

DA SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. **Journal of the Marine Biological**. v.92(3), 571-579, 2012.

DÉGREMONT, L.; GARCIA, C.; LAWALE, A.F.; ALLEN JR. S.K. Triploid oysters in the Chesapeake Bay: comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica*. **Journal of Shellfish Research**. v.31(1), p.21-31, 2012.

DENG, Y.; DU, X.; HUANG R.; WANG, Q. Morphological and karyotypic variation in three wild populations of *Meretrix meretrix*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. v.26, n.1, p.76-80, 2008.

DERAYAT, A.; MAGNÚSSON, A.; STEINARSSON, A.; BJORNSSON, B. Growth and gonadal development in diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Fish Physiol Biochem**. v.39, p.1195-1203, 2013. DOI 10.1007/s10695-013-9775-9

DESROSIERS, R.R.; QARD, A.G.; PEIGNON, J.M.; NACIRIB, Y.; DUFRESNE, L.; MORASSE, J.; LEDU, C.; PHELIPOTB, P.; GUERRIER, P.; DUB, F. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6 dimethylaminopurine. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.170, p.29-43, 1993.

DEVAKIE, M.; ALI, A. Effects of storage temperature and duration on the setting and post-set spat survival of the tropical oyster, *Crassostrea iredalei*. **Aquaculture**. v.190, p.369-376, 2000.

DOVE, M.C.; O'CONNOR, W.A. Commercial assessment of growth and mortality of fifth-generation Sydney rock oysters *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) selectively bred for faster growth. **Aquaculture Research**. v.40, p.1439-1450, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02243.x

DULVY, N.K.; SADOVY, Y.; REYNOLDS, J.D. Extinction vulnerability in marine populations. **Fish and Fisheries**. v.4, p.25-64, 2003.

EBIED, A.B.M.; ALY, F.M. Cytogenetic Studies on Metaphase Chromosomes of Six Bivalve Species of Families Mytilidae and Veneridae (Nucinelloidea, Mollusca) **Cytologia**. v.69(3), p.261-273, 2004.

EL-DEIR, S.; NEUMANN-LEITÃO, S.; MELO, P. A. M. C. Distribution pattern of *Anomalocardia brasiliiana* Gmelin, 1971 (Mollusca, Bivalvia) in a tropical coastal ecosystem. **Tropical Oceanography**. v.37(2), p. 89-101, 2009.

EUDELIN, B.; ALLEN JR. S.K.; GUO, X. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. **Aquaculture**. v.187, p.73-84, 2000.

EVERSOLE, A.G., KEMPTON, C.J., HADLEY, N.H., BUZZI, W.R. Comparison of growth, survival, and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. **Journal Shellfish Research**. 15, 689–694, 1996.

FAO 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Rome, 220pp.

FERNÁNDEZ-TAJES, J.; MARTÍNEZ-LAGE, A.; FREIRE, R.; GUERRA, A.; MÉNDEZ, J. GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M. Genome sizes and karyotypes in the razor clams *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) and *E. silique* (Linnaeus, 1758). **Cahiers de Biologie Marine**. v.49, p.49-85, 2008.

FERREIRA JR, F.L.; NETO, R.L.B.; KOLM, H.E.; ABSHER, T.M. Relationship between reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliensis* (Mollusca: Veneridae) and the suspended particulate matter in the Paranaguá Estuarine Complex, Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. v.10(1), p.44-54, 2015.

FJELLDAL, P.G.; WENNEVIK, V.; FLEMING, I.A.; HANSEN, T.; GLOVER, K.A. Triploid (sterile) farmed Atlantic salmon males attempt to spawn with wild females. **Aquaculture Environment Interactions**. v.5, p.155-162, 2014. doi: 10.3354/aei00102

FLAJSHANS, M.; GELA, D.; KOCOUR, M.; BUCHTOVA, H.; RODINA, M.; PSENICKA, M.; KASPAR, V.; PIACKOVA, V.; SUDOVA, E.; LINHART, O. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. **Reviews Fish Biology and Fisheries**. v.20, p.317-329, 2010. Doi 10.1007/s11160-009-9144-z

FRASER, T.W.K.; HANSEN, T.; SKJERAASEN, J.E.; MAYER, I.; SAMBRAUS, F.; FJELLDAL, P.G. The effect of triploidy on the culture performance, deformity prevalence, and heart morphology in Atlantic salmon. **Aquaculture**. 416-417, p.255-264, 2013.

GARNIER-GÉRÉ, P.H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BOUGRIER, S.; MAGOULAS, A.; HÉRAL, M.; KOTOULAS, G.; HAWKINS, A.; GÉRARD, A. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. **Molecular Ecology**. v.11, p.1499-1514, 2002.

GERARD, Y.A.; NACRI, C.; NOIRET, C.; LEDU, J.; PEIGNON, M.; PHELIPOT, P. Induced triploidy in the European clam, *Ruditapes decussatus* (L.), and performance of triploid larvae. **Aquaculture and Fisheries Management**. v.25, p.769-779, 1994.

GONG, N.; YANG, H.; ZHANG, G.; LANDAU, B. J.; GUO, X. Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. **Heredity**. v.93, p.408-415, 2004.

GONZÁLEZ-TIZÓN, A.; MARTÍNEZ-LAGE, A.; AUSIO, J.; MÉNDEZ, J. Polyploidy in a natural population of mussel, *Mytilus trossulus*. **Genome**. v.43, p.409-411, 2000.

GONZALEZ-TIZON, A.M.; ROJO, V.; VIERNA, J.; JENSEN, K.T.; EGEA, E.; MARTINEZ-LAGE, A. Cytogenetic characterisation of the razor shells *Ensis directus* (Conrad, 1843) and *E. minor* (Chenu, 1843) (Mollusca: Bivalvia). **Helgoland Marine Research**. v.67, p.73-82, 2013.

GOSLING, E.M.; NOLAN, A. Triploidy Induction by Thermal shock in the manila clam, *Tapes semidecussatus*. **Aquaculture**. v.78, p.223-228, 1989.

GREGORY, T.R.; MABLE, B.K. **The Evolution of the Genome**. Polyploidy in Animals. Elsevier.cap.8, pp.427-517. 2005.

GROTTA, M.; LUNETTA, J.E. Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) do litoral do Estado da Paraíba. **Revista Nordestina de Biologia**. v.3(1), p.5-55. 1980.

GUO, X.; ALLEN, JR.S. Sex Determination and Polyploid Gigantism in the Dwarf Surfclam (*Mulinia lateralis* Say). **Genetics**. v.138, p.1199-1206, 1994a.

GUO, X.; ALLEN, JR.S.K. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **The Biological Bulletin**. v.187, p.309-318, 1994b.

GUO, X.; DEBROSSE, G.A.; ALLEN JR, S.K. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. **Aquaculture**. v.142, p. 149-161, 1996.

GUO, X.; ALLEN, S. K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body in eggs from triploids. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**. v.3, p.42-50, 1994c.

GUO, X.; HERSHBERGK, W.K.; COOPER, K.; CHEW, K. Genetic consequences of blocking polar body I with Cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. II. Segregation of chromosomes. **Bulletin Biology**. v.183, p.387-393, 1992.

GUO, X.; WANG, Y.; XU, Z.; YANG, H. Chromosome set manipulation in shellfish. p 165-195 in: New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental management, G. Burnell and G. Allan (eds). Woodhead Publishing. 2009.

HAND, R.E.; NELLA, J.A.; THOMPSON, P.A. Studies on triploid oysters in Australia XIII. Performance of diploid and triploid Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), progeny from a third generation breeding line. **Aquaculture**. v.233, p.93-107, 2004.

HAWKINS, A.J.S.; DAY, A.J.; GERARD, A.; NACIRI, Y.; LEDU, C.; BAYNE, B.L.; HERAL, M. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. **Journal Experimental Marine Biology Ecology**. v.184, p.21-40, 1994.

HARDING, J.M. Comparison of growth rates between diploid deby eastern oysters (*Crassostrea virginica*, Gmelin 1791), triploid eastern oysters, and triploid suminoe oysters (*C. ariakensis*, Fugita 1913). **Journal of Shellfish Research**. v.26(4), p.961-972. 2007.

IBGE 2017. **Produção Pecuária Municipal 2016**. Rio de Janeiro, v. 44. 51pp.

JACOBI, C.M.; ROSENBERG, C.; MORGANTE, A.M.V. The karyotype of the brown mussel *Perna perna* (L.) (Bivalvia: Mytilidae). **Revista Brasileira de Genetica**. v.13, n.4, p.669-673, 1990.

JIANGA, W.; XU, G. L.; LINB, Y.; QING, N. Growth of the induced triploid pearl oyster, *Pinctada martensii*. **Aquaculture**. v.111, p.245-253, 1993.

JOUAUX, A.; BLIN, J.L.; ADELIN, B.; HEUDE-BERTHELIN, C.; SOURDAINE, P.; MATHIEU, M.; KELLNER, K. Impact of energy storage strategies on gametogenesis and reproductive effort in diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* - Involvement of insulin signaling. **Aquaculture**. v.388-391, 173-181, 2013.

KANG, J.H.; LIM, H.J.; KANG, H.S.; LEE, J.M.; BABY, S.; KIM, J.J. Development of Genetic Markers for Triploid Verification of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. **Asian Australasian Journal Animal of Sciences**. v. 26, n.7, p. 916-920, 2013.

KINNE, O. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature salinity combinations. **Oceanography Marine**. v.2, p.53-55, 1964.

KIR, M.; SAHAN, A.K.; OKUR, O. Induction of triploidy in *Melicertus kerathurus* (Forsk., 1775) with temperature shock. **Aquaculture Research**. p.1-5, 2014.

KONG, L.; WANG, Z.; YU, R.; LI, Q.; WANG, R. Seasonal Variation of the Glycogen Enzyme Activity in Diploid and Triploid Pacific Oyster Gonad During Sexual Maturation. **Journal of Ocean University of China** (Oceanic and Coastal Sea Research). v.6,n.4, p.383-386, 2007.

KONG, J.; WANG, Z.; YU, R.; LIU, J.; ZHANG, Y. Triploid induction in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by hypotonic treatment and comparison with other induction methods. **Journal of Fishery Sciences of China**. 18(3): 581-587. 2011. DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00581

LAGREZE, F.J.S.; ALBUQUERQUE, M.C.P.; ARAUJO, J.; SÜHNEL, S.; MELO, C.M.R. Sobrevivência e crescimento de larvas do molusco de areia *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) em laboratório. **Boletim do Instituto Pesca**. v.41(1), p.133-143, 2015.

LAPEGUE, S.; BOUTET, I.; LEITAO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOT-QUIEVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biology Bulletin**. v.202, p.232-242, 2002.

- LAVANDER, H.D.; CARDOSO JR, L.O.; OLIVEIRA, R. L.; SILVA NETO, S. R.; GÁLVEZ, A. O.; PEIXOTO, S. R. M. Biologia reprodutiva da *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) no litoral norte de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.6, n.2, p.344-350, 2011.
- LAVANDER, H.D.; SILVA NETO, S.R.; SOBRAL, S.C.; LIMA, P.C.M.; RÊGO, M.G.; GÁLVEZ, A.O. Manutenção e reprodução de *Anomalocardia brasiliiana* em condições laboratoriais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.9, n.2, p.269-276, 2014.
- LEITAO, A.; BOUDRY, P.; LABAT, J.P.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Comparative karyological study of cupped oyster species. **Malacologia**. v.41 (1), p.175-186, 1999.
- LIN, Z.H.; LU, Z.M.; CHAI, X.L.; FANG, J.; ZHANG, J.M. Karyotypes of Diploid and Triploid *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus). **Journal of Shellfish Research**. v.27(2), p.297-300, 2008.
- LI, Y. J.; ZHANG, M. Z.; QIAN, C.; GAO, M.; ARAI, K. Fertility and ploidy of gametes of diploid, triploid and tetraploid loaches, *Misgurnus anguillicaudatus*, in China. **Journal of Applied Ichthyol**. v.28, p.900-905, 2012.
- LI, G.; JIANG, W.; SHEN, Q. Comparison of heterozygosity at three loci and growth between triploid and diploid pearl oyster, *Pinctada martensii*. **Journal Tropical Oceanography**. v.11, p.84-88, 1992.
- LI, Q.; OSADA, M.; KASHIHARA, M.; HIROHASHI, K.; KIJIMA, A. Meiotic maturation, fertilization and effect of ultravioleta irradiation on the fertilizing sperm in the Japanese scallop. **Fisheries Science**. v.66, p.403-405, 2000.
- LIMA, M.A.; SOARES, M.O.; PAIVA, A.C.C.; OSÓRIO, F.M.; PORFÍRIO, A.F.; MATTEWS-CASCON, H. Osmorregulação em moluscos: o caso do bivalve estuarino tropical *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia). **Conexões: Ciência e Tecnologia**. v. 3, p.79-84, 2009.
- LIMA, P.C.M. Crescimento e sobrevivência larval e juvenil do bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) em laboratório. **Monografia**. 2016. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- LOHRMANN, K.B.; VON BRAND, E. Histological study of gonads in triploid scallops, *Argopecten purpuratus*. **Journal of Shellfish Research**. v.24, n.2, p.369-375, 2005.
- LUZ, JR.; BOEHS, G. Reproductive cycle of *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae) in the estuary of the Cachoeira River, Ilhéus, Bahia. **Brazilian Journal Biology** v.71, n.3, p.1-8, 2011.
- MALLIA, J.V.; MUTHIAH, P.; THOMAS, P.C. Growth of triploid oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). **Aquaculture Research**. v.37, p.718-724, 2006.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; ACOSTA-SALMÓN, H.; SOUTHGATE, P.C. Thenutritional value of seven of tropical micro-algae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. **Aquaculture**. v.257, p.491-503, 2006.

MARQUEZ, E. G. Comparaci6n de cari6tipos entre las ostras *Crassostrea virginica* (Gmelin), *C. rhizophorae* (Guilding) y *Pinctada imbricata* (ROding). **Carribean Journal of Science**. v.28, p.51-55, 1992.

MATTOS, G.; CARDOSO, R.S. Population dynamics of two suspension-feeding bivalves on a sheltered beach in southeastern Brazil. **Helgoland Marine Research**. v.66, p.393-400, 2012.

MATT, J. L.; ALLEN JR, S.K. Heteroploid mosaic tetraploids of *Crassostrea virginica* produce normal triploid larvae and juveniles as revealed by flow cytometry. **Aquaculture**. v.432, p.336-345, 2014.

MCCOMBIE, H.; LEDU, C.; PHELIPOT, P.; LAPÈGUE, S.; BOUDRY, P.; GÉRARD, A. A complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and tetraploids with cytochalasin B treatments. **Marine Biotechnology**. v.7, p.318-330, 2005.

MELO, E.M.C.; GOMES, C.H.A.M.; SILVA, F.C.; SÜHNEL, S.; MELO, C.M.R. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). **Boletim do Instituto Pesca**, São Paulo, 41(4): 889-898. 2015.

MENG, Q.; BAO, Z.; WANG, Z.; WANG, S.; HU, J.; HU, X.; HUANG, X. Growth and reproductive performance of triploid yesso Scallops (*Patinopecten yessoensis*) induced by hypotonic shock **Journal Shellfish Research**. 31(4):1113-1122. 2012.

MONTI, D.; FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. Demography and growth of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Bivalvia, Veneridae) in a mangrove, in Guadeloupe (French West Indies). **Journal of Molluscan Studies**.v.57, p.249-257, 1991.

MOUËZA, M.; GROS, O.; FRENKIEL, L. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). **Journal of Molluscan Studies**. v.65, p.73-88, 1999.

NARCHI, W. Comparative study of the functional morphology of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) and *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia, Veneridae). **Bulletin of Marine Science**. v.22, p.643-670, 1972.

NARCHI, W. Ciclo anual da gametogênese de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia). **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**. v.1, p.331-350, 1976.

NELL, J.A. Farming triploid oysters. **Aquaculture**. v.210, p.69-88, 2002.

- NELL, J. A.; O'CONNOR, W. A.; HAND, R. E.; MCADAM, S. P. Hatchery production of diploid and triploid clams, *Tapes dursatus* (Lamar & 1818): a potential new species for aquaculture. **Aquaculture**. v.130, p.389-394, 1995.
- OLIVEIRA, I.; AMORIM, A.; LAVANDER, H.; PEIXOTO, S.; GÁLVEZ, A. O. Spatial and temporal distribution of the shellfish *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) on Mangue Seco beach, Pernambuco, Brazil. **International Journal Aquatic Science**. v.2(1), p.68-79, 2011.
- OLIVEIRA, L.; LAVANDER, H.; RODRIGUES, S.; BRTITO, L. O.; GÁLVEZ, A. O. Crescimento do berbigão, *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) na praia de Mangue Seco, Pernambuco, Brasil. **Arquivos Ciências do Mar**, v.46(1), p.22-28, 2013.
- OLIVEIRA, I.B.; SILVA NETO, S.R.; LIMA FILHO, J.V.M.; PEIXOTO, S.R.M.; GÁLVEZ, A.O. Efeito do período chuvoso na extração do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.9, n.1, p.139-145, 2014.
- OLIVEIRA, R.L.M.; SOUZA, A.B.; LAVANDER, H.D.; ANTONIO, I.G.; GUIMARÃES, I.M.; CARDOSO JR, L.O; PEIXOTO, S.R.M.; GALVEZ, A.O. Acompanhamento das fases de Crescimento da *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), da larva até seu tamanho comercial e testes de diferentes métodos de assentamento em laboratório. In: **Caminhos da Ciência**. Recife: ED. UFRPE. v.2, p.94-115, 2007.
- OLIVEIRA, I.B.; SILVA NETO, S.R.; LAVANDER, H.; LIMA, P.; GÁLVEZ, A.O. Growth and survival of *Anomalocardia brasiliana* larvae (Bivalvia: Veneridae) fed with microalgal diets. **Latin American Journal Aquatic Research**. 44(1):34-38.44(1):2016a.
- OLIVEIRA, R.L.M.; LAVANDER, H.D.; SANTOS, L.B.G.; CALAZANS, N.K.F.; GÁLVEZ, A.O.; PEIXOTO, S.R.M. Hatchery Rearing of the Venerid Clam (Gmelin, 1791). **Journal of Shellfish Research**, v. 35, p. 27-30. 2016b.
- PAULS, E.; AFFONSO, P.R. The karyotype of *Nodipecten nodosus* (Bivalvia: Pectinidae). **Hydrobiologia**. v.420, p.99-102, 2000.
- PAPOULIAS, D. M.; CANDRL. J. Verification of Ploidy and Reproductive Potential in Triploid Black Carp and Grass Carp. **American Fisheries Society Symposium**. v.74, p.000–000, 2010.
- PÉREZ-GARCÍA, C.; CAMBEIRO, J.M.; MORÁN, P.; PASANTES, J.J. Chromosomal mapping of rDNAs, core histone genes and telomeric sequences in *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.395, p.199-205, 2010.

- PEZZUTO, P.R.; ECHTERNACHT, A.M. Avaliação de impactos da construção da via expressa SC-SUL sobre o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Pelecypoda) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (Florianópolis, SC-Brasil). **Atlântica**, v.21, p.105-119, 1999.
- PEZZUTO, P.R.; SCHIO, C.; ALMEIDA, T.C.M. Efficiency and selectivity of the *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Veneridae) hand dredge used in southern Brazil. **Journal of the Marine Biological**. v.90, p.1455-1464, 2010.
- PEZZUTO, P. R.; SOUZA, D. S. A pesca e o manejo do berbigão (*Anomalocardia brasiliiana*) (Bivalvia: Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé, SC, Brasil. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. v.34, p.169-189, 2015.
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J.C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**. v. 293 p.125-156, 2009.
- PRESTON, A.C.; TAYLOR, J.F.; CRAIG, B.; BOZZOLLA, P.; PENMAN, D.J.; MIGAUD, H. Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquaculture**. 414–415, p.160-166, 2013.
- RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. Fundação da Universidade do Rio Grande. 2.ed. Rio Grande. 1994. 368p.
- ROCHA, L.M.; PINKERTON, E. Comanagement of clams in Brazil: a framework to advance comparison. **Ecology and Society**. v.20(1), p.7, 2015. <http://dx.doi.org/10.5751/ES-07095-200107>
- RODRIGUES, A.M.L.; BORGES-AZEVEDO, C.M.; COSTA, R.S.; HENRY-SILVA, G.G. Population structure of the bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, (Gmelin, 1791) in the semi-arid estuarine region of northeastern Brazil. **Brazilian Journal Biology**. v.73, n.4, p.819-833, 2013.
- RODRIGUES, S.; LAVANDER, H.; OLIVEIRA, L.; BATISTA, A.; OLIVEIRA, I.; GÁLVEZ, A.O. Distribuição e abundância relativa do berbigão, *Anomalocardia brasiliiana*, na praia de Mangue Seco, Pernambuco, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**. v.46(2), p.70-75, 2013b.
- RODRIGUEZ-JUIZ, A.M.; M. TORRADO, M.; MENDEZ, J. Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. **Marine Biology**. v.126, p.489-497, 1996.
- RUIZ-VERDUGO, C.A.; ALLEN JR, S.K.; IBARRA, A.M. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of Catarina scallop *Argopecten ventricosus*. **Aquaculture**. v.201, p.19-33, 2001.

SANTOS, J.J.S.; TERCEIRO, A.M.; YAURI, W.L.M. Dinâmica da População de *Anomalocardia brasiliana* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) no Estuário do Rio Paciência, no Município da Raposa, Estado do Maranhão. **Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ**. v.37, p.61-69, 2014.

SCARPA, J.; KOMARU, A.; WADA, K.T. Gynogenetic induction in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**. v.23, p.33-41, 1994.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Alguns aspectos ecológicos e análise da população de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba Estado de São Paulo. 1976. 119p. **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo. São Paulo.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Análise populacional de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**. v.2(29), p. 351-355, 1980.

SILVA-CAVALCANTI, J. S.; COSTA, M. F. Fisheries of *Anomalocardia brasiliana* in Tropical Estuaries. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. v.6(2), p.86-99, 2011.

SILVA-CAVALCANTI, J.S.; COSTA, M.F. Fisheries in protected and non-protected areas: is it different? The case of *Anomalocardia brasiliana* at tropical estuaries of Northeast Brazil. **Journal of Coastal Research**. SI 56, p. 1454-1458, 2009.

SILVA, M.; MATOSO, D.A.; LUDWIG, L.A.M.; GOMES, E.; ALMEIDA, M.C.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. **Environmental Biology Fish.** v.9, p.361-366, 2011. DOI 10.1007/s10641-011-9794-2

SOUSA, J.T.; JOAQUIM, S.; MATIAS, D.; HAMADOU, R.B.H.; LEITÃO, A. Evidence of non-random chromosome loss in bivalves: Differential chromosomal susceptibility in aneuploid metaphases of *Crassostrea angulata* (Ostreidae) and *Ruditapes decussatus* (Veneridae). **Aquaculture**. 344-349, p.239-241, 2012.

STANLEY, J.G.; ALLEN JR., S.K.; HIDU, H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with Cytochalasin B. **Aquaculture** v.23, p.1–10, 1981.

STANLEY, J.G.; HIDU, H.; ALLEN JR., S.K. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. **Aquaculture**. v.37, p.147-155, 1984.

TABATA, Y.A.; RIGOLINO, M.G.; TSUKAMOTO, R.Y. Produção de lotes monossexos femininos triploides de truta arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III - crescimento até idade de primeira maturação sexual. **Boletim do Instituto de Pesca**. v.25, p.67-76, 1999.

- THIRIOT-QUIEVREUX, C. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. **Cahiers de Biologie Marine**. v.43, p.17-23, 2002.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C.; AYRAUD, N. Les caryotypes de quelques especes de bivalves et de gast6ropodes marins. **Marine Biology**. v.70, p.165-172, 1982.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C.; INSUA, A. Nucleolar organizer region variation in the chromosomes of three oyster species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.157, p.33-40, 1992.
- TURGEON, D.D.; LYONS, W.G.; MIKKELSEN, P.; ROSENBERG, G.; MORETZSOHN, F. **Bivalvia (Mollusca) of the Gulf of Mexico**. In: Gulf of Mexico - Origins, Waters, and Biota. Biodiversity. Texas A&M University Press, College Station, Texas. p.711-744. 2009.
- VADOPALAS, B.; DAVIS, J.P. Optimal chemical triploid induction in geoduck clams, *Panopea abrupta*, by 6 dimethylaminopurine. **Aquaculture**. v.230, p.29-40, 2004.
- WADA, K.T.; KOMARU, A.; UCHIMURA, Y. Triploid Production in the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata martensi*. **Aquaculture**. v.76, p.11-19, 1989.
- WALTON, W.C.; RIKARD, F.S.; CHAPLINA, G.I.; DAVIS, J.E.; ARIAS, C.R.; SUPAND, J.E. Effects of ploidy and gear on the performance of cultured oysters, *Crassostrea virginica*: Survival, growth, shape, condition index and *Vibrio* abundances. **Aquaculture**. v.414, p.260-266, 2013.
- WANG, Z.; GUO, X.; ALLEN, S.K.; WANG, R. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. **Aquaculture**. v.204, p.337-348, 2002.
- WANG, Y.; GUO, X. Chromosomal rearrangement in Pectinidae revealed by rRNA loci and implications for bivalve evolution. **Biology Bulletin**. v.207, p.247-256, 2004.
- WORMS Editorial Board (2016). World Register of Marine Species. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2016-01-02
- YAMAMOTO, S.; SUGURAWARA, Y. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. **Aquaculture**. v.72, p.21-29, 1988.
- YANG, H.; GUO, X. Polyploid induction by heat shock- induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. **Aquaculture**. v.252, p.171-182, 2006b.
- YANG, H.; GUO, X. Tetraploid Induction by Inhibiting Mitosis I with Heat Shock, Cold Shock, and Nocodazole in the Hard Clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). **Marine Biotechnology**. v.8, p.501-510, 2006.a
- ZHANG, Q.; YU, H.; HOWE, A.; CHANDLER, W.; ALLEN JR, S.K. Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploid mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg)

and *Crassostrea ariakensis*. **Aquaculture Research**. v.41, p.1658-1667, 2010.
doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02541.x

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; YAN, X.; YU, Z. Phenotypic trait analysis of diploid and triploid hybrids from female *Crassostrea hongkongensis* × male *C. gigas*. **Aquaculture**. 434 (2014) 307–314.

ZHENXING, S.; YANQUN, S.; SHENGCHAO, G.; YAN, Q.; AIGUO, Y. Karyotypes of three species of the marine Veneroida molluscs. **Acta Oceanologica Sinica**. v.22, n.4, p. 671-678, 2003.

5. Artigo científico

5.1 Artigo I

Artigo científico aceito na Revista *Journal Shellfish Reasersh*

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista disponível em: <http://www.shellfish.org/instructions-for-authors>

Meiosis maturation in the marine clam *Anomalocardia brasiliiana* (Veneridae)

Henrique Lavander¹, Genialdo dos Santos², Alfredo Olivera¹, Reginaldo de Carvalho², Marcelo Guerra³ and Maria Raquel M. Coimbra¹

¹Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author: Maria Raquel Moura Coimbra

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dept. de Pesca e Aquicultura, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, 52171-900, Brazil. E-mail: maria.rmcoimbra2@ufrpe.br. Tel: +55-81-33206522

Abstract

Advances in oysters farming have been achieved with biotechnological applications, such as chromosome manipulations aimed at polyploidy. The bivalve *Anomalocardia brasiliiana* is of considerable importance to artisanal fishing activities and is a potential organism for aquaculture in Brazil. The cytogenetic behavior of polar bodies during meiosis provides essential information for chromosome manipulation directed at the production of triploid organisms. The objective of the present study was to identify post-fertilization times in which the polar bodies are expelled and determine

the most frequent number of chromosomes in *Anomalocardia brasiliiana*. Individuals were caught on the coast of the state of Pernambuco, in northeast Brazil, and subsequently induced to release the gametes. Samples of the oocyte solution were taken before and every two minutes after fertilization. The material was fixed in Carnoy's solution, stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and photographed under an epifluorescence microscope. Among the 50 oocytes analyzed in metaphase I, 19 bivalents were found. The release of the first polar body was detected 10 minutes after fertilization among 70% of the eggs, while the second polar body was released at 16 minutes among 62% of the eggs. This work provides relevant information on the time of initiation of shock treatments for chromosome set manipulation, aiming triploids of this important marine fishery resource in Brazil.

Keywords; polar bodies release timing; number of chromosomes, polyploid.

Introduction

Chromosome manipulation is a strategy that has been adopted in aquaculture activities around the world since the 1980s to accelerate the growth of bivalves (Guo et al 2009; Maldonado-Amparo et al. 2016). In Brazil, during 2012 this method began to be used on mollusks, with the culture of the exotic oyster species *Crassostrea gigas* Thurnberg (Melo et al. 2015). Polyploid organisms should not be mistaken with organisms genetically modified by transgenics, since the former only have more chromosomes than the most common number found in nature (Piferrer et al. 2009), whereas the latter have modified genes.

Chromosome manipulation in bivalves requires specific knowledge of the early events after fertilization, such as the time of the release of the polar bodies during meiosis, which is essential to the success of polyploid induction (Eudeline et al. 2000;

Piferrer et al. 2009). In mollusks, meiosis is characterized by a complex regulation partly due to the flow of calcium ions in oocytes (Colas and Dubé 1998). In most bivalves, oocytes are initially blocked in the prophase of meiosis I, but are activated when coming into contact with seawater and progress to metaphase I, remaining in this phase, where the germinal vesicle is no longer apparent and the uncondensed chromatin begins to condense (Colas and Dubé 1998). After fertilization, meiosis proceeds to the anaphase and telophase, followed by the release of the polar bodies and the first mitosis (Colas and Dubé 1998; Eudeline et al. 2000).

Fluorescence microscopy enables the monitoring of chromosome behavior within oocytes before and after fertilization (Li et al. 2000; Thiriot-Quievreux 2002). Chromosome studies provide basic information for understanding the organization of the genome and can contribute to conservation programs towards commercially important species for which populations have been depleted due to overfishing (Amar et al. 2008).

Karyotyping reveals important genetic characteristics and it is being used in taxonomic studies of bivalves (García-Souto et al 2016). The loss or gain of chromosomes (aneuploidy) has been studied in different species of bivalves of economic importance to assess the effect on growth (Sousa et al. 2012).

The clam *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin 1791) belongs to the family Veneridae and is distributed from the southern portion of the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea to Brazil (Turgeon et al. 2009). This family constitutes one of the most common ones found in all seas, including 500 species, many of which are commercially important due to their dominant benthic position (Canapa et al. 2003). *A. brasiliiana* is one of the most frequently caught marine bivalves in Brazil and has considerable socio-economic importance to artisanal fishing activities, especially in the northeast region of the country (Rodrigues et al. 2013; Oliveira et al. 2016a), as

well as aquaculture potential (Mouëza et al. 1999; Boehs et al. 2008; Lagreze et al. 2015; Oliveira et al. 2016a; Oliveira et al. 2016b).

The aim of the present study was to investigate the release of polar bodies and monitor meiotic development, including the most frequent number of chromosomes in *A. brasiliiana*, to establish a basis for future chromosome manipulation for aquaculture purposes.

Materials and Methods

Clams were collected from the coastal zone of Pernambuco (northeast Brazil) (7°49'18.57"S and 34°50'11.31"W). All individuals were larger than 13 mm, which is considered to be the size at first sexual maturity (Barreira and Araújo, 2005). They were kept in a fiberglass tank with 300 liters of sea water at a temperature of 22 °C and salinity of 35 g L⁻¹ for 24 hours.

Gametes release was induced by heating the water (Lavander et al. 2014), when males and females could be identified and, separated into different beakers. Oocytes were filtered with a mesh size of 35 µm and kept in one liter of sea water at 26 °C and salinity of 35 g L⁻¹, while sperm cells were kept in 200 mL of sea water under the same conditions. The mean number of oocytes released per female (mean length: 27 ± 1.75 mm) was approximately 100 thousand.

Two different experiments were first conducted to evaluate the influence of seawater temperature and salinity on meiosis. In the first experiment, salinity was set at 35 g L⁻¹ and the treatments were performed at 19, 26 and 32°C (each in triplicate). Two samples (2 mL) were collected from each experimental unit of 100 mL every five minutes after fertilization for a period of 25 minutes and fixed in a solution of formalin and sea water (4%). In the second experiment, the temperature was set at 26°C and treatments were performed with salinity of 15, 25 and 35 g L⁻¹ (each in triplicate).

After defining the best fertilization conditions, new experiments were conducted to monitor meiotic development and to determine the period of the release of the polar bodies and first mitosis in experimental units of five liters. Five hundred mL of oocyte-sperm solution were collected from each unit, filtered with a mesh size of 35 μm , concentrated and preserved in Carnoy's solution (absolute ethanol and acetic acid [3:1]).

Oocyte samples were collected and fixed prior to fertilization and eggs were collected and fixed at 8, 10, 13, 16, 19, 25, 30 and 35 minutes after fertilization. The time of the release of the first and second polar bodies and first mitosis was recorded when observed in more than 50% of the eggs. Cell counts were performed using epifluorescence microscopy.

In order to determine the number of chromosomes, the oocytes released into the water were fixed in Carnoy's solution, transferred to fresh fixative after 30 minutes and stored in a freezer. The oocytes were rinsed with distilled water and stained in 8 μL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at a concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ (Barros Silva and Guerra 2009). The slides were then mounted in DAPI/glycerol (1:1, v/v) and analyzed using epifluorescence microscopy. Alternatively, after staining with DAPI, further staining was performed with chromomycin A3 (CMA) at a concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$, followed by mounting in glycerol. In this case, the slides were kept for at least two days in the dark to stabilize the CMA prior to the analysis (Barros Silva and Guerra 2009). Images were captured with a camera coupled to the fluorescence microscope using the Leica QFISH software program and chromosomes were measured with the aid of the MicroMeasure software program.

Statistical analysis was performed using the Assistat 7.7 program. The Shapiro-Wilk test and Cochran's test have demonstrated normal distribution and homogeneity of variance, respectively. The data was submitted to analysis of

variance (ANOVA), followed by Tukey's test. A p-value < 0.05 was considered significant.

Results and Discussion

In the water temperature experiment, the highest percentage of oocytes without a polar body occurred at 19°C, indicating delayed meiotic development, with a non-development rate of 75.93%, even after 25 minutes. This non-development rate differed significantly from the rates observed at 26°C and 32°C for the same period (5.71 and 1.84%, respectively). At a temperature of 26°C, polar bodies occurred in 58.90% of the samples after 10 minutes, which was higher than the rates found at 32°C (35.32%) and 19°C (2.59%). At a temperature of 26°C, the first mitotic division occurred after 15 minutes in 54% of the eggs and after 25 minutes in 84%, showing a gradual increase over time. This behavior was different at 32°C, as 28.34% of the eggs were already undergoing mitotic division at 10 minutes. In contrast, the rate did not reach 8% at 19°C, even after 25 minutes. The eggs developed more quickly at 32°C and the rate of deformed eggs was highest at this temperature (25.87% at 10 minutes and 52.15% at 25 minutes), whereas the rate was less than 7% at 26°C and 19°C (Figure 1).

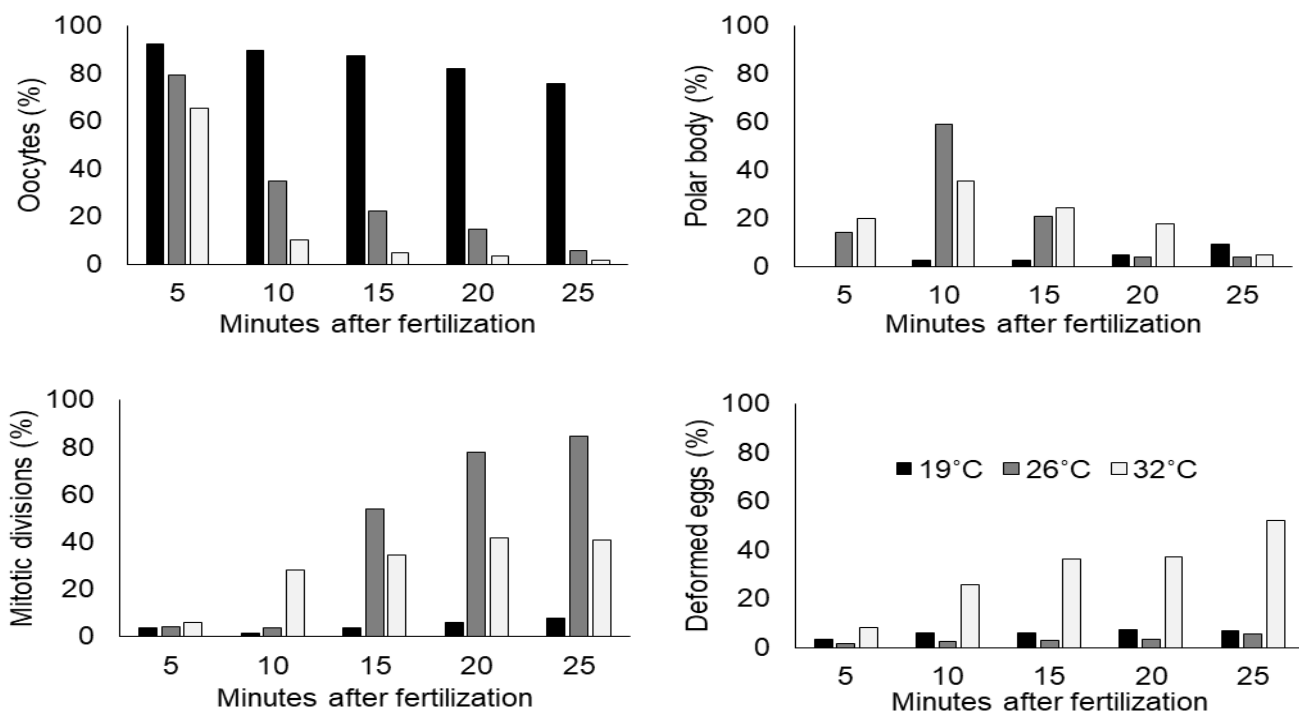


Figure 1 Eggs behavior at different temperatures in the first 25 minutes after fertilization.

Based on the findings, the best meiotic development occurred at a temperature of 26°C, with more than 50% of the eggs having released the first polar body after ten minutes. This rate was significantly different in comparison to 19°C and 32°C (ANOVA). Moreover, the percentage of deformed eggs was lowest at 26°C.

In the salinity tests at 25 minutes 97.56% and 73.28% of the oocytes remained unfertilized without a polar body in 15 g L⁻¹ and 25 g L⁻¹, respectively, whereas this rate was less than 12% in 35 g L⁻¹ for the same period. At 10 minutes, polar bodies were found in 64% of the eggs in 35 g L⁻¹. In contrast, polar bodies were found in only 3.59% of the eggs in 25 g L⁻¹ and 0% in 15 g L⁻¹. No mitotic divisions occurred in salinities of 15 g L⁻¹ or 25 g L⁻¹ over the 25 minutes of observation time, whereas mitotic divisions were found in more than 65% of the eggs in 35 g L⁻¹ after 25 minutes post fertilization. No deformed eggs were found in any of the salinity treatments (Figure 2).

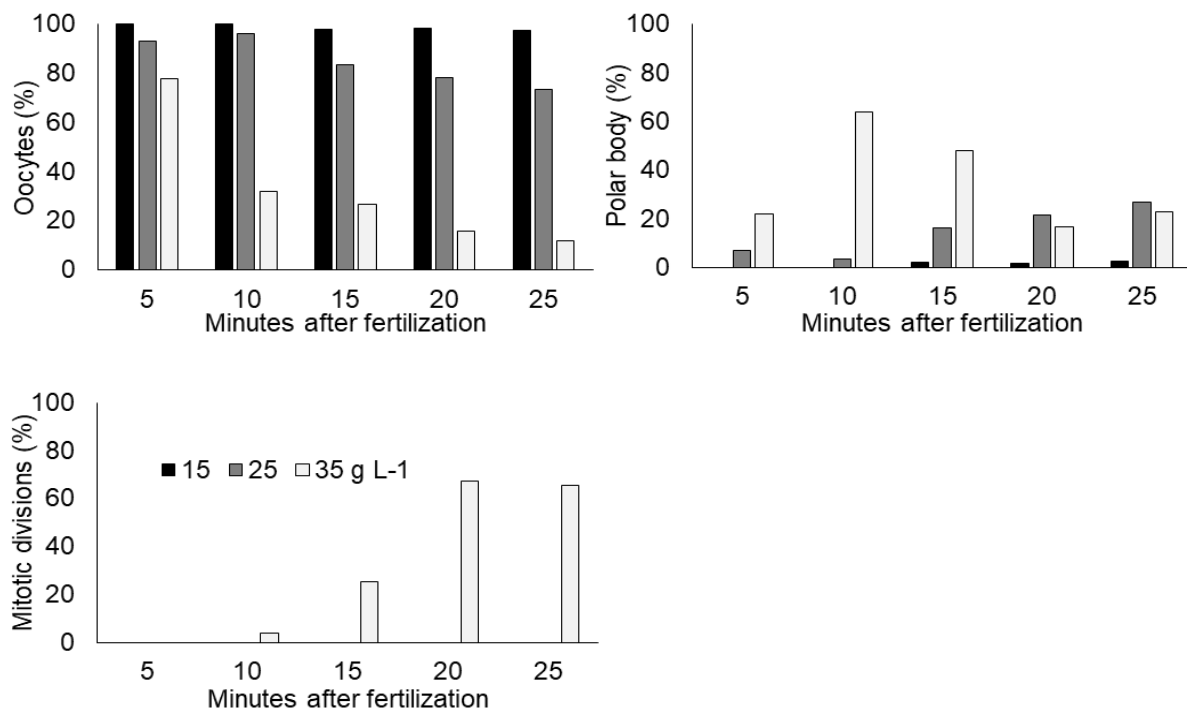


Figure 2 Eggs behavior in different salinities in the first 25 minutes after fertilization.

Thus, the best meiotic development occurred at a salinity of 35 g L⁻¹, when more than 50% of the eggs had released the first polar body after ten minutes. This rate was significantly different when compared to the other salinity treatments (ANOVA).

The most appropriate conditions for the initial development of embryos during meiosis and the first mitotic divisions were found at the temperature of 26°C and salinity of 35 g L⁻¹. These conditions were subsequently used during the monitoring of meiosis using fluorescence microscopy.

Soon after being released into the water, the oocytes were in metaphase I, with condensed chromosomes. The most frequent haploid number found in 50 metaphase I oocytes was $n = 19$ chromosomes (Figures 3A and 3B) (diploid $[2n] = 38$ chromosomes). Out of 19 bivalents observed, only one had a region that was strongly stained by CMA (CMA+), a region rich in guanine and cytosine (GC), and apparently none were stained by DAPI+ (Figure 3C). The presence of a bivalent with

a CMA+ band at opposite extremities suggests the occurrence of a single nucleolus organizer region (NOR), as NORs generally form a CMA+ band (Guerra et al. 2000). All bivalents measured were between 1.38 and 1.89 μm (mean: 1.55 μm). Since the cells were not pre-treated with an anti-mitotic agent, morphology was only evident in some chromosomes. In those that appeared more separated into mitotic metaphases, the chromosomes were either metacentric or submetacentric and small (1.53 μm).

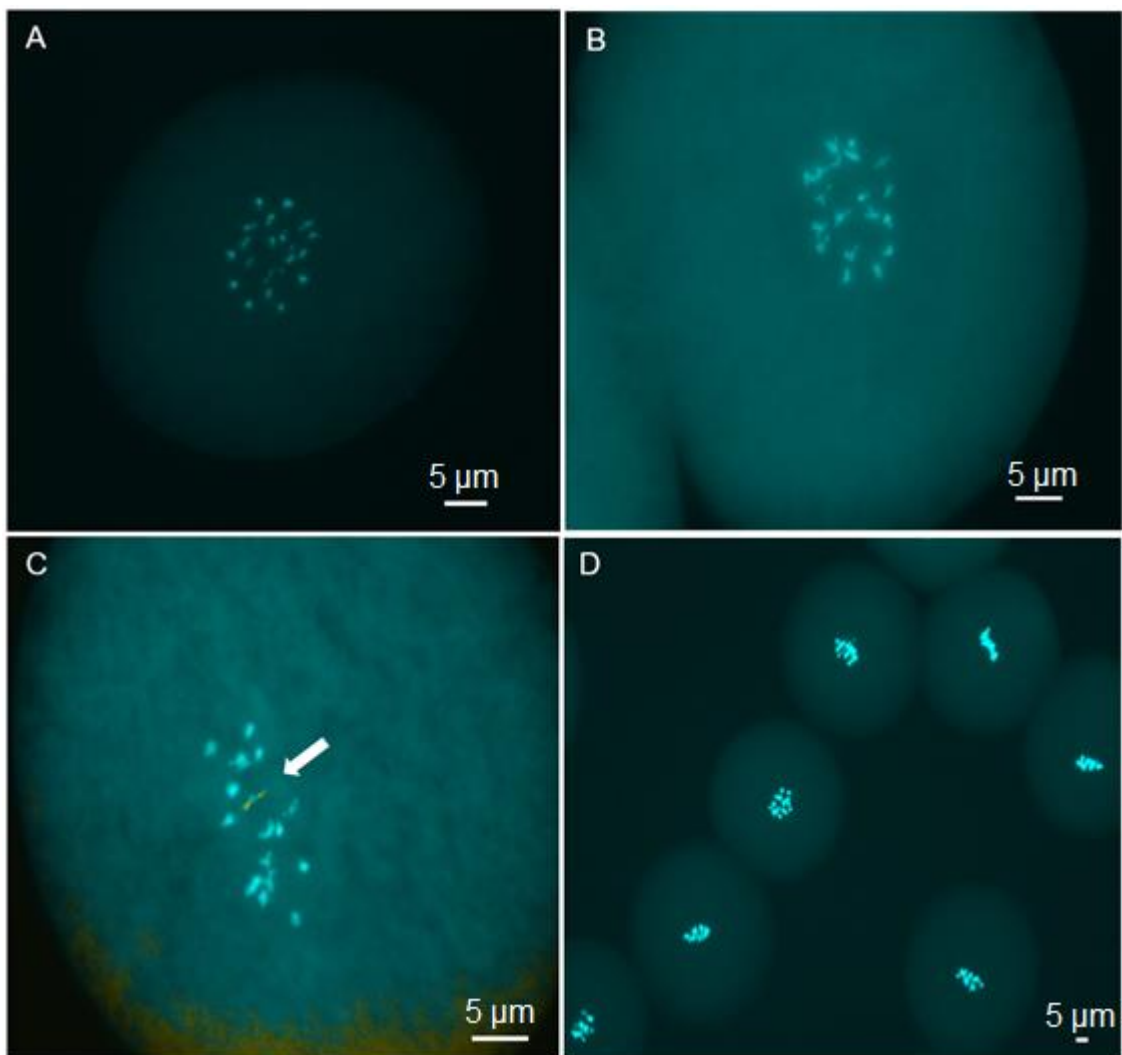


Figure 3 Stages of meiosis in oocytes of *A. brasiliiana*. Cells in final diplotene stained with DAPI (A and B) showing 19 bivalents and metaphase I stained with CMA/DAPI (C). (D) Seven cells in metaphase I. Arrow shows a single bivalent marked with CMA in early anaphase I.

Meiotic development and the release of the first polar body are illustrated in Figures 4 and 5. Ten minutes after fertilization, more than 70% of the eggs have released the first polar body (Figure 4A and 4B). The release of the second polar body occurred six minutes later (16 minutes after fertilization) in 62.67% of the eggs (Figure 4C and 5). First mitosis happened in more than 80% of the eggs by 35 minutes (Figures 4D and 5).

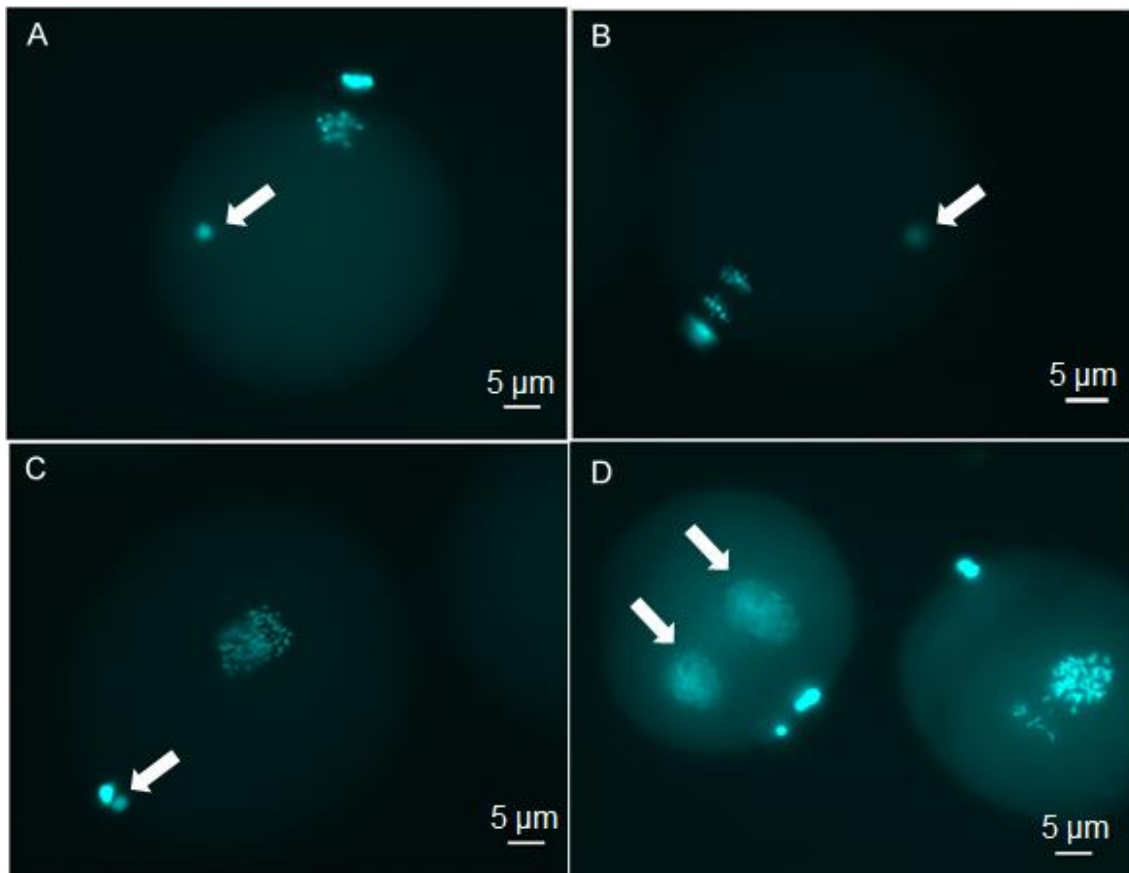


Figure 4 Polar bodies and first mitosis. (A) Prometaphase II, with first polar body outside cell and spermatic nucleus inside cell (arrow). (B) Anaphase II, with two anaphasic plates on periphery of oocyte and first polar body outside cell. Note spermatic nucleus inside cell (arrow). (C) First and second polar body. (D) Cells with nuclei of male and female gametes in interphase stage, with non-condensed chromatin (arrow on left) and chromosomes in metaphase (arrow on right).

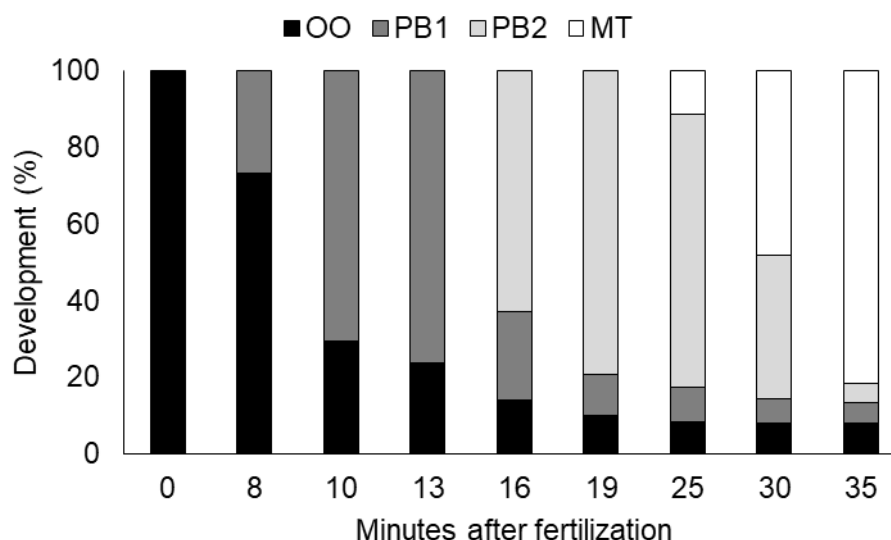


Figure 5 Timing of PB1 and PB2 releases and first mitosis in embryonic development of *A. brasiliana*. OO - oocytes; PB 1 – first polar body; PB 2 – second polar body; MT – first mitosis.

In this study, seawater temperature and salinity affected the development of the eggs, which is in agreement with data described in the literature. An increase in temperature accelerates the release of the polar bodies in diploid and triploid oysters (Eudeline et al. 2000), while low salinity alters meiotic development (Madrones-Ladja 2002). Thus, both temperature and salinity affect the speed of events in the initial stages of embryology in bivalve mollusks (O'Connor and Lawler 2004; Wang et al. 2012). Other factors that can affect meiosis in bivalve mollusks include changes in the pH of seawater due to the acidification of the oceans (Barros et al. 2013) and the concentration of calcium ions, which can reinitiate meiosis during the maturation of oocytes (Zhang et al. 2009).

According to Moueza et al. (1999), the release of the first polar body occurred ten minutes after fertilization and the first mitotic divisions, after 30 minutes. These results were observed at a temperature of 25°C and salinity of 34 g L⁻¹, but the authors did not record the time of the release of the second polar body.

According to figure 5, it is possible to estimate the time necessary to obtain 50% of PB1 and PB2 extrusion and, thus, the optimal time to begin the triploidisation

induction. In order to block the first polar body release, the treatment should be applied prior to 9 minutes post-fertilization, whereas for blocking the second polar body release, the treatment should be applied prior to 14 minutes post-fertilization. Both experiments were conducted at 26°C and salinity of 35 g L⁻¹. Yet for the tetraploidisation induction, the treatment should be carried out prior to 30 minutes post-fertilization.

In mollusks, the manipulation of the chromosomal set aiming triploidy can be achieved by using physical or chemical shocks during meiosis I (first polar body), II (second polar body) or both (Colas and Dubê 1998; Piferrer et al. 2009; Guo et al. 2009; Cheney 2010; Maldonado-Amparo et al. 2016). Triploidy is usually produced by blocking meiosis II. During normal development, second polar body is released, leaving the egg with one set of maternal chromosomes. The maternal set of chromosomes unites with the paternal set from the sperm and forms a diploid zygote. The retention of second polar body adds an extra set of maternal chromosomes to the diploid zygote, producing triploidy (Guo et al. 2009).

The induction of polyploidy in bivalve mollusks is mainly performed by chemical means (Piferrer et al. 2009), but temperature and salinity have recently been successfully used for this purpose (Yang and Guo 2006; Meng et al. 2012). Thus, knowledge on meiotic development can assist in the establishment and adaptation of protocols for inducing polyploidy.

The most frequent number of chromosomes in the family Veneridae is $2n = 38$, but this number can range from 12 to 40 among bivalves (Thiriot-Quievreux 2002). Studying five species of the family Veneridae, *Venerupis pullastra* (Montague 1803), *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758), *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve 1850), *Dosinia exoleta* (Linnaeus 1758) and *Venus verrucosa* (Linnaeus 1758), Pérez-García et al. (2014) found 38 chromosomes in mitotic metaphases and 19

bivalents during prophase I of meiosis. Karyotypes have recently been described for native species of bivalve mollusks in Brazil, including *A. brasiliiana*, for which Sousa et al. (2014) reported $2n = 14$, which differs from numbers described for the family Veneridae as well as the number described in the present study.

Species of the family Veneridae exhibit considerable morphological variations, such as distinct color patterns, and are often confused with other species. Thus, alternative methods, such as molecular analyses and karyotyping are useful complements for species identification (Lapègue et al. 2002). Deng et al. (2008) found morphometric differences among populations of *Meretrix meretrix* (Linnaeus 1758) Veneridae as well as in specific chromosome characteristics, although the number of chromosomes was constant ($2n = 38$) in the different populations. Abdel-Basset et al. (2004) studied karyotype characteristics, such as chromosome size and variable morphology, including metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes, and reported chromosome length ranging from 1.90 to 0.46 μm in *Venus verrucosa* and 1.10 to 0.50 μm in *Ruditapes decussatus*, both from the family Veneridae.

This is the first study to monitor meiotic events in *A. brasiliiana* for the identification of the time of release of the two polar bodies and of the first mitosis and the description of the most frequent number of chromosomes, which was compatible with numbers described for the family Veneridae. The present findings contribute to the knowledge on the biology of the species and offer important information for establishing biotechnological strategies, such as the induction of polyploidy for purposes of aquaculture.

Acknowledgments The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for awarding a doctoral scholarship to the first author.

Ethical approval “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

References

- Abdel-Basset ME, Fayza MA. 2004. Cytogenetic Studies on Metaphase Chromosomes of Six Bivalve Species of Families Mytilidae and Veneridae (Nucinelloidea, Mollusca). *Cytologia* 69(3):261-273.
- Alves R, Magalhães ARM. 2010. Método para obtenção de metáfases mitóticas de ostras para o estudo do cariótipo. *Biotemas*, 23 (1): 111-119.
- Amar G, Rojas CP, Von Brand E, Jara-Seguel P. 2008. Karyotype study in the surf clam *Mesodesma donacium* Lamarck, 1818 (Bivalvia Veneroida: Mesodesmatidae) *Gayana* 72:12-22.
- Bantoto-Kinamot V. 2016. Effects of induced spawning on early development in snout otter clam, *Lutraria philippinarum* (Deshayes, 1854) (Bivalvia: Mactridae). *Iran. J. Fish. Sci.* 15(3)1230-1236.
- Barreira CAR, Araújo MLR. 2005. Ciclo reprodutivo de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1971) (Mollusca Bivalvia: Veneridae) na praia do Canto da Barra, Fortim, Ceará, Brasil *Bol. Inst. Pes.* 31:9-20.
- Barros Silva AE, Guerra M. 2009. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures *Biotechnic & Histochemistry*. DOI:10.1080/10520290903149596

- Barros P, Sobral P, Range P, Chícharo L, Matias D. 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 440: 200-206.
- Boehs G, Absher TM, Cruz-Kaled AC. 2008. Ecologia Populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Bol. Inst. Pesc. 34(2):259-270.
- Canapa A, Schiaparelli S, Marota I, Barucca, M. 2003. Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). Mar. Biol. 142:1125-1130.
- Cheney DP. 2010. Bivalve Shellfish Quality in the USA: From the Hatchery to the Consumer J. W. Aquac. Soc. 41(2):192-206.
- Colas P, Dubé F. 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. Sem. Cell & Develop. Biol. 9: 539-548.
- Deng Y, Du X, Huang R, Wang Q. 2008. Morphological and karyotypic variation in three wild populations of *Meretrix meretrix* Chin. J. Ocean. Limno. 26:76-80.
- Dong Y, Yao H, Lin Z, Zhu D. 2012. The effects of sperm- egg ratios on polyspermy in the blood clam, *Tegillarca granosa*. Aqua. Res. 43:44-52.
- Eudeline B, Allen JR SK, Guo X. 2000. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid Production. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 247: 151-161.
- García-Souto D, Pérez-García C, J Kendall J, Pasantes JJ. 2016. Molecular Cytogenetics in Trough Shells (Mactridae, Bivalvia): Divergent GC-Rich Heterochromatin Content. Genes 7, 47, 1-10.
- Guerra M, Santos KGB, Silva AEB, Ehrendorfer F. 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Auranthioideae: a case of parallel chromosomal evolution Amer. J. Botany. Ithaca. 87(5):735-747.

- Guo X, Wang Y, Xu Z, Yang H. 2009. Chromosome set manipulation in shellfish. p 165-195 in: New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental management, G. Burnell and G. Allan (eds). Woodhead Publishing.
- Lagreze FJS, Albuquerque MCP, Araujo J, Sühnel S, Melo CMR. 2015. Survival and growth of the native clam *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) larvae in laboratory. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 41(1): 133-143.
- Lapegue S, Boutet I, Leitaó A, Heurtebise S, Garcia P, Thiriót-Quievreux C, Boudry P. 2002. Trans-atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. Biol. Bull. 202:232-242.
- Lavander HD, Silva Neto SR, Sobral SC, Lima PCM, Rêgo MG, Gálvez AO. 2014. Manutenção e reprodução de *Anomalocardia brasiliiana* em condições laboratoriais. Rev. Bras. Ciên. Agr. 9(2):269-276.
- Li Q, Osada M, Kashiara M, Hirohashi K, Kijima A. 2000. Meiotic maturation, fertilization and effect of ultravioleta irradiation on the fertilizing sperm in the Japanese scallop Fish. Scien. 66:403-405.
- Madrones-Ladja JA. 2002. Salinity effect on the embryonic development, larval growth and survival at metamorphosis of *Placuna placenta* Linnaeus (1758) Aquac. 214:411-418.
- Maldonado-Amparo R, Verdugo CAR, Ibarra AM, Rueda-Puente EO, Del Toro Sánchez CL, Félix FR. 2016. Poliploidia en Moluscos de Importancia Comercial. A Review. European Scientific Journal.12 (33), 69-102.
- Melo EMC, Gomes CHAM, Silva FC, Sühnel S, Melo CMR. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 41(4): 889-898.

- Meng Q, Bao Z, Wang Z, Wang S, Hu J, Hu X, Huang X. 2012. Growth and reproductive performance of triploid yesso Scallops (*Patinopecten yessoensis*) induced by hypotonic shock J. Shell. Res. 31(4):1113-1122.
- Mouëza M, Gros O, Frenkiel L. 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). J. Moll. Stud. 65:73-88.
- O'Connor WA, Lawler NF. 2004. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Roding Aquac. 229:493-506.
- Oliveira IB, Silva Neto SR, Lavander H, Lima P, Gálvez AO. 2016a. Growth and survival of *Anomalocardia brasiliiana* larvae (Bivalvia: Veneridae) fed with microalgal diets. Lat. Am. J. Aquat. Res. 44(1):34-38.
- Oliveira RLM, Lavander HD, Santos LBG, Calazans NKF, Gálvez AO, Peixoto SRM. 2016b. Hatchery Rearing of the Venerid Clam (Gmelin, 1791). J. Shell. Res., v. 35, p. 27-30.
- Pérez-García C, Hurtado NS, Morán P, Pasantes JJ. 2014. Evolutionary Dynamics of rDNA Clusters in Chromosomes of Five Clam Species Belonging to the Family Veneridae (Mollusca, Bivalvia). Biom. Res. Int. DOI:10.1155/2014/754012
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquac. 293:125-156.
- Rodrigues AML, Borges-Azevedo CM, Costa RS, Henry-Silva GG. 2013. Population structure of the bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, (Gmelin, 1791) in the semi-arid estuarine region of northeastern Brazil. Braz. J. Biol. 73(4):819-833.
- Sousa JT, Joaquim S, Matias D, Hamadou RBH, Leitão A. 2012. Evidence of non-random chromosome loss in bivalves: Differential chromosomal susceptibility in

aneuploid metaphases of *Crassostrea angulata* (Ostreidae) and *Ruditapes decussatus* (Veneridae) Aquac.344-349:239-241.

Sousa MAN, Costa EL, Melo NJA, Pinheiro MJC, Silva RK. 2014. Cariótipos inéditos de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) e *Donax striatus* (Linnaeus, 1767) (Bivalvia: Donacidae) de praias do litoral Potiguar. Rev. Saúd. Ciên. On line 3(3):217-228.

Thiriot-Quievreux C. 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. Cah. Biol. Mar. 43:17-23.

Turgeon DD, Lyons WG, Mikkelsen P, Rosenberg G, Moretzsohn F. 2009. Bivalvia (Mollusca) of the Gulf of Mexico. In: Gulf of Mexico - Origins, Waters, and Biota. Biodiversity. Texas A&M University Press, Texas. p.711-744.

Wang H, Zhu X, Wang Y, Luo M, Liu Z. 2012. Determination of optimum temperature and salinity for fertilization and hatching in the Chinese pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker). Aquac. 358-359:292-297.

Wang H, Liu J, Yang H, Liu J, Liu Z. 2014. Effect of simultaneous variation in temperature and ammonia concentration on percent fertilization and hatching in *Crassostrea ariakensis*. J. Thermal Biol. 41:43-49.

Yang H, Guo X. 2006. Polyploid induction by heat shock- induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. Aquac. 252:171-182.

Zhang T, Wang Q, Yang H. 2009. Involvement of Ca²⁺ signaling pathway during oocyte maturation of the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria* J. Shell. Res. 28(3):527-532.

5.2 Artigo II

Artigo científico a ser enviado para a revista especializada.

Sobrevivência após indução à triploidia em *Anomalocardia brasiliana* (Veneridae) por tratamento químico, hipotônico e térmico

Resumo

A poliploidia é uma alternativa para melhorar o desempenho zootécnico e é amplamente empregada na aquicultura mundial. No Brasil, o emprego de técnicas na escala comercial limita-se a uma espécie exótica de ostra *Crassostrea gigas*. O objetivo deste estudo foi avaliar a sobrevivência após aplicação de protocolos de indução à triploidia em *Anomalocardia brasiliana* através de agentes químicos, como Citocalasina B (CB) e 6 - Dimetilaminopurina (6-DMAP), e métodos físicos, por choque térmico frio e choque hiposmótico. A indução à triploidia por CB foi realizada a 1 mg. L⁻¹, enquanto que a 6-Dimetilaminopurina a 450 µmol.L⁻¹. As induções por choque térmico frio foram realizadas a 2, 5 e 7°C, e as induções por choque hiposmótico a 12‰ de salinidade. As induções químicas à triploidia apresentaram baixa sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, diferentemente dos tratamentos físicos, estes obtiveram mais de 90% de sobrevivência, assim como o tratamento controle. Estes resultados demonstram que os tratamentos físicos neste período são menos agressivos aos ovos e larvas. Porém novos estudos deverão ser realizados, a fim de aprimorar os protocolos para obtenção de poliploides para espécie.

Palavras-chave: Veneridae; triploidia; choque hipotônico; choque frio.

Introdução

Os moluscos estão entre as principais espécies capturadas pela pesca e produzidas pela aquicultura ao redor do mundo. A produção aquícola de moluscos se destaca no cenário mundial com mais de 16,4 milhões de toneladas, correspondendo a 21% da produção total de pescado em 2015 (FAO 2016).

A poliploidia tem sido amplamente utilizada pela aquicultura mundial nas últimas décadas como alternativa para aumentar a produção de espécies comerciais. Bivalves triploides (3n) contêm três conjuntos cromossômicos e são produzidos desde 1981, enquanto os tetraploides (4n) com quatro conjuntos cromossômicos desde 1994 (Piferrer et al. 2009).

Os moluscos diploides, aqueles que apresentam dois conjuntos cromossômicos, são os mais frequentes no ambiente natural. Estes herdam um conjunto materno de cromossomos e outro paterno, porém esta condição pode ser alterada através da manipulação cromossômica a fim de melhorar o crescimento (Guo et al. 2009). O melhor rendimento produtivo dos

bivalves triploides na aquicultura é reconhecido principalmente por causa de sua esterilidade que promove uma melhor taxa de crescimento (Nell 2002). A importância de se obter moluscos bivalves tetraploides é devido a sua capacidade reprodutiva e possibilidade de produção natural de triploides em laboratório (Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009; Peachey e Allen 2016).

Três hipóteses têm sido propostas para explicar o crescimento superior nos moluscos triploides (Wang et al. 2002). A primeira sugere que a esterilidade dos triploides faz com que a energia que seria usada na reprodução seja transferida para o crescimento. Já a segunda hipótese, aponta para o aumento da heterozigosidade dos triploides. Triploides obtidos a partir da retenção da meiose I são mais heterozigotos do que aqueles produzidos pela retenção da meiose II e dos diploides de acordo com os resultados de Stanley et al. (1984) e Hawkins et al. (1994). E a terceira hipótese sugere o aumento do tamanho das células, já que as células triploides têm 50% a mais de DNA.

A interação entre organismos cultivados e selvagens, ambos diploides, representa um dos principais desafios ambientais enfrentados pela aquicultura. Os escapes em aquicultura são frequentes e os triploides constituem uma alternativa a essa introdução genética, uma vez que não reproduzem (Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009; Fjellidal et al. 2014).

Os métodos mais tradicionais usados para induzir a triploidia em bivalves utilizam químicos como a citocalasina B (CB) e 6 -dimetilaminopurina (6-DMAP). O método físico mais usado é através da manipulação da temperatura, técnica eficiente e que não apresenta risco de toxicidade (Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009; Melo et al. 2015; Peachey e Allen 2016), assim como o tratamento hipotônico (Wang et al. 2009; Kong et al. 2011; Meng et al. 2012; Zhang et al. 2014).

O objetivo dos métodos de indução à triploidia é promover a interrupção da meiose, quer seja pela retenção do primeiro corpo polar (Meiose I) ou do segundo corpo polar (Meiose II) (Colas e Dubê 1998; Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009). Estes métodos não garantem que 100% dos indivíduos sejam triploides, devido ao desenvolvimento assincrônico dos ovos durante a meiose (Li et al. 2000). Outra forma de se obter triploides é através do cruzamento de tetraploides e diploides (Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009). Atualmente, este método é o mais usado na produção comercial, por produzir 100% de triploides, o método também diminui o risco para o manipulador (Piferrer et al. 2009; Peachey e Allen 2016).

O Brasil passou a produzir ostras triploides somente nos últimos anos, usando a espécie exótica *Crassostrea gigas* (Melo et al. 2015). No entanto, não há registros no país de cultivo de bivalves nativos triploides ou tetraploides, tampouco estudos referentes à poliploidia em espécies nativas com potencial aquícola.

A *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), pertencente à família Veneridae, pode ser encontrada no Atlântico desde o México até o Brasil (Turgeon et al. 2009). A espécie apresenta grande importância econômica e social para pesca, mas seus estoques estão sobrexplotados com sinais de redução do tamanho médio de captura. O desenvolvimento recente de protocolos de produção de sementes trouxe a possibilidade de inseri-la em sistemas comerciais de aquicultura (Lagreze et al. 2015; Oliveira et al. 2016a). Neste sentido, a triploidia pode ser uma alternativa para aquicultura desta espécie, contribuindo assim com a atividade pesqueiro. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sobrevivência larval de *Anomalocardia brasiliiana* após a aplicação de diferentes métodos químicos e físicos de indução à triploidia com a finalidade de subsidiar o desenvolvimento de um protocolo eficiente de indução à técnica.

Material e métodos

Os mariscos foram capturados no litoral brasileiro, ao norte de Pernambuco (região nordeste), na praia de Mangue Seco nas coordenadas 7°49'18.57"S e 34°50'11.31"W, e no sul do Espírito Santo (região sudeste), na praia de Piúma nas coordenadas 20°50'39.45"S e 40°43'25.60"W. Os gametas foram obtidos por indução, através da manipulação da temperatura, alimentação e adição de gametas na água de acordo com Lavander et al. (2014). Durante o início da liberação dos gametas na água dos tanques de reprodução, machos e fêmeas foram identificados e separados em béqueres distintos. Os ovócitos foram filtrados em malhas de 35µm e mantidos em um litro de água marinha a 26°C e 35‰ de salinidade, e contabilizados com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter e microscópio óptico para fertilização e preparação dos experimentos.

As induções químicas à triploidia foram realizadas no Laboratório de Maricultura Sustentável em Pernambuco, no Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os ensaios foram realizados com dois tratamentos: 1) com citocalasina B (CB) a 1 mg. L⁻¹ e 1 ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO), e 2) com 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) a 450 µmols.L⁻¹ (McCombie et al., 2005; Melo et al., 2015). As soluções foram manipuladas no Laboratório de Genética Aplicada, no Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Após a fertilização dos gametas, os ovos foram submetidos aos tratamentos separadamente, aos nove minutos após fertilização de acordo com Lavander et al. (2017) (momento próximo à liberação do primeiro corpo polar). Assim os ovos foram expostos durante 15 minutos a indução por CB e por 6-DMAP, após este período, os ovos provenientes do tratamento com CB, foram imersos em solução de DMSO a 1% por mais 15 minutos,

lavados em água marinha e filtrados em malhas de 35µm. Já na indução por 6-DMAP, os ovos foram apenas lavados em água marinha e filtrados em malhas de 35µm.

Os experimentos de indução química foram conduzidos em béqueres de 300 ml, com três repetições para cada tratamento CB, 6-DMAP e controle (sem manipulação química). Cada repetição apresentava dois mil ovos, densidade média de aproximadamente sete ovos/ml. Após a indução, os ovos foram armazenados em incubadoras com 30 litros de água marinha a 26°C de temperatura e 35‰ de salinidade até atingir a fase larval D – véliger após 24 horas.

As induções à triploidia por choque térmico frio foram realizadas de acordo com Yang e Guo, (2006), com adaptações para espécie *A. brasiliiana*, onde os ovos obtidos foram fertilizados em 26°C e expostos em experimentos separados, a 2, 5 e 7°C por 15 minutos, depois transferidos para 26°C. O outro método físico utilizado foi o choque hiposmótico, de acordo com adaptações dos protocolos de Kong et al. (2011), Meng et al. (2012) e Zhang et al. (2014). Os ovos obtidos foram fertilizados nas mesmas condições de temperatura descritas anteriormente e mantidos a 35‰, e então, expostos a 12‰ de salinidade por 15 minutos, durante a liberação do primeiro corpo polar, depois re-transferidos para 35‰. Os tratamentos físicos foram realizados com três repetições, nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

Estes experimentos foram realizados em dois locais: 1) no Laboratório de Maricultura Sustentável em Pernambuco, em que 105 mil ovos por repetição foram usados para a indução por choque térmico, 75 mil ovos por repetição no choque hipotônico, enquanto que para o controle 90 mil ovos foram utilizados, com densidade média entre 250 e 350 ovos/ml. Após o método de indução, os ovos foram armazenados em incubadoras com 30 litros de água marinha, com densidade média entre 2,5 e 3,5 larvas/ml. 2) no Laboratório de Nutrição e Produção de Organismos Aquáticos no Espírito Santo. Cada repetição apresentava entre 2 mil e duzentos a 3 mil ovos, e densidade média entre 7 e 10 ovos/ml.

A taxa de sobrevivência foi calculada para cada tratamento, pela relação do número de larvas vivas após 24 horas. Tais procedimentos foram realizados com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter e microscópio óptico, assim como fotografadas. Os resultados foram descritos através do valor percentual médio e desvio padrão entre as repetições de cada tratamento.

Amostras dos gametas (ovócitos e espermatozoides) foram realizadas durante a fertilização e liberação do corpo polar. Estes foram enxaguados com água destilada e corados em 8 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) a uma concentração de 2 µg / mL (Lavander

et al. 2017). As imagens foram capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio de fluorescência usando o programa de software Leica QFISH.

Resultados e Discussão

Os experimentos foram iniciados após a fertilização, período de meiose I antes da saída do primeiro corpo polar (Figura 1A e B).

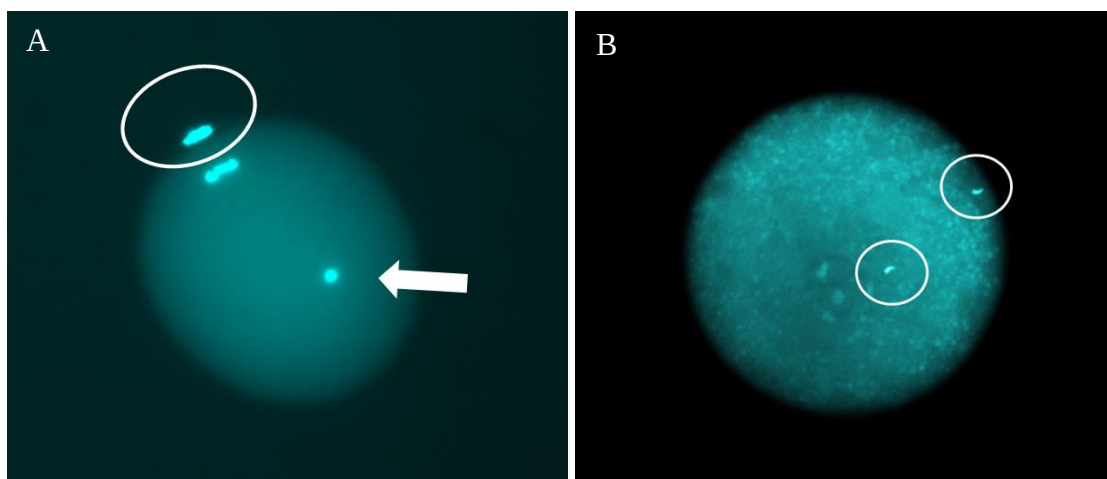


Figura 1 – Gametas de *Anomalocardia brasiliana*. (A) Em destaque no círculo, a liberação do primeiro corpo polar dez minutos pós-fertilização do ovo e seta indicando material genético masculino. (B) Ovócito com espermatozoides na parte externa em destaque nos círculos, momento antes da fertilização. Imagens obtidas em microscopia de epifluorescência com corante 4’6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

A indução química à triploidia por CB demonstrou baixa sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, com 29,35%. Neste tratamento, apenas 587 larvas D véliger sobreviveram por réplica. Na indução por 6-DMAP, a sobrevivência larval foi de 42,50% e apenas 845 larvas D véliger por réplica, sobreviveram as primeiras 24 horas. As larvas provenientes do tratamento controle químico (CQ) apresentaram maior sobrevivência 95,21% e 1905 larvas por réplica para o mesmo período (Figura 2) e (Tabela 1).

A indução à triploidia por temperatura (choque frio a 5°C) demonstrou elevada sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, com 91,84%, e 96.435 larvas D véliger por réplica. No tratamento hipotônico, a sobrevivência larval também foi elevada, alcançando 93,71% e 70.285 larvas D véliger por réplica. No tratamento controle físico (CF1), as larvas apresentaram maior sobrevivência 96,03%, sendo 86.435 larvas atingiram a fase D véliger neste período, em cada réplica (Figura 2) e (Tabela 1).

O experimento por choque frio a 2°C apresentaram mortalidade total após as primeiras 24 horas. Entretanto, a indução à triploidia por choque frio a 7°C demonstrou elevada sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, com 95,45%. Neste tratamento 2.863 larvas D véliger sobreviveram em cada réplica (Figura 2). No experimento hipotônico (salinidade 12‰), a sobrevivência larval foi 94,98%, destes um total de 2.089 larvas D véliger sobreviveram as primeiras 24 horas por cada réplica. As larvas provenientes do tratamento controle físico (CF2) apresentaram sobrevivência superior com 96,77%, resultado semelhante ao experimento hipotônico anterior (CF1), (Figura 2).

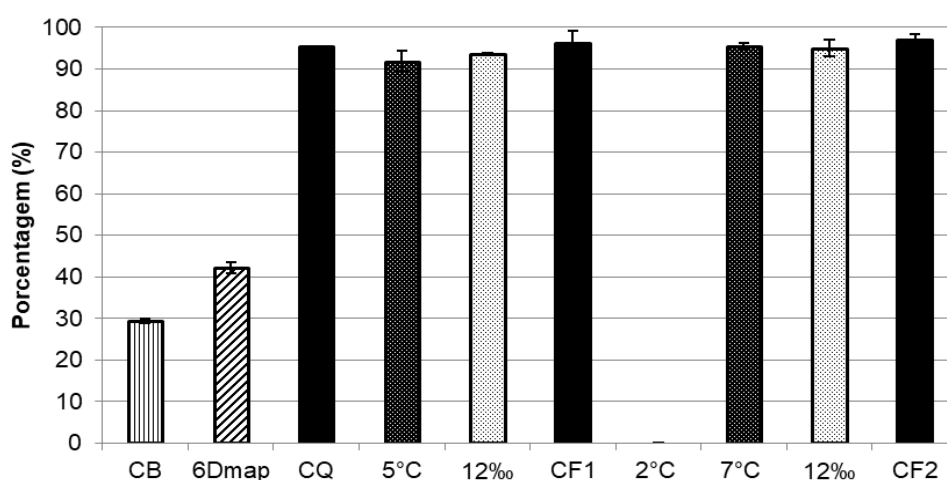


Figura 2 – Sobrevivência larval após 24 horas de indução à triploidia. Tratamento químico (CB) citocalasina B; (6-Dmap) 6 dimetilaminopurina; Tratamento controle químico (CQ); Tratamento físico (°C) choque térmico frio (2°C, 5°C, 7°C); Tratamento físico (‰) salinidade (12‰). Tratamento controle físico (CF1 e CF2). Valores médios e desvio padrão.

Tabela 1. Percentual de sobrevivência em larvas de *Anomalocardia brasiliiana*.

Tratamento	Sobrevivencia larval (%)	
	Pernambuco	Espírito Santo
CB	29,35±0,49	—
6Dmap	42,25±1,39	—
CQ	95,22±0,20	—
5°C	91,84±2,57	—
12‰	93,71±0,25	—
CF1	96,04±3,00	—
2°C	—	0,0
7°C	—	95,46±0,81
12‰	—	94,98±2,06
CF2	—	96,88±1,37

* (CB) citocalasina B; (6-Dmap) 6 dimetilaminopurina; (CQ) Tratamento controle químico; (CF1 e CF2) Tratamento controle físico. Valores médios e desvio padrão.

O processo de fertilização é fundamental na produção comercial de moluscos bivalves (Dong et al., 2012). A reprodução e o desenvolvimento embrionário e larval são considerados períodos críticos do ciclo de vida (Gosling, 2003). Wang et al. (2012) relatam que a determinação da temperatura e salinidade ideal são fatores fundamentais para eficiência da produção de sementes de moluscos.

A espécie *A. brasiliiana* apresenta ampla distribuição latitudinal, pode ser encontrada nas regiões costeiras do Atlântico, desde o sul do México, Mar do Caribe, Mar das Antilhas, até o sul do Brasil (Worms, 2016). Eurihalina e osmorreguladora são organismos tolerantes às variações de salinidade (Lima et al., 2009), e euritérmica, suportando grandes amplitudes de temperatura (Schaeffer-Novelli, 1976). Os espécimes utilizados neste estudo foram capturados em duas regiões diferentes no país, no litoral do Nordeste e no do Sudeste. Sabe-se que o período reprodutivo para uma mesma espécie pode variar substancialmente de região para região, principalmente em função de diferentes condições climáticas e ambientais (Grotta e Lunetta, 1980). Embora capturadas em regiões distintas, os reprodutores aqui utilizados liberaram seus gametas em laboratório ao longo de todo ano, nas duas regiões, o que corrobora com Grotta e Lunetta (1980). Nas desovas obtidas para estes experimentos foram observadas diferenças nos quantitativos de gametas obtidos entre os picos reprodutivos descritos para espécie, onde durante a primavera as desovas foram maiores e nos períodos de verão e inverno as desovas foram menores, número de ovócitos obtidos.

Características como alta fecundidade, fertilização externa e fases larvais fazem com que os moluscos sejam bons candidatos à manipulação cromossômica, permitindo o bloqueio dos corpos polares I e II (Guo et al. 2009). A retenção do primeiro corpo polar não proporciona apenas um conjunto extra de cromossomos, triploidia, mas também tetraploides e aneuplóides (Guo et al., 1992). Os triploides obtidos pela meiose I podem crescer mais rápido do que aqueles obtidos na meiose II (Stanley et al., 1984; Hawkins et al., 1994). Contudo, a retenção do primeiro corpo polar nem sempre é eficiente para gerar triploides. Yang et al. (2000) relatam que a triploidia por inibição do segundo corpo polar foi mais eficiente para viera *Chlamys farreri*.

De acordo com a revisão feita por Maldonado-Amparo et al. (2016), seis estudos diferentes realizados entre 1989 e 1995 com *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* (Veneridae), utilizando citocalasina B (CB) para induzir à triploidia através de 0,5 a 1 mg/L em protocolos semelhantes ao nosso alcançaram entre 40 e 95% de êxito, mas a

sobrevivência larval na fase inicial D véliger variou de 19 a 68%. Gerard et al. (1994) encontraram os maiores valores de sobrevivência larval (68%) na menor concentração de 0,5 mg/L CB utilizada, alcançando 63% de êxito na obtenção de triploides. Já em concentração de 1,0 mg/L, apenas 31% de sobrevivência larval foi obtida com 95% de êxito na obtenção de triploides. Tais estudos demonstram uma grande variação na sobrevivência larval por esse método, a despeito dos registros de alta porcentagem de êxito. No presente estudo a indução química por CB também demonstrou baixa sobrevivência larval. Uma hipótese que pode nos ajudar a explicar esses valores obtidos, foi descrita por Guo et al. (2009), que relataram resultados semelhantes em uma revisão envolvendo diversos artigos produzidos entre 1988 e 1996, para espécies de bivalves de sedimento. Downing e Allen (1987) descreveram alguns dos principais fatores que influenciam a eficácia da CB para induzir a triploidia, sendo eles a dosagem, a duração do tratamento, e a temperatura em que o tratamento é realizado, pois a variação da temperatura afeta a velocidade dos eventos meióticos.

Outra forma de avaliar esses resultados também está bastante relatada na literatura, onde a CB que é um antibiótico fúngico é conhecido por apresentar elevada toxicidade. Assim vários protocolos foram desenvolvidos a fim de aperfeiçoar os resultados, elevando a sobrevivência larval e diminuindo os riscos ao operador (Peachey e Allen 2016). Um deles está na administração eficiente dos métodos de indução através da observação dos percentuais de corpos polares presentes, onde se faz necessário conhecer os momentos de liberação desses corpos polares com precisão, para que se possa impedi-los (Eudeline et al. 2000).

O uso do 6-DMAP proposto por Desrosiers et al. (1993) também é uma alternativa à CB, pois os resultados obtidos ao longo dos anos demonstraram índices semelhantes, além de ser considerado mais seguro ao operador e mais barato (Peachey e Allen 2016).

No Brasil, Melo et al. (2015) avaliaram a eficiência da CB a 0,5 mg/L⁻¹ e 6-DMAP em duas concentrações (390 e 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$), como também o choque térmico à temperatura de 36°C para indução à triploidia em *Crassostrea gigas*. Os autores relataram que obtiveram sucesso em todas as técnicas aplicadas: 57% de triploides com CB, 56% com 6-DMAP e 45% pela indução por temperatura, mas nos tratamentos com CB observaram elevada mortalidade larval. A sobrevivência larval após 48 horas variou de 55 a 71% nas induções com CB, de 51 a 61% com 6-DMAP, de 56% com choque por temperatura e até 83% no tratamento controle.

No presente estudo a indução química por CB e 6-DMAP obteve sobrevivência larval inferior ao descrito por Melo et al. (2015). Mas apresentaram diferenças nos resultados nos por indução física usando a temperatura, onde temperaturas quentes não obtiveram elevado índice de sobrevivência. Enquanto temperaturas frias usadas neste estudo atingiram alta sobrevivência larval.

Diversos pesquisadores obtiveram êxitos na triploidia por manipulação da temperatura Quillet e Panelay (1986), Yamamoto e Sugawara (1988) e Toro e Sastre (1995). Gosling e Nolan (1989) observaram 56% de triploides através da indução por choque térmico à 32°C em *Ruditapes philippinarum* (Veneridae), ressaltando a facilidade para aplicação da técnica e ausência de riscos por manipulação.

Yamamoto e Sugawara (1988) relatam elevada sobrevivência larval obtido por choques térmicos no mexilhão *Mytilus edulis*, tanto na retenção do primeiro e do segundo corpo polar com sobrevivência larval superior entre 89% e 99%. Eles alcançaram sucesso tanto em choques com temperaturas altas quanto baixas, mas relataram que temperaturas muito elevadas causam mortalidade, por alterarem o desenvolvimento meiótico.

Choques térmicos também foram aplicados na obtenção de tetraploides em Veneridae *Mercenaria mercenaria* durante a primeira mitose (Yang e Guo 2006). O método com choque frio se mostrou eficiente para interromper a mitose, mas não para produzir tetraploides. Já o método por choque quente foi eficiente para produção de tetraploides, mas não apresentou bons resultados para sobrevivência.

No presente estudo não foram avaliados métodos de indução à triploidia por choque quente, tanto por tratar-se de uma espécie tropical como por resultados negativos obtidos por Lavander et al. (2017), que demonstraram aceleração da meiose e alto índice de ovos deformados em temperaturas próximas (32 °C) às usadas nos protocolos para obtenção de poliploidia.

A indução à triploidia por choque hipotônico vem sendo aplicada em alguns estudos com vieiras e ostras (Meng et al. 2012; Wang et al. 2009 e Zhang et al. 2014) Kong et al. (2011) testaram sete tratamentos hipotônicos distintos para indução à triploidia na ostra *Crassostrea gigas*, e observaram que o choque hipotônico a 8‰ alcançou maior percentual de triploides, com 89% de êxito. Os autores ainda compararam este tratamento com a indução química por 6-DMAP e física, por temperaturas quente e fria, mas o método por choque hipotônico se mostrou mais eficiente, demonstrando viabilidade técnica, segurança na aplicação do método e baixo custo.

Nossos resultados comprovaram que tanto os choques térmicos (a 5 e 7°C), como o choque hipotônico a 12‰ em ovos de *A.brasiliiana* geraram as maiores taxas de sobrevivência larval, compatíveis com os controles. No entanto, a falta de informação sobre o percentual de êxito em todos os métodos empregados, nos impede de indicar a metodologia mais promissora para a obtenção de triploides. Podemos especular que se o objetivo da técnica venha a ser produzir triploides em larga escala, que os métodos químicos não serão eficientes em produzi-los em quantidade. Se a obtenção de tetraploides para a geração de triploides vier

a ser objetivo dessa atividade, então os métodos químicos poderão ser considerados, se comprovada sua eficiência quanto à taxa de sucesso, independente da sobrevivência, uma vez que o quantitativo (sobrevivência) teria menor importância.

Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstraram que a indução à triploidia por métodos físicos como temperaturas e salinidades baixas apresentou maior sobrevivência larval em *Anomalocardia brasiliiana*. Novos estudos deverão ser realizados, a fim de aprimorar os protocolos para obtenção de poliploides para espécie com avaliação do sucesso das técnicas por citometria de fluxo (percentual de poliploides).

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro no consentimento da bolsa de doutorado.

Referências

- Colas, P. Dubé, F. 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. Sem. Cell & Develop. Biol. 9: 539-548.
- Desrosiers, R.R. Qard, A.G. Peignon, J.M. Nacirib, Y. Dufresne, L. Morasse, J. Ledu, C. Phelipotb, P. Guerrier, P. Dub, F. 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6 dimethylaminopurine. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 170: 29-43.
- Dong, Y. Yao, H. Lin, Z. Zhu, D. 2012. The effects of sperm- egg ratios on polyspermy in the blood clam, *Tegillarca granosa*. Aqua. Res. 43:44-52.
- Downing, S.L. Allen, S.K. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature, Aquaculture, 61: 1-15.
- Eudeline, B. Allen, S.K, Guo, X. 2000. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid Production. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 247: 151-161.
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Rome, 220 pp.
- Fjellidal, P.G. Wennevik, V. Fleming, I.A. Hansen, T. Glover, K.A. 2014. Triploid (sterile) farmed Atlantic salmon males attempt to spawn with wild females. Aquaculture Environment Interactions. 5: 155-162. doi: 10.3354/aei00102

- Gerard, Y.A. Nacri, C. Noiret, C. Ledu, J. Peignon, M. Phelipot, P. 1994. Induced triploidy in the European clam, *Ruditapes decussatus* (L.), and performance of triploid larvae. *Aquaculture and Fisheries Management*. 25: 769-779.
- Grotta, M.; Lunetta, J.E. Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) do litoral do Estado da Paraíba. *Revista Nordestina de Biologia*. v.3(1), p.5-55. 1980.
- Gosling, E.M.; Nolan, A. 1989. Triploidy Induction by Thermal shock in the manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture*. 78: 223-228.
- Gosling, E.M. Bivalve molluscs. Oxford: Fishing News Books. 2003, 443 p.
- Guo, X.; Hershbergk, W.K.; Cooper, K.; Chew, K. Genetic consequences of blocking polar body I with Cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. II. Segregation of chromosomes. *Bulletin Biology*. v.183, p.387-393, 1992.
- Guo, X. Wang, Y. Xu, Z. Yang, H. 2009. Chromosome set manipulation in shellfish. in: *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental management*, G. Burnell and G. Allan (eds). Woodhead Publishing. p 165-195.
- Hawkins, A.J.S. Day, A.J. Gerard, A. Naciri, Y. Ledu, C. Bayne, B.L. Heral, M. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* v.184, p.21-40, 1994.
- Kong, J. Wang, Z. Yu, R. Liu, J. Zhang, Y. 2011. Triploid induction in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by hypotonic treatment and comparison with other induction methods. *Journal of Fishery Sciences of China*. 18 (3): 581-587. DOI: 10.3724/SP.J.11118.2011.00581
- Lagreze, F.J.S. Albuquerque, M.C.P. Araujo, J. Sühnel, S. Melo, C.M.R. 2015. Survival and growth of the native clam *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) larvae in laboratory. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 41(1): 133-143.
- Lavander, H.D. Silva Neto, S.R. Sobral, S.C. Lima, P.C.M, Rêgo, M.G. Gálvez, A.O. 2014. Manutenção e reprodução de *Anomalocardia brasiliiana* em condições laboratoriais. *Rev. Bras. Ciên. Agr.* 9 (2): 269-276.
- Lavander, H. Dos Santos, G. Olivera, A. Carvalho, R. Guerra, M. Coimbra, M.R.M. 2017. Meiosis Maturation in the Marine Clam *Anomalocardia brasiliiana* (Veneridae). *Journal of Shellfish Research*. 36 (3):601- 605 <https://doi.org/10.2983/035.036.0308>
- Li, Q. Osada, M. Kashihara, M. Hirohashi, K. Kijima, A. 2000. Meiotic maturation, fertilization and effect of ultravioleta irradiation on the fertilizing sperm in the Japanese scallop *Fish. Scien.* 66: 403-405.

- Lima, M.A.; Soares, M.O.; Paiva, A.C.C.; Osório, F.M.; Porfírio, A.F.; Matthews-Cascon, H. Osmorregulação em moluscos: o caso do bivalve estuarino tropical *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia). *Conexões: Ciência e Tecnologia*. v. 3, p.79-84, 2009.
- McCombie, H. Ledu, C. Phelipot, P. Lapegue, S. Boudry, P. Gerard, A. 2005. A Complementary Method for Production of Tetraploid *Crassostrea gigas* Using Crosses Between Diploids and Tetraploids with Cytochalasin B Treatments. *Marine Biotechnology*. 7, 318 – 330.
- Maldonado-Amparo, R. Verdugo, C.A.R. Ibarra, A.M. Rueda-Puente, E.O. Del Toro Sánchez, C.L. Félix, F.R. 2016. Poliploidía en Moluscos de Importancia Comercial. A Review. *European Scientific Journal*. 12 (33): 69-102.
- Melo, E.M.C. Gomes, C.H.A.M. Silva, F.C. Sühnel, S. Melo, C.M.R. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 41(4): 889-898.
- Meng, Q. Bao, Z. Wang, Z. Wang, S. Hu, J. Hu, X. Huang, X. 2012. Growth and reproductive performance of triploid yesso Scallops (*Patinopecten yessoensis*) induced by hypotonic shock *J. Shell. Res.* 31(4):1113-1122.
- Nell, J.A. 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210: 69-88.
- Oliveira, I.B. Silva Neto, S.R. Lavander, H. Lima, P. Gálvez, A.O. 2016a. Growth and survival of *Anomalocardia brasiliiana* larvae (Bivalvia: Veneridae) fed with microalgal diets. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44(1):34-38.
- Oliveira, R.L.M. Lavander, H.D. Santos, L.B.G. Calazans, N.K.F. Gálvez, A.O. Peixoto, S.R.M. 2016b. Hatchery Rearing of the Venerid Clam (Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research* 35: 27-30.
- Peachey, B.L. Allen, S.K. 2016. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 450: 199-205.
- Piferrer, F. Beaumont, A. Falguière, J.C. Flajshans, M. Haffray, P. Colombo, L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquac.* 293:125-156.
- Quillet, E. Panelay, P.J. 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 57: 271-279.
- Schaeffer-Novelli, Y. Alguns aspectos ecológicos e análise da população de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba Estado de São Paulo. 1976. 119p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Stanley, J.G. Hidu, H. Allen Jr., S.K. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*. v.37, p.147-155, 1984.

- Toro, J.E. Sastre, H.D. 1995. Induced triploidy in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854), and performance of triploid larvae. *Journal of Shellfish Research*, 14: 161-164.
- Turgeon, D.D. Lyons, W.G. Mikkelsen, P. Rosenberg, G. Moretzsohn, F. 2009. Bivalvia (Mollusca) of the Gulf of Mexico. In: *Gulf of Mexico - Origins, Waters, and Biota. Biodiversity*. Texas A&M University Press, Texas. p.711-744.
- Yamamoto, S.; Sugurawara, Y. 1988. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*. 72: 21-29.
- Yang, H. Zhang, F. Guo, X. 2000. Triploid and Tetraploid Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, Produced by Inhibiting Polar Body I. *Mar. Biotechnol.* 2: 466-475.
- Yang, H. Guo, X. 2006. Polyploid induction by heat shock- induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. *Aquac.* 252:171-182.
- Wang, Z. Guo, X. Allen, S. K. Wang, R. 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. *Aquaculture* 204: 337-348.
- Wang, Z. Zhao, T. Yu, R. Zhang, C. 2009. A new method for triploid induction by hypotonic treatment in scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Ocean Univ. China* 39:193-196.
- Wang, H. Zhu, X. Wang, Y. Luo, M. Liu, Z. 2012. Determination of optimum temperature and salinity for fertilization and hatching in the Chinese pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker). *Aquac.* 358-359: 292-297.
- Worms Editorial Board (2016). *World Register of Marine Species*. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2016-01-02
- Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, Z. Yan, X. Yu, Z. 2014. Phenotypic trait analysis of diploid and triploid hybrids from female *Crassostrea hongkongensis* × male *C. gigas*. *Aquaculture*. 434: 307-314.

6 - Considerações finais

De uma forma geral, este estudo é o primeiro a acompanhar e descrever os eventos meióticos da espécie *Anomalocardia brasiliiana*, identificando o período de surgimento dos dois corpos polares, o número mais frequente de cromossomos e a sobrevivência larval após indução à triploidia. Os resultados obtidos nesta pesquisa podem auxiliar outros estudos envolvendo a manipulação genética para fins de poliploidia na aquicultura.

Durante o desenvolvimento deste estudo podemos avaliar diferentes protocolos para observação de metáfases e meiose em geral, através do uso de diferentes corantes como Hoechst, Giensa, Orceina, Carmin e Dapi, sendo este ultimo o mais adequado, pois apresentou boa marcação dos cromossomos e das células (ovos). Ainda foram avaliados protocolos para observar cromossomos em tecidos como brânquias, com uso de diferentes concentrações de colchicina e tratamentos hipotônicos. Mas o uso de gametas para observação de cromossomos se mostrou mais adequado e prático. Durante todas as induções à triploidia as larvas dos diferentes tratamentos foram submetidas aos protocolos em citometria de fluxo, para identificar o percentual de diploides e poliploides de cada amostra. Porém problemas com o uso de fixadores como Formalina e Carnoy impossibilitaram este procedimento, os melhores resultados foram obtidos através do uso de larvas vivas (material fresco) sem o uso de fixadores. Neste sentido, ainda durante os ajustes na citometria de fluxo, nossos resultados indicaram 6% de larvas triploides obtidas pelo método com choque térmico frio, e 8% com método hipotônico. Esses resultados não foram usados no artigo devido uma falha durante o manejo na larvicultura, onde as larvas dos tratamentos com indução foram misturadas às larvas do tratamento controle (100% $2n$). Assim os tratamentos físicos devem ser novamente avaliados, pois poderão alcançar percentuais de triploides superiores a este.

Os dados obtidos nesta pesquisa demonstraram que: 1) a espécie apresenta $2n = 38$ cromossomos; 2) os momentos de liberação dos corpos polares ocorrem a dez e dezesseis minutos após a fertilização, respectivamente, indicando assim o período para aplicação da

indução à triploidia; 3) Esta técnica pode ser realizada por métodos físicos com a manipulação da temperatura ou salinidade da água, porém ainda se faz necessário avaliar a eficiência de ambas, o que tornará mais viável economicamente e segura para o manipulador. Novos estudos deverão ser realizados, a fim de detectar o protocolo mais eficiente por citometria de fluxo (percentual de poliploides), assim como avaliar a sobrevivência e o crescimento até atingir o tamanho de comercialização, além do efeito da poliploidia na fertilidade, dentre outros estudos.