



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
MESTRADO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA

ALEFF PAIXÃO FRANÇA

**MATURAÇÃO DA OSTRA DO MANGUE (*Crassostrea gasar*) EM
LABORATÓRIO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
SALINIDADE**

São Luís – MA

2020

ALEFF PAIXÃO FRANÇA

**MATURAÇÃO DA OSTRÁ DO MANGUE (*Crassostrea gasar*) EM
LABORATÓRIO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
SALINIDADE**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Ícaro Gomes Antonio

São Luís – MA

2020

França, Aleff Paixão.

Maturação da ostra do mangue (*Crassostrea gasar*) em laboratório sob diferentes condições de temperatura e salinidade / Aleff Paixão França. – São Luís, 2020.

80 f.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Ícaro Gomes Antônio.

1.Reprodução. 2.Moluscos bivalves. 3.Brasil. I.Título

CDU: 639.411(81)

ALEFF PAIXÃO FRANÇA

**MATURAÇÃO DA OSTRÁ DO MANGUE (*Crassostrea gasar*) EM
LABORATÓRIO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E
SALINIDADE**

Dissertação apresentada em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Aprovada em: 03/02/2020

Banca examinadora

Prof. Dr. ~~Icaro Gomes Antonio~~ (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Profª. Dra. Marina Bezerra Figueiredo
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
2º Examinador

Prof. Dr. Tiago de Moraes Lenz
Instituto Federal de Alagoas (IFAL)
3º Examinador

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os moluscos ocuparam a terceira posição na produção mundial da aquicultura em 2016, possuindo um alto potencial de produção no Brasil. O litoral maranhense possui vastas áreas estuarinas que podem ser utilizadas para o desenvolvimento da ostreicultura, porém enfrenta entraves como a falta de sementes, onde são obtidas apenas em ambiente natural, já que não existem laboratórios que produzem sementes da ostra do mangue *Crassostrea gasar* nas regiões Norte e Nordeste. A maturação pode ser induzida em laboratório através da manipulação das variáveis da água, como salinidade e temperatura que agem de forma direta na reprodução desses organismos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o processo de maturação gonadal sob diferentes temperaturas e salinidades controladas em laboratório. Foram realizados dois experimentos, nos quais foram testadas quatro condições térmicas (experimento 1): T1 – temperatura constante de 32°C; T2 – temperatura constante de 24°C; T3 – temperatura variando de 32°C para 24°C e T4 – temperatura variando de 24°C para 32°C e 4 condições salinas: S1 – salinidade constante de 40; S2 – salinidade constante de 20; S3 – salinidade variando de 40 para 20 e S4 – salinidade variando de 20 para 40. O experimento foi conduzido em tanques retangulares de 12 L (53 x 32,5 x 10 cm) montados em um sistema de troca de água constante, mediante recirculação, onde foram estocadas em cada unidade experimental 35 ostras. A alimentação foi ministrada duas vezes ao dia na densidade de 10×10^4 cel mL⁻¹. A proporção sexual demonstrou uma prevalência significativa de fêmeas em relação a machos nos dois experimentos, havendo hermafroditismo, somente no experimento de salinidade, em 0,5% dos reprodutores. Os resultados de índice de condição (IC), demonstraram incrementos de valores em temperaturas entre 24°C e 26°C e em salinidade de 20. Os estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* demonstraram que em uma temperatura entre 24°C e 26°C e salinidade de 20 há uma elevada maturação de gametas (IIIA). O aumento de temperatura e salinidade favoreceu a liberação de gametas (IIIB e IIID). O índice de ocupação gonadal (IOG) demonstrou que os reprodutores possuem um aumento de gametas ocupando a gônada em temperaturas entre 24°C e 28°C e que a salinidade propiciou grande variação de valores, sendo estes similares em todos os tratamentos, com média de 45%. Nossos resultados revelaram um padrão para maturação da ostra do mangue *C. gasar*, sendo favorecida em condições térmicas entre 24°C e 26°C e salinidades entre 20 e 25. Desta forma, a diminuição ou manutenção em salinidades e temperaturas mais baixas favorece o incremento de IC e IOG, enquanto o aumento dessas variáveis resulta na maior proporção de ovócitos em crescimento e na liberação de gametas.

Palavras chaves: Reprodução, Moluscos Bivalves, Brasil.

ABSTRACT

Mollusks occupied the third position in the world aquaculture production in 2016, with a high production potential in Brazil. The Maranhão coast has vast estuarine areas that can be used for the development of oyster farming, but it faces obstacles such as the lack of seeds, where they are obtained only in the natural environment, since there are no hatcheries that produce oyster seeds of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* in the North and Northeast regions. Maturation can be induced in the hatchery through the manipulation of water variables, such as salinity and temperature, which act directly in the reproduction of these organisms. The aim of the present work was to induce the gonadal maturation process under different temperatures and salinities controlled in the laboratory. Two experiments were carried out, in which four thermal conditions were tested (experiment 1): T1 - constant temperature of 32°C; T2 - constant temperature of 24°C; T3 - temperature ranging from 32°C to 24°C and T4 - temperature ranging from 24°C to 32°C and 4 saline conditions: S1 - constant salinity of 40; S2 - constant salinity of 20; S3 - salinity varying from 40 to 20 and S4 - salinity varying from 20 to 40. The experiment was conducted in 12 L rectangular tanks (53 x 32.5 x 10 cm) with a constant water exchange, through recirculation, where 35 oysters were stored in each experimental unit. Feeding was given twice a day at a density of 10×10^4 cel mL⁻¹. The sex ratio showed a significant prevalence of females in relation to males in both experiments, with hermaphroditism, only in the salinity experiment, in 0.5% of the breeders. The results of condition index (CI), showed increases of values in temperatures between 24°C and 26°C and in salinity of 20. The gonadal stages of *C. gasar* breeders demonstrated that in a temperature between 24°C and 26°C and salinity of 20 there is a high maturation of gametes (IIIA). The increase in temperature and salinity favored the release of gametes (IIIB and IIID). The gonadal occupation index (GOI) demonstrated that the breeders have an increase in gametes occupying the gonad at temperatures between 24°C and 28°C and that salinity provided a wide variation in values, which are similar in all treatments, with a mean 45%. Our results revealed a pattern for *C. gasar* maturation, being favored in thermal conditions between 24°C and 26°C and salinities between 20 and 25. Thus, the decrease or maintenance of lower values of salinity and temperature favors the increase in CI and GOI, while the increase in these variables results in a higher proportion of oocytes in the growth stage and the release of gametes.

Keywords: Reproduction, Bivalves mollusks, Brazil.

LISTA DE FIGURAS

TEXTO INTEGRADOR

Figura 1. Exemplar da ostra do mangue *Crassostrea gasar*. **Fonte:** Próprio autor. 16

CAPITULO I

Figura 1. Proporção sexual dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes condições térmicas de maturação. (AI) – Amostragem inicial..... 35

Figura 2. Médias de IC dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes temperaturas em laboratório. (AI) – Amostragem inicial..... 36

Figura 3. Estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* sob diferentes condições térmicas de maturação. (AI) – Amostragem inicial..... 37

Figura 4. (A, B e C) Gônada feminina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm). (D, E, F) Gônada masculina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm). PF – Parede Folicular; EI – Espaço Intracelular; O – Ovócito; E – Espermatozoide..... 38

Figura 5. Valores médios percentuais do índice de ocupação gonadal (IOG) dos reprodutores de *C. gasar* mantidos em laboratório em diferentes condições térmicas. (AI) – Amostragem inicial. 39

Figura 6. Diâmetro médio (µm) e classes de tamanhos dos ovócitos de *C. gasar* submetida a diferentes condições térmicas. (AI) – Amostragem inicial, (C) – Crescimento, (M) – Maduro, (D) – Degenerado. 40

CAPITULO II

Figura 1. Proporção sexual dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes graduações salinas de maturação. (AI) – Amostragem inicial. 57

Figura 2. Médias de IC dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes salinidades em laboratório. (AI) – Amostragem inicial. 58

Figura 3. Estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* sob diferentes condições salinas de maturação (AI) – Amostragem inicial. 59

Figura 4. (A, B e C) Gônada feminina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm). (D, E, F) Gônada masculina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm), (G) – Gônada indefinida em aumento de 400x (50µm) e (H) Gônada hermafrodita em aumento de 400X (50µm). GM – Gônada Madura; PF – Parede Folicular; EI – Espaço Intracelular; EE – Espaço Extracelular; O – Ovócito; E – Espermatozoide..... 60

Figura 5. Valores médios percentuais do índice de ocupação gonadal (IOG) dos reprodutores de *C. gasar* mantidos a diferentes condições salinas em laboratório. (AI) – Amostragem inicial. 61

Figura 6. Diâmetro médio (µm) e classes de tamanhos dos ovócitos da *C. gasar* submetida a diferentes condições salinas. (AI) – Amostragem inicial; (C) – Crescimento; (M) – Maduro e (D) – Degenerado..... 62

LISTA DE TABELAS

TEXTO INTEGRADOR

Tabela 1. Protocolo de desidratação e inclusão em parafina.	24
Tabela 2. Protocolo de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).	25
Tabela 3. Escala de estágios de desenvolvimento gonadal.....	26

CAPITULO I

Tabela 1. Médias das variáveis da água aferidas por tratamento durante o experimento.	34
Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson e valores de r^2 obtidos na análise de regressão múltipla linear entre IC e IOG em relação a diferentes temperaturas.	41

CAPITULO II

Tabela 1. Valores médio das variáveis da água aferidas por tratamento durante o experimento.	56
Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson e valores de r^2 obtidos na análise de regressão múltipla linear entre IC e IOG em relação a diferentes salinidades.	63

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1.Ostreicultura	14
2.2. <i>Crassostrea gasar</i>	15
2.3.Biologia reprodutiva sob influência das variáveis ambientais	17
2.4.Maturação de organismos marinhos	18
2.5.Métodos aplicados na avaliação do ciclo reprodutivo	19
2.6.Estudos sobre a ostra do mangue no Brasil e no Maranhão	19
3. JUSTIFICATIVA	20
4. HIPÓTESES	21
5. OBJETIVOS	21
5.1.Objetivo Geral	21
5.2.Objetivos Específicos	22
6. METODOLOGIA	22
6.1.Material biológico	22
6.2.Origem e tratamento de água	22
6.3.Maturação de reprodutores da ostra do mangue	22
6.3.1. Delineamento do experimento 1	23
6.3.2. Delineamento do experimento 2	23
6.4.Variáveis abióticas	24
6.5.Amostragens dos reprodutores de <i>C. gasar</i>	24
6.6.Histologia	24
6.7.Proporção sexual	27
6.8.Índice de Condição (IC)	27
6.9.Índice de Ocupação Gonadal (IOG)	27
6.10. Diâmetro médio dos ovócitos	28
6.11. Análise estatística	28
7. RESULTADOS	28
7.1.CAPITULO I	29
MATURAÇÃO DA OSTRAS DO MANGUE (<i>Crassostrea gasar</i>) SOB DIFERENTES TEMPERATURAS CONTROLADAS EM LABORATÓRIO..	29
7.1.1. INTRODUÇÃO	30

7.1.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
7.1.2.1.	Delineamento Experimental	31
7.1.2.2.	Histologia	32
7.1.2.3.	Proporção Sexual.....	32
7.1.2.4.	Índice de Condição (IC)	32
7.1.2.5.	Índice de Ocupação Gonadal (IOG).....	32
7.1.2.6.	Diâmetro Médio dos Ovócitos	33
7.1.2.7.	Análise Estatística	33
7.1.3.	RESULTADOS.....	34
7.1.3.1.	Variáveis Abióticas da Água	34
7.1.3.2.	Proporção Sexual.....	34
7.1.3.3.	Índice de Condição (IC)	35
7.1.3.4.	Estágios Gonadais.....	36
7.1.3.5.	Índice de Ocupação Gonadal (IOG).....	38
7.1.3.6.	Tamanho Médio dos Ovócitos	39
7.1.3.7.	Influência da Temperatura em Relação ao Índice de Condição (IC) e ao Índice de Ocupação Gonadal (IOG)	40
7.1.4.	DISCUSSÃO	41
7.1.5.	CONCLUSÃO	44
7.1.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
7.1.7.	INSTRUÇÕES PARA AUTORES	50
7.2.	CAPITULO II	51
	MATURAÇÃO DA OSTRÁ DO MANGUE (<i>Crassostrea gasar</i>) SOB DIFERENTES SALINIDADES CONTROLADAS EM LABORATÓRIO.....	51
7.2.1.	INTRODUÇÃO	52
7.2.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
7.2.2.1.	Delineamento Experimental	52
7.2.2.2.	Histologia	54
7.2.2.3.	Proporção Sexual.....	54
7.2.2.4.	Índice de Condição (IC)	54
7.2.2.5.	Índice de Ocupação Gonadal (IOG).....	54
7.2.2.6.	Diâmetro Médio dos Ovócitos	55
7.2.2.7.	Análise Estatística	55

7.2.3. RESULTADOS.....	55
7.2.3.1. Variáveis Abiótica da Água	55
7.2.3.2. Proporção Sexual.....	56
7.2.3.3. Índice de Condição (IC)	57
7.2.3.4. Estágios Gonadais.....	58
7.2.3.5. Índice de Ocupação Gonadal (IOG).....	61
7.2.3.6. Tamanho Médio dos Ovócitos	61
7.2.3.7. Influência da Salinidade no Índice de Condição (IC) e Índice de Ocupação Gonadal (IOG)	62
7.2.4. DISCUSSÃO	63
7.2.5. CONCLUSÃO.....	65
7.2.6. REFERENCIAS	66
7.2.7. INSTRUÇÕES PARA AUTORES	70
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura, cultivo de organismos aquáticos, é apontada pela FAO como a principal alternativa para aumentar a oferta mundial de pescado, sendo na atualidade uma fonte importante de produção de alimento, fazendo-se cada vez mais necessária devido à demanda populacional ascendente e a disponibilidade de outros alimentos em declínio (FAO, 2018).

Os moluscos ocuparam a terceira posição na produção mundial da aquicultura em 2016, com 17,1 milhões de toneladas, representando aproximadamente 28% da maricultura. Dentre as espécies de moluscos bivalves, as ostras do gênero *Crassostrea* possuem elevada importância econômica, com uma produção de 4,9 milhões de toneladas por ano (FAO, 2018).

A ostra do mangue *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757), é bastante explorada por comunidades ribeirinhas de forma rudimentar, mas sem preocupação em utilizar medidas de manejo que garantam um uso sustentável dos estoques naturais desses organismos (ARAÚJO, 2001). Uma exploração desordenada pode acarretar em muitos problemas, como a escassez dessa espécie, influenciando falhas no recrutamento de sementes, insumo importante para o cultivo desses organismos. O cultivo seria uma possível medida corretiva para o problema de exaustão dos estoques naturais.

No ramo da biologia, a maturação é o processo que torna um organismo sexualmente maduro, induzindo o desenvolvimento das células germinativas ou gametas, tornando-os hábeis a serem fertilizados. As variáveis abióticas, influenciam na biologia reprodutiva dos moluscos bivalves, dentre elas, a temperatura possui a maior influência, pois atua diretamente na regulação da reprodução em bivalves (SASTRY, 1968; ROBINSON, 1992; RODRIGUEZ-JARAMILLO et al., 2001). Nos moluscos, o aumento da temperatura da água favorece a gametogênese, a fecundidade, a desova e a qualidade dos ovos (UTTING e MILLICAN, 1997).

Vários estudos revelam a influência da salinidade no desenvolvimento de moluscos bivalves (PAIXÃO et al., 2013; YANG et al., 2016; LEE et al., 2017; LEGAT et al., 2017b). Em estuários tropicais e regiões costeiras, onde as temperaturas são constantes, a salinidade é considerada um dos principais fatores que determinam a distribuição, desenvolvimento e reprodução de ostras (PAIXÃO et al., 2013; SANTERRE et al., 2013).

Estudos sobre a maturação de reprodutores da ostra do mangue *C. gasar* são escassos no Brasil, onde podemos destacar os que foram realizados no sul do país avaliando a influência da alimentação (RAMOS et al., 2013) e da temperatura (RAMOS et al., 2014). Porém, até o presente momento não foram realizados estudos de maturação de ostras, em condições de laboratório, nas regiões Norte e Nordeste.

Atualmente no Brasil, somente o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina produz regularmente sementes de ostras a nível comercial. Algumas pesquisas visando aprimorar a produção de sementes de ostras nativas em laboratório foram realizadas pelo LMM nos últimos anos (SILVEIRA et al., 2011; AREIAS, 2012; LEGAT, 2017b), porém ainda são necessários mais estudos para o aperfeiçoamento das técnicas de produção em laboratório.

O estado do Maranhão possui um grande potencial para a ostreicultura devido sua extensa área costeira, na qual em sua maior parte é formada por manguezais. Essas áreas são promissoras para o cultivo de ostras devido à grande quantidade de nutrientes, influência mínima de ventos, correntes e ondas, e grande renovação de água em decorrência da variação de maré. Porém, a ostreicultura é pouco desenvolvida devido a alguns entraves, como a falta de insumos e falta de conhecimento das comunidades costeiras a respeito desse cultivo.

Desta forma, se torna necessário que o Maranhão inicie as pesquisas com produção de ostras em laboratório, colaborando com os esforços desenvolvidos pelos diversos órgãos estaduais e instituições de pesquisa para o desenvolvimento da ostreicultura no Estado.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Osteicultura

Entre as atividades da aquicultura, a malacocultura merece destaque por se aproximar dos princípios da sustentabilidade, apresentando prudência ecológica, equidade social e viabilidade econômica (VINATEA, 1999). Ela abrange o cultivo de ostras, mexilhões, vieiras e polvos, entre outros moluscos. O cultivo de moluscos representa uma expressiva parcela da produção mundial de produtos marinhos, cerca de 28% (FAO, 2018).

A malacocultura no Brasil apresentou em 2018 uma produção de 14,23 mil toneladas. No Norte, apenas o estado do Pará desenvolve a malacocultura, com uma

produção de 69,28 toneladas (PPM, 2018). Na região Nordeste, os estados de Alagoas, Bahia, Maranhão e Sergipe desenvolvem a malacocultura, com produções de 55,16 t, 51,26 t, 24,2 t e 2,14 toneladas respectivamente (PPM, 2018). A região sul do país possui a maior produção, com 13,86 mil toneladas (cerca de 97,4% da produção total), sendo o estado de Santa Catarina responsável por 96,9% da produção nacional (PPM, 2018).

O cultivo de ostras, conhecido como ostricultura, é uma atividade com grande potencial para ser desenvolvida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, devido suas extensas áreas estuarinas e regiões costeiras. Esses ambientes são ideais para o desenvolvimento dessa atividade, na qual são utilizados diferentes métodos de cultivo (long-lines, balsas flutuantes e mesas fixas), de acordo com a característica dos ambientes costeiros, condições ambientais e tradição local (FAO, 2006; SEBRAE, 2010).

A ostricultura no Brasil teve início em 1971 em Salvador pela Universidade Federal da Bahia em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina. Já em 1974 foi introduzida no Brasil a espécie *Crassostrea gigas*, atualmente a principal espécie cultivada de ostra no país e no mundo (OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar da baixa representatividade na ostricultura brasileira, as espécies nativas *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* são cultivadas desde a região Norte (SAMPAIO et al., 2017) até a região Sul (BALDAN e BENDHACK, 2009; CASTILHO-WESTPHAL et al., 2015). A espécie nativa *C. gasar* apresenta potencial para a ostricultura, demonstrando um ótimo crescimento em cultivo (CHRISTO e ABSHER, 2008; LEGAT et al., 2017a).

2.2. *Crassostrea gasar*

Classificação taxonômica da ostra do mangue *C. gasar*:

Filo:	Mollusca
Classe:	Bivalvia
Subclasse:	Pteriomorphia
Ordem:	Ostreoida
Superfamília:	Ostreoidea
Família:	Ostreidae
Subfamília:	Crassostreinae
Gênero:	<i>Crassostrea</i>
Espécie:	<i>Crassostrea gasar</i> (ADANSON, 1757) (Figura 1)



Figura 1. Exemplar da ostra do mangue *Crassostrea gasar*. **Fonte:** Próprio autor.

A ostra do mangue *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757) é amplamente distribuída e pode ser encontrada ao longo da costa da África Ocidental (ANGELL 1986, LAPEGUE et al., 2002) e na América do Sul, da Guiana Francesa ao sul do Brasil (LAPEGUE et al., 2002, LAZOSKI et al., 2011). Ela é encontrada principalmente em regiões que são significativamente influenciadas pelo influxo de água doce do continente e apresentam grandes variações na salinidade (SIQUEIRA, 2008; CASTILHO-WESTPHAL, 2012).

As ostras pertencem à classe dos bivalves por possuir uma concha dividida em duas valvas duras, protegendo as partes moles, onde ficam comprimidas na lateral e com tamanhos diferentes (MARENZI e CASTILHO-WESTPHAL, 2011). São filtradores, que possuem um sistema pelo qual a água é bombeada através do seu corpo, levando oxigênio para respiração e fitoplâncton para a sua alimentação (KINNE, 1983)

As ostras do gênero *Crassostrea* são dioicas, mas podem apresentar hermafroditismo sequencial devido à combinação de fatores ambientais e genéticos, apresentando sexo masculino quando jovem, podendo mudar quando adulta em diferentes períodos de desova (GOMES, 2009).

Apresentam reprodução sexuada com fecundação externa e desenvolvimento embrionário. Horas depois da fecundação, forma-se uma larva chamada de véliger ou larva D, devido seu formato semelhante a letra “D”. Nas duas ou três semanas seguintes

estas larvas ficam flutuando nas correntes marinhas. No término deste período, as larvas sofrem modificações morfológicas, e fixam-se em algum substrato, como uma rocha ou raiz de mangue, continuando sua transformação passando à fase de sementes, ou juvenis, até adulto (POLI et al., 2006).

2.3. Biologia reprodutiva sob influência das variáveis ambientais

No conhecimento da biologia de qualquer organismo, é extremamente importante conhecer o ciclo reprodutivo. Os fatores abióticos da água como temperatura e salinidade afetam diretamente a distribuição, abundância, ciclo de vida, fisiologia e sobrevivência da maioria dos invertebrados marinhos (BEGON et al., 2007; ROMO et al., 2010).

Os ciclos reprodutivos são controlados por ritmos endógenos específicos sincronizados por fatores externos, dentre os quais a temperatura e a alimentação parecem ser os fatores mais importantes (THOMPSON, 1984). A precocidade da maturidade sexual está relacionada às condições ambientais favoráveis, especialmente da temperatura em que o organismo se desenvolve, seja em regiões temperadas ou tropicais (ORTON, 1920).

A temperatura age de maneira rápida, atingindo principalmente os processos metabólicos em espécies aquáticas, cuja sua temperatura varia de acordo com a temperatura do ambiente (KINNE, 1976; NEWELL e BRANCH, 1980). Ela é particularmente importante na regulação da reprodução em bivalves (SASTRY, 1968; ROBINSON, 1992; RODRIGUEZ-JARAMILLO et al., 2001). Nos moluscos, o aumento da temperatura da água favorece a gametogênese, a fecundidade e a qualidade dos ovos (UTTING e MILLICAN, 1997).

Em regiões tropicais outra condição ambiental muito importante é a salinidade, devido sua grande variação (THOMPSON, 1984). Essa variação está relacionada a fatores como descarga fluvial e precipitação (ORTON, 1920). O aumento da salinidade pode influenciar o comportamento das ostras, modificando a osmolaridade, fazendo com que gastem mais energia para equilibrar a sua concentração osmótica (BURTON, 1983).

A baixa salinidade e a turbidez elevada são fatores ambientais característicos de ambientes estuarinos (CHRISTO, 2000). A ostra, durante a exposição a água doce, pode permanecer com as valvas fechadas, restringindo o alimento para os animais. Este fato afeta a quantidade de energia armazenada pelo animal e a gametogênese (HOPKINS, 1931).

Essa dinâmica rege a biologia reprodutiva dos organismos marinhos e estuarinos afetando a duração dos estágios gonadais e, portanto, a produção de gametas. Um bom conhecimento prático da relação entre as variáveis ambientais e o desenvolvimento gonadal é extremamente importante para melhorar as condições de armazenamento e os procedimentos de maturação em laboratório, além de ser um pré-requisito importante para o desenvolvimento de programas para exploração comercial de moluscos (UTTING, 1993; CHÁVEZ-VILLALBA et al., 2002; GOSLING, 2003; MACIEL, 2011).

2.4. Maturação de organismos marinhos

A maturação é o processo que torna um organismo sexualmente maduro, resultando no desenvolvimento das células germinativas ou gametas, tornando-os hábeis a serem fertilizados. Esse processo ocorre naturalmente e está diretamente ligado ao ciclo reprodutivo do organismo, e com conhecimento deste, é possível manipulá-lo e acelerá-lo em condições controladas.

A maturação é regida por fatores genéticos e fatores abióticos do meio em que o organismo está inserido, como a alimentação (RUIZ et al., 1992; ENRÍQUEZ-DÍAZ et al., 2009; DRIDI et al., 2014), fotoperíodo (FABIOUX et al., 2005), salinidade (PAIXÃO et al., 2013) e temperatura (THOMPSON, 1984; MANN, 1979; BERTHELIN et al., 2001; WEISS et al., 2007).

Fatores ambientais como a disponibilidade de alimento e a temperatura, estão diretamente ligados ao desenvolvimento dos bivalves (THOMPSON, 1984). Dentre as variáveis abióticas, a temperatura possui a maior influência, pois atua diretamente na regulação da reprodução em bivalves (SASTRY, 1968; ROBINSON, 1992; RODRIGUEZ-JARAMILLO et al., 2001). As variações da temperatura da água do mar afetam diretamente o ciclo reprodutivo de *Crassostrea brasiliana* (*C. gasar*) (MARENZI e CASTILHO-WESTPHAL et al., 2011; CHRISTO, 2006; GOMES, 2009). Nos moluscos, a gametogênese, a fecundidade e a qualidade dos ovos são beneficiadas pelo aumento da temperatura da água (UTTING e MILLICAN, 1997).

Vários estudos revelam a influência de salinidade no desenvolvimento de moluscos bivalves (PAIXÃO et al., 2013; YANG et al., 2016; LEE et al., 2017; LEGAT et al., 2017). Em estuários tropicais e regiões costeiras, onde as temperaturas são constantes, a salinidade é considerada um dos principais fatores que determinam a distribuição, desenvolvimento e reprodução de ostras (PAIXÃO et al., 2013; SANTERRE et al., 2013). O aumento da salinidade modifica a osmolaridade dos moluscos fazendo

com que gastem mais energia para equilibrar a sua concentração osmótica (BURTON, 1983).

2.5. Métodos aplicados na avaliação do ciclo reprodutivo

Existem vários métodos que são aplicados para estudar o ciclo reprodutivo em moluscos bivalves, por exemplo: observação do estágio gonadal e eliminação de gametas; amostragens de ovos, larvas e/ou juvenis no plâncton; tamanho de ovócitos; análise histológica e índice de condição (CHRISTO, 2006).

O método mais confiável para avaliar o desenvolvimento do ciclo reprodutivo de bivalves é baseado na histologia (QUAYLE, 1969; STEELE e MULCAHY, 1999). Os métodos histológicos classificam o ciclo reprodutivo da ostra de acordo com as características das células observadas em diferentes fases do desenvolvimento gonadal (GOSLING, 2003). No entanto, esse tipo de análise tende a ser subjetivo e deve ser utilizado em conjunto com métodos quantitativos. Por exemplo, o índice de condição pode ser usado como um método quantitativo para a avaliação indireta do estágio reprodutivo do animal (QUAYLE e NEWKIRK, 1989; RABELO et al., 2005). Outro método que vem sendo bastante utilizado é a análise de imagem, que permite estudar e quantificar os principais processos de gametogênese, fornecendo critérios mais confiáveis para estimar o desenvolvimento e a qualidade das gônadas em algumas espécies de bivalves marinhos (ANGEL-DAPA et al., 2010).

2.6. Estudos sobre a ostra do mangue no Brasil e no Maranhão

No Brasil, as pesquisas de cultivo de moluscos iniciaram no começo da década de 70, quase que simultaneamente em diversos estados, apesar de não ter existido nenhum programa Nacional de Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos ou algo semelhante. Tais resultados foram obtidos através de esforços isolados de grupos de pesquisas, os quais foram influenciados por experiências estrangeiras de cultivo, que viram nesta atividade uma alternativa para a pesca artesanal, como também para a manutenção dos estoques explorados pelas populações ribeirinhas (UFSC, 1997).

Estudos com genética realizados no estado do Pará sobre o gênero *Crassostrea* constataram que a espécie *C. brasiliiana* não possui diferenciação com a espécie *C. gasar* apresentando desta forma sinonímia, orientando o uso do nome *C. gasar* para a descrição desta espécie (VARELA et al., 2007).

Nos últimos oito anos, diversos estudos com a ostra do mangue foram realizados,

destacando pesquisas nas áreas de patologia (SILVA et al., 2014; QUEIROGA et al., 2015; DA SILVA et al., 2015; FARIAS et al., 2017), genética (MELO et al., 2012; CAVALEIRO et al., 2016), biologia reprodutiva (PAIXÃO et al., 2013; GOMES et al., 2014), maturação (RAMOS et al., 2013; RAMOS et al., 2014) e fertilização e larvicultura (LEGAT et al., 2017b).

As primeiras iniciativas de cultivo de ostra no estado do Maranhão ocorreram através da implantação do projeto POLOMAR (Polo de Maricultura do Maranhão) no ano de 1999 e do projeto BMLP (Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura) (FUNO, 2016). Essas iniciativas revelaram resultados promissores para os parâmetros produtivos (crescimento e sobrevivência) mensurados, apesar dos entraves ocorridos durante a execução desses projetos (FUNO, 2016).

Nos últimos oito anos, as instituições públicas de ensino e pesquisa do estado do Maranhão (UEMA, IFMA e UFMA), apoiadas por órgãos financiadores, têm intensificado suas pesquisas sobre as ostras nativas no litoral maranhense, compreendendo estudos sobre a biologia reprodutiva (SOUSA, 2017), genética (LOPES, 2016; LOPES et al., 2018), cultivo (FUNO et al., 2013; SANTOS, 2013; FUNO, 2016), recrutamento (FUNO et al., 2019) e seleção de áreas potenciais para a implantação do cultivo (FSADU, 2010; FRANÇA et al., 2013).

3. JUSTIFICATIVA

O estado do Maranhão, possui uma concentração considerável de espécies de moluscos bivalves que servem para o consumo humano (MOREIRA, 2007). O litoral maranhense possui áreas estuarinas que apresentam bancos naturais de ostras, sururus, sarnambis e outros moluscos bivalves (MONTELES et al., 2009). Os moluscos bivalves vêm sendo explorados por comunidades ribeirinhas de forma desordenada, levando a uma exaustão dos bancos naturais em alguns casos (SANTOS et al., 2016).

As ostras do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897), como por exemplo a *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757), são exploradas rudimentarmente pelas comunidades tradicionais, sem a preocupação da utilização de medidas de manejo que garantam um uso sustentável (ARAÚJO, 2001). Essa exploração desordenada pode ocasionar falhas no recrutamento de sementes, insumo importante para o cultivo desses organismos.

O cultivo de moluscos bivalves, tem se comprovado como uma importante

ferramenta para a diminuição da pobreza através da geração de emprego, renda e alimento em comunidades tradicionais costeiras frente à crescente diminuição dos recursos pesqueiros no Brasil (BARBIERI et al., 2014). Tal atividade ajuda a fixar populações nativas litorâneas em seu ambiente tradicional e torna-se um complemento de renda para pescadores artesanais (BARBIERI et al., 2014). A extração desordenada pode acarretar em uma diminuição desses organismos. Dessa forma, a malacocultura pode colaborar com uma ação de proteção ambiental, através da preservação e manutenção dos estoques naturais (SUPLICY, 2005).

Para evitar essa degradação dos bancos naturais de moluscos bivalves, e em especial da ostra do mangue *C. gasar*, algumas ações podem ser realizadas, onde podemos destacar a produção de sementes em laboratório, as quais poderão ser cultivadas junto as comunidades tradicionais do Maranhão.

Desta forma, a presente dissertação colabora, de forma inédita no Maranhão, com um conjunto de experimentos que apresentam como foco principal a produção controlada de sementes de ostras em laboratório, através de ensaios sobre a maturação da ostra do mangue *C. gasar*. Esta pesquisa será de suma importância para o desenvolvimento da ostreicultura no estado do Maranhão, sanando o principal entrave que é a falta de sementes. Portanto, ela auxiliará o início dos trabalhos de cultivo de ostras com sementes de reconhecida procedência e especificidade.

4. HIPÓTESES

O presente estudo partiu das seguintes hipóteses: (I) Se a temperatura influencia de forma direta na maturação da ostra do mangue, então espera-se que em temperaturas mais altas, haja uma maior porcentagem de reprodutores maduros; (II) Se a salinidade influencia de forma direta na maturação da ostra do mangue, então espera-se que em salinidades mais altas, haja uma maior porcentagem de reprodutores maduros.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Determinar as melhores temperaturas e salinidades para maturação da ostra do mangue *C. gasar*, originária da costa maranhense, em condições controladas em laboratório.

5.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução do índice de condição (IC) dos reprodutores da ostra do mangue *C. gasar*, sob diferentes condições térmicas e salinas;
- Verificar os estágios gonadais dos reprodutores da ostra do mangue *C. gasar*, sob diferentes temperaturas e salinidades;
- Determinar o Índice de Ocupação Gonadal (IOG) e o diâmetro médio dos ovócitos dos reprodutores da ostra do mangue *C. gasar*, em diferentes condições de temperatura e salinidade.

6. METODOLOGIA

6.1. Material biológico

Os reprodutores utilizados no presente experimento foram trazidos do cultivo experimental realizado no município de Primeira Cruz. Juvenis de ostras, em sua maioria, alcançam maturidade sexual em aproximadamente 120 dias após a fixação, ou seja, antes de apresentarem um tamanho de 30 mm (VÉLEZ, 1976; NASCIMENTO et al., 1980). Dessa forma, utilizamos reprodutores com média de 60 mm de tamanho, tendo em vista que já possuíam uma atividade reprodutiva bem desenvolvida.

Para o início do experimento, os reprodutores foram induzidos a liberação massiva de gametas por indução térmica, conforme descrito por SILVEIRA et al. (2011), a fim de padronizar o estágio inicial dos organismos. Foi realizado uma amostragem de 30 ostras para biometria e pesagem (20 para histologia e 10 para determinação do índice de condição), a fim de avaliar as condições iniciais dos reprodutores.

6.2. Origem e tratamento de água

A água marinha utilizada é oriunda da Praia do Araçagi, onde foram feitas coletas e transportadas através de bombonas plásticas de 200L ao Laboratório antes do início de cada experimento, sendo estocada em um reservatório de fibra de vidro com capacidade de armazenamento de 5.000L.

A água foi filtrada em filtros de 250µm, 100µm e 50µm, seguido por um filtro mecânico composto de manta acrílica, conduites cortados, conchas de ostras trituradas e pedra brita e por último foi esterilizada por lâmpada ultravioleta.

6.3. Maturação de reprodutores da ostra do mangue

O experimento foi conduzido em tanques retangulares de 12 L (53 x 32,5 x 10

cm), onde foram utilizados 4 tratamentos com 4 repetições cada, montados em um sistema de troca de água constante de 500mL/h, mediante recirculação. Foram estocadas em cada unidade experimental 35 ostras (total de 560). O volume utilizado para cada tanque foi de 9L de água marinha.

As ostras foram alimentadas com uma dieta mista composta pelas microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*. Foram ofertadas aos reprodutores durante a fase exponencial de crescimento em uma dieta diária de 10×10^4 cel mL⁻¹, na qual as microalgas *C. muelleri* e *I. galbana* representam uma proporção de 25% cada, enquanto a *N. oculata* representou 50% da dieta diária que foi ministrada duas vezes ao dia.

As microalgas foram cultivadas em sistema batch utilizando meio de cultura Conway (WALNE, 1964) e a contagem de células de microalgas foi feita diariamente com a utilização de uma câmara de Neubauer e microscópio.

6.3.1. Delineamento do experimento 1

Foram testadas quatro condições térmicas com 4 repetições cada:

- **T1** – temperatura constante de 32°C;
- **T2** – temperatura constante de 24°C;
- **T3** – temperatura variando de 32°C para 24°C;
- **T4** – temperatura variando de 24°C para 32°C;

Os tratamentos T3 e T4 tiveram suas temperaturas ajustadas quinzenalmente, sendo alteradas em 2°C. A salinidade de 27 foi padronizada para o experimento, a qual foi corrigida diariamente. A temperatura foi mantida através de aquecedores de água com termostato e foi verificada duas vezes ao dia (manhã e tarde).

6.3.2. Delineamento do experimento 2

Foram testadas quatro condições salinas com 4 repetições cada:

- **S1** – salinidade constante de 40, representando o período seco;
- **S2** – salinidade constante de 20, representando o período chuvoso;
- **S3** – salinidade variando de 40 para 20, representando o período de transição do período de estiagem para o chuvoso;
- **S4** – salinidade variando de 20 para 40, representando o período de transição do período chuvoso para o de estiagem;

Os tratamentos S3 e S4 tiveram suas salinidades ajustadas quinzenalmente, sendo alteradas em 5 partes de salinidade. A temperatura da água foi mantida a temperatura do laboratório (23°C). A correção da salinidade foi feita através da adição de água doce, quando o valor aumentasse, e água hipersalina, quando ela diminuísse.

6.4. Variáveis abióticas

As variáveis abióticas da água foram aferidas diariamente em dois momentos (manhã e tarde). Para ambos os experimentos, a temperatura foi aferida por termômetros de mercúrio e a salinidade por refratômetro. O oxigênio dissolvido e pH foram aferidos através de um multiparâmetro modelo AK88 da ASKO.

6.5. Amostragens dos reprodutores de *C. gasar*

Foram realizadas 5 amostragens quinzenais durante o período experimental, onde foram amostradas 5 ostras por unidade experimental, totalizando 20 ostras por tratamento, e 80 ostras por amostragem. A cada amostragem foi realizada a biometria das ostras com paquímetro (altura, comprimento e largura das valvas em milímetros) e pesagem das valvas, partes moles úmida e seca em gramas, utilizando balança de precisão. As amostras de partes moles úmida seguiram para histologia e determinação do índice de condição, sendo utilizada 40 ostras em cada processo.

6.6. Histologia

No processo histológico, a determinação do estágio gonadal, foi realizada seguindo o protocolo de fixação, desidratação, corte e coloração modificado por ANTONIO e CAMACHO (2019).

Os organismos foram fixados em solução de Davidson salino por 24 horas e depois imersos em álcool 70% para retirada total do fixador. Posteriormente esses organismos foram desidratados através de banhos sucessivos em diferentes graduações alcoólicas, removido o álcool residual por xilol, e incluídas em parafina (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolo de desidratação e inclusão em parafina.

Reagente	Tempo de imersão
Álcool 70°	24 horas
Álcool I 96°	Uma hora
Álcool II 96°	Uma hora
Álcool I 100°	Duas horas

Álcool II 100°	Uma hora
Xilol I	Uma hora
Xilol II	Uma hora
Parafina líquida I (60 °C)	Uma hora
Parafina líquida II (60 °C)	24 horas

Os blocos de parafina, mantidos a 4°C foram cortados em duas profundidades em secções de 5 µm utilizando um micrótomo, garantindo uma maior representatividade dos dados em relação às gônadas em sua totalidade. Dessa forma, para cada organismo foi produzida um quantitativo de duas lâminas. As secções resultantes foram montadas sobre lâminas e tingidas com a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Posteriormente ocorreu a montagem com meio sintético (Entellan) (Tabela 2).

Tabela 2. Protocolo de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Reagente	Tempo de imersão
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool 100° I	5 minutos
Álcool 100° II	5 minutos
Álcool 96° I	5 minutos
Álcool 70° I	5 minutos
Água Destilada	5 minutos
Hematoxilina	20 segundos
Água corrente	3 minutos
Eosina	40 segundos
Álcool 70° II	5 minutos
Álcool 96° II	5 minutos
Álcool 100° III	5 minutos
Xilol III	5 minutos
Xilol IV	5 minutos

Para cada espécime foram analisadas, utilizando um microscópio binocular, duas lâminas contendo em cada uma delas duas secções de ostra. A determinação dos estágios de desenvolvimento gonadal foi realizada utilizando a escala descrita em ANTONIO e CAMACHO (2019) (Tabela 3).

Tabela 3. Escala de estágios de desenvolvimento gonadal.

Estágio	Descrição
0 (repouso sexual)	Os folículos se comprimem, somente subsistem as células mães das gônias, espermatogônias e ovogônias, elementos sobre os que se desenvolverá a gônada. A diferenciação de machos e fêmeas se realiza com base nas características das espermatogônias e ovogônias.
I (multiplicação das gônias)	As células germinais em repouso se ativam e se produz uma mudança de volume e morfologia nuclear. Encontram-se diferentes estágios de desenvolvimento: células mães, espermatogônias e espermátocitos em machos e células mães, ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos em fêmeas.
II (gametogênese)	A foliculogênese e gametogênese são intensas, chegando a aparecer os primeiros gametas maduros (espermatozoides e ovócitos).
IIIA (maturação)	Período no qual os gametas maduram estando no final desta fase aptos para serem liberados ao meio externo.
IIIB (desova – esvaziamento total ou parcial)	Uma vez alcançada a maturação existem as primeiras liberações de gametas que enchem os gonodutos, deixando espaços intrafoliculares.
IIIC (restauração entre desovas sucessivas)	O tamanho dos folículos diminui, ficando com a aparência de comprimidos. O número de células em desenvolvimento aumenta, enquanto os gametas maduros diminuem.
IIID (fim da estação de reprodução)	Depois da última desova da estação, os folículos estão pequenos e praticamente vazios, restando uns poucos gametas maduros (ovócitos ou espermatozoides), com sinais de citólise. Os folículos são invadidos internamente e externamente por hemócitos, com provável função degenerativa.

O momento de desova foi avaliado determinando a distribuição da frequência quinzenal dos diferentes estágios de maturação em relação ao índice de condição, ao índice de ocupação gonadal e ao diâmetro médio dos ovócitos.

6.7. Proporção sexual

A proporção sexual (sex-ratio), foi estabelecida como a relação do número total de machos e fêmeas, e foi comparada em cada amostragem como a média do número total durante o experimento e entre os tratamentos utilizados.

6.8. Índice de Condição (IC)

Os organismos destinados ao IC foram sexados e em seguida foram levados a estufa a uma temperatura de 45°C até atingirem peso constante.

A determinação do IC foi realizada através da fórmula descrita por WALNE e MANN (1975), a qual se calcula como:

$$IC = \frac{(P1 \times 1000)}{P2}$$

De forma que P1(g) é o peso seco das partes moles e P2(g) é o peso seco das valvas.

6.9. Índice de Ocupação Gonadal (IOG)

O IOG descrito por DELGADO e PÉREZ CAMACHO (2003) como a porcentagem da área gonadal analisada que está ocupada por gametas foi obtida através da seguinte equação:

$$IOG = \left(\frac{\text{área ocupada por gametas}}{\text{área do campo analisado}} \right) \times 100$$

A análise de imagem é feita ao azar dentro da área gonadal. É obtido aleatoriamente uma imagem por secção, como uma matriz de pixels, com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, formando um total de três imagens por indivíduo. Estas imagens são capturadas das lâminas previamente preparadas para a determinação dos estágios gonadais com um aumento de 400X. Cada imagem foi analisada utilizando o software ImageJ® determinando o índice de ocupação gonadal (IOG) em ambos os sexos.

A determinação do IOG no caso dos machos está baseada na distinção cromática produzida pela coloração, que permite agrupar os gametas e medir a área ocupada, enquanto que no caso das fêmeas é feita através da seleção dos objetos por faixa de cor e tamanho, determinando a área e diâmetro máximo de cada ovócito. Somando a área de todos os ovócitos por imagem se obtêm a área ocupada por gametas. Em ambos os casos a área da imagem foi de 86.225,5 µm².

6.10. Diâmetro médio dos ovócitos

O diâmetro médio foi determinado medindo somente os ovócitos que tinham uma vesícula germinativa bem definida, pois estes estariam aptos a serem fertilizados após sua liberação ao ambiente. Para a caracterização da maturação dos ovócitos foi utilizada a escala descrita por LANGO-REYNOSO et al. (2000), que consiste em quatro estágios: gametogênese precoce (3,0-12,0 μm), crescimento (12,1 - 30,0 μm), maturidade (30,1 - 41,0 μm) e degeneração (41,1 - 60,0 μm).

6.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistica 7. Para todos os dados foram analisadas a normalidade mediante o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias através do teste de Cochran quando apresentam o mesmo número de dados e de Bartlett quando apresentam um número distinto. Os dados de IOG tiveram seus valores de porcentagem transformadas em (ARCO SENO da RAIZ). Os dados foram analisados através da Análise de Variância Simples (ANOVA). Para os testes a posteriori foi utilizado o teste de Tukey (HSD). Em todos os casos foi utilizado um α de 5%.

Para análise da proporção sexual foi realizado o teste não paramétrico do qui-quadrado com nível de significância $\alpha = 5,0\%$. Para verificar a relação e influência da salinidade ao índice de ocupação gonadal (IOG) e ao índice de condição (IC), foi realizada análise de regressão múltipla linear separadamente, obtendo-se valores de r^2 e coeficientes de correlação de Pearson.

7. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em dois capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo que será submetido a um periódico da área. No primeiro artigo, apresentamos os resultados do experimento de maturação dos reprodutores da ostra do mangue *C. gasar* sob diferentes temperaturas em laboratório. No segundo artigo, apresentamos resultados do experimento de maturação dos reprodutores da ostra do mangue *C. gasar* sob diferentes salinidades em laboratório.

7.1. CAPÍTULO I

MATURAÇÃO DA OSTRA DO MANGUE (*Crassostrea gasar*) SOB DIFERENTES
TEMPERATURAS CONTROLADAS EM LABORATÓRIO

Aleff Paixão FRANÇA¹; Icaro Gomes ANTONIO¹

¹Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, Campus Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, nº 1000, Jardim São Cristovão, CEP 65055-310, São Luís, MA, Brasil. E-mail: aleffpf@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi induzir o processo de maturação gonadal sob diferentes temperaturas controladas em laboratório. Foram testadas quatro condições térmicas com 4 repetições cada: T1 – temperatura constante de 32°C; T2 – temperatura constante de 24°C; T3 – temperatura variando de 32°C para 24°C e T4 – temperatura variando de 24°C para 32°C. A alimentação foi ministrada duas vezes ao dia na densidade de 10×10^4 cel mL⁻¹. O experimento foi conduzido em tanques retangulares de 12 L (53 x 32,5 x 10 cm) com uma densidade de 35 ostras cada, acoplado a um sistema de troca de água constante, mediante recirculação. A proporção sexual apresentou uma prevalência significativa de fêmeas (61,80%) sobre machos (31,74%) ($p < 0,05$, teste qui-quadrado). Em 6,46% dos reprodutores não foi possível identificar o sexo devido à ausência de gametas. Nossos resultados revelaram um padrão de temperatura ideal para maturação da ostra do mangue *C. gasar* entre 24°C e 26°C e que temperaturas acima destas induzem os reprodutores a liberarem seus gametas. A correlação inversa e forte da temperatura em relação ao IC e IOG reforça os resultados, pois o aumento da temperatura resultou na diminuição destes valores.

Palavra-chave: Desenvolvimento gonadal, tamanho de ovócito, análise de imagem.

MANGROVE OYSTER MATURATION (*Crassostrea gasar*) AT DIFFERENT
CONTROLLED TEMPERATURES IN HATCHERY

ABSTRACT

The objective of the present work was to induce the gonadal maturation process under different controlled temperatures in the hatchery. Four thermal conditions were tested with 4 repetitions each: T1 - constant temperature of 32°C; T2 - constant temperature of 24°C; T3 - temperature ranging from 32°C to 24°C and T4 - temperature ranging from 24°C to 32°C. The food was given twice a day at a density of 10×10^4 cel mL⁻¹. The experiment was carried out in rectangular tanks of 12 L (53 x 32.5 x 10 cm) with a density of 35 oysters each, coupled to a constant water exchange system, through recirculation. The sexual proportion showed a significant prevalence of females (61.80%) over males (31.74%) ($p < 0.05$, chi-square test). In 6.46% of the breeders it was not possible to identify the sex due to the absence of gametes. Our results revealed an ideal temperature pattern for the maturation of the mangrove oyster *C. gasar* between 24°C and 26°C and that temperatures above these induce breeders to release their gametes. The inverse and strong correlation of temperature in relation to CI and GOI reinforces our results, since the increase in temperature resulted in the decrease of these values.

Keywords: Gonadal development, oocyte size, image analysis.

7.1.1. INTRODUÇÃO

Os moluscos apresentam grande importância na produção de pescado, ocupando a terceira posição na produção mundial da aquicultura em 2016, com 17,1 milhões de toneladas, representando aproximadamente 28% da maricultura (FAO, 2018). Dentre as espécies de moluscos bivalves, as ostras do gênero *Crassostrea* possuem elevada importância econômica, com uma produção de 4,9 milhões de toneladas por ano (FAO, 2018).

Apesar de ser pouco utilizada na ostreicultura brasileira, a espécie *Crassostrea gasar* é cultivada desde a região Norte (Sampaio et al., 2017) até a região Sul (Baldan e Bendhack, 2009; Castilho-Westphal et al., 2015). Ela apresenta potencial para a ostreicultura, demonstrando bom crescimento em cultivo (Christo e Absher, 2008; Legat et al., 2017a). Porém, a produção de sementes dessa espécie em laboratório é escassa, sendo nas regiões Norte e Nordeste obtida apenas no ambiente natural através de coletores artificiais (Funio et al., 2019).

A maturação de moluscos bivalves ocorre naturalmente, porém, se houver conhecimento sobre o ciclo reprodutivo do organismo, é possível manipulá-la e acelerá-la em condições controladas. Dessa forma, é possível produzir gametas de alta qualidade e um maior número de larvas viáveis (Utting e Millican, 1997). A maturação das ostras pode ser influenciada por diversos fatores endógenos que são influenciados por fatores exógenos como a alimentação (Dridi et al., 2014; Enríquez - Díaz et al., 2009; Ruiz et al., 1992), fotoperíodo (Fabioux et al., 2005), salinidade (Paixão et al., 2013) e temperatura (Berthelin et al., 2001; Mann, 1979; Thompson, 1984; Weiss et al., 2007).

Dentre as variáveis abióticas, a temperatura possui a maior influência, pois atua diretamente na regulação da reprodução em bivalves (Sastry, 1968; Robinson, 1992; Rodriguez-Jaramillo et al., 2001). Nos moluscos, o aumento da temperatura da água favorece a gametogênese, a fecundidade, a desova e a qualidade dos ovos (Utting e Millican, 1997).

Poucos estudos sobre a maturação da ostra do mangue *C. gasar* foram realizados (Ramos et al., 2013; Ramos et al., 2014) e atualmente somente o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina produz regularmente sementes desta espécie a nível comercial. Algumas pesquisas visando aprimorar a produção de sementes de ostras nativas em laboratório foram realizadas pelo LMM nos últimos anos (Silveira et al., 2011; Areias, 2012; Legat et al., 2017b), porém ainda são necessários mais estudos para o aperfeiçoamento das técnicas de produção em laboratório. Ainda não foram feitos estudos sobre produção de sementes da *C. gasar* no nordeste brasileiro.

O presente estudo partiu da seguinte hipótese: (I) Se a temperatura influencia de forma direta na maturação da ostra do mangue, então espera-se que em temperaturas mais altas, haja uma maior porcentagem de reprodutores maduros, dentro de uma faixa

termal não letal. Dessa forma, nosso objetivo foi induzir o processo de maturação dos gametas sob diferentes temperaturas controladas em laboratório, afim de avaliar as melhores condições térmicas para gametogênese e desova.

7.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.1.2.1. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em tanques retangulares de 12 L (53 x 32,5 x 10 cm), onde foram utilizados 4 tratamentos com 4 repetições cada (tanques) em um sistema de troca de água constante de 500mL/h, mediante recirculação. Foram estocadas em cada unidade experimental 35 ostras (total de 560). O volume utilizado para cada tanque foi de 9L de água marinha.

As ostras foram alimentadas com uma dieta mista composta pelas microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*. As microalgas foram cultivadas em sistema batch utilizando meio de cultura Conway (Walne, 1964) e foram ofertadas aos reprodutores durante a fase exponencial de crescimento em uma dieta diária de 10×10^4 cel mL⁻¹ ministrada duas vezes ao dia.

Os reprodutores utilizados no presente experimento foram trazidos do cultivo experimental realizado no município de Primeira Cruz-MA. Foi realizado uma amostragem de 30 ostras para biometria e pesagem (20 para histologia e 10 para a determinação do índice de condição, a fim de avaliar as condições iniciais dos reprodutores). As ostras apresentaram, ao início do experimento, uma média de altura de 63,07±9,18mm e peso total de 23,54±8,14g (n=30). Para o início do experimento, os reprodutores foram induzidos a liberação massiva de gametas por indução térmica, conforme descrito por Silveira et al. (2011), a fim de padronizar o estágio inicial dos organismos.

Foram testadas quatro condições térmicas com 4 repetições cada:

- T1 – temperatura constante de 32°C;
- T2 – temperatura constante de 24°C;
- T3 – temperatura variando de 32°C para 24°C;
- T4 – temperatura variando de 24°C para 32°C,

Os tratamentos T3 e T4 tiveram suas temperaturas ajustadas quinzenalmente, sendo alteradas em 2°C. A salinidade de 27 foi padronizada para o experimento, a qual foi corrigida diariamente.

A temperatura foi mantida através de aquecedores de água com termostato e foi verificada duas vezes ao dia, manhã e tarde, em conjunto com salinidade, oxigênio dissolvido e pH da água. A temperatura foi aferida por termômetro de mercúrio e a salinidade por refratômetro. O oxigênio dissolvido e pH foram aferidos através de um multiparâmetro modelo AK88 da ASKO.

Foram realizadas 5 amostragens quinzenais, onde foram amostradas 5 ostras por unidade experimental, totalizando 20 ostras por tratamento, sendo 80 ostras por amostragem. Em cada amostragem foi realizada a biometria das ostras com paquímetro (altura, comprimento e largura das valvas em milímetro) e pesagem das valvas, partes moles úmida e seca (em gramas), utilizando balança de precisão. As amostras de tecido seguiram para histologia e determinação do índice de condição, sendo utilizadas 40 ostras em cada processo.

7.1.2.2. Histologia

No processo histológico, a determinação dos estágios gonadais, foi realizada seguindo o protocolo de fixação, desidratação, corte e coloração adaptado de Antonio e Camacho (2019).

Para cada espécime foram analisadas, utilizando um microscópio binocular, duas lâminas contendo em cada uma delas duas secções de ostra. A determinação dos estágios de desenvolvimento gonadal foi realizada utilizando a escala descrita por Antonio e Camacho (2019).

O momento de desova foi avaliado determinando a distribuição da frequência quinzenal dos diferentes estágios de maturação em relação ao índice de condição, ao índice de ocupação gonadal e ao diâmetro médio dos ovócitos.

7.1.2.3. Proporção Sexual

A proporção sexual (sex-ratio) foi estabelecida como a relação do número total de machos e fêmeas e foi comparada em cada amostragem como a média do número total durante o experimento e entre os tratamentos utilizados.

7.1.2.4. Índice de Condição (IC)

Os organismos destinados ao IC foram levados a estufa a uma temperatura de 45°C até atingirem peso constante. A determinação do IC foi realizada através da fórmula descrita por Walne e Mann (1975), a qual se calcula como:

$$IC = \frac{(P1 \times 1000)}{P2}$$

De forma que P1(g) é o peso seco das partes moles e P2(g) é o peso seco das valvas.

7.1.2.5. Índice de Ocupação Gonadal (IOG)

O IOG descrito por Delgado e Pérez Camacho (2003) como a porcentagem da área gonadal analisada que está ocupada por gametas foi obtido através da seguinte equação:

153
$$IOG = \left(\frac{\text{área ocupada por gametas}}{\text{área do campo analisado}} \right) \times 100$$

154 A análise de imagem é feita ao azar dentro da área gonadal. É obtido
155 aleatoriamente uma imagem por secção, como uma matriz de pixels, com o auxílio de
156 uma câmera digital acoplada ao microscópio, formando um total de três imagens por
157 indivíduo. Estas imagens são capturadas das lâminas previamente preparadas para a
158 determinação dos estágios gonadais com um aumento de 400X. Cada imagem foi
159 analisada utilizando o software ImageJ® determinando o índice de ocupação gonadal
160 (IOG) em ambos os sexos.

161 A determinação do IOG no caso dos machos está baseada na distinção cromática
162 produzida pela coloração, que permite agrupar os gametas e medir a área ocupada,
163 enquanto que no caso das fêmeas é feita através da seleção dos objetos por faixa de cor
164 e tamanho, determinando a área e diâmetro máximo de cada ovócito. Somando a área
165 de todos os ovócitos por imagem se obtêm a área ocupada por gametas. Em ambos os
166 casos a área da imagem foi de 86.225,5 µm².

167 **7.1.2.6. Diâmetro Médio dos Ovócitos**

168 O diâmetro médio foi determinado medindo somente os ovócitos que tinham
169 uma vesícula germinativa bem definida. Para a caracterização da maturação dos
170 ovócitos foi utilizada a escala descrita por Lango-Reynoso et al. (2000), que consiste em
171 quatro estágios: gametogênese precoce (3,0-12,0 µm), crescimento (12,1 - 30,0 µm),
172 maturidade (30,1 - 41,0 µm) e degeneração (41,1 - 60,0 µm).

173 **7.1.2.7. Análise Estatística**

174 As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistica 7. Para todos
175 os dados foram analisadas a normalidade mediante o teste de Kolmogorov-Smirnov e a
176 homogeneidade das variâncias através do teste de Cochran quando apresentam o
177 mesmo número de dados e de Bartlett quando apresentam um número distinto. Os
178 dados de IOG tiveram seus valores de porcentagem transformadas em (ARCO SENO da
179 RAIZ). Os dados foram analisados através da Análise de Variância Simples (ANOVA).
180 Para os testes a posteriori, foi utilizado o teste de Tukey (HSD). Em todos os casos foi
181 utilizado um α de 5%.

182 Para análise da proporção sexual foi realizado o teste não paramétrico do qui-
183 quadrado com nível de significância α = 5,0%. Para verificar a relação e influência da
184 temperatura ao índice de ocupação gonadal (IOG) e ao índice de condição (IC), foi
185 realizada análise de regressão múltipla linear, obtendo-se valores de r^2 e coeficientes de
186 correlação de Pearson.

7.1.3. RESULTADOS

7.1.3.1. Variáveis Abióticas da Água

Em relação as variáveis da água, a temperatura ficou dentro do proposto para cada tratamento. A salinidade obteve uma média de 27, o pH demonstrou uma média 7,82, e o O.D apresentou uma média de 3,56 mg/L (Tabela 1).

Houve diferença significativa entre os tratamentos somente em relação a temperatura da água, onde T1 (32°C) foi superior aos demais tratamentos ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

Tabela 1. Médias das variáveis da água aferidas por tratamento durante o experimento.

	T (°C)	S	O.D (mg/L)	pH
T1 (32°C)	32,05 ± 0,25 ^a	28,76 ± 0,22	2,26 ± 0,38	7,66 ± 0,05
T2 (24°C)	23,41 ± 0,67 ^b	27,05 ± 0,38	4,51 ± 2,07	7,94 ± 0,28
T3 (32-24°C)	26,15 ± 2,63 ^b	27,31 ± 1,97	3,47 ± 1,09	7,85 ± 0,29
T4 (24-32°C)	26,46 ± 2,76 ^b	27,31 ± 1,98	4,04 ± 2,44	7,84 ± 0,16

As letras minúsculas representam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

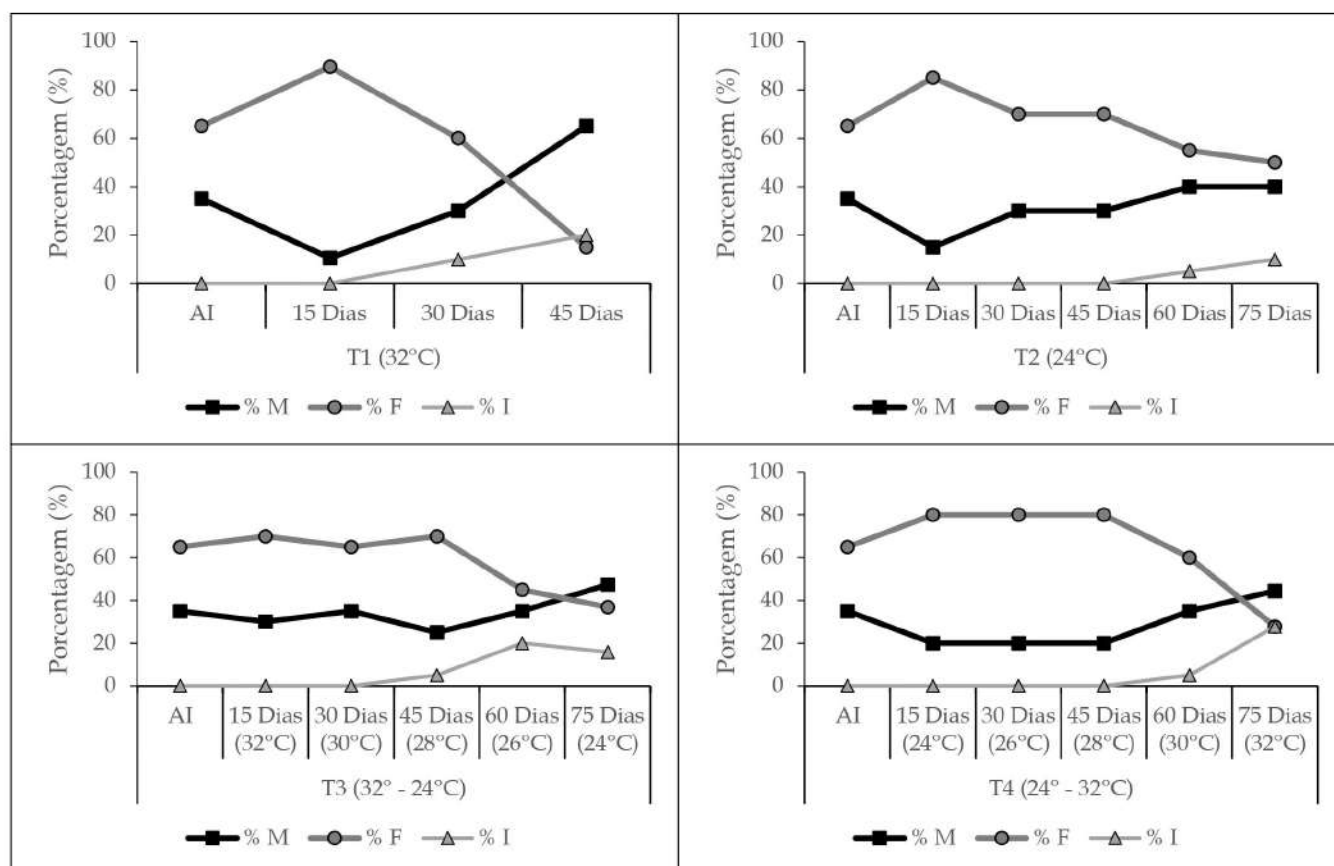
O tratamento 1 apresentou uma duração de apenas 45 dias de experimento, devido a exposição prolongada à temperatura constante de 32°C e o baixo teor de oxigênio dissolvido (2,26 mg/L) ter sido letal para os espécimes de *C. gasar*.

7.1.3.2. Proporção Sexual

A proporção sexual (macho:fêmea) foi de 1:1,94, apresentando uma prevalência significativa de fêmeas (61,80%) sobre machos (31,74%) ($p < 0,05$, teste qui-quadrado). Em 6,46% dos reprodutores não foi possível identificar o sexo devido à ausência de gametas.

Em relação as amostragens, existiu prevalência significativa de fêmeas sobre machos nas amostragens de 15, 30 e 45 dias de experimento ($p < 0,05$, teste qui-quadrado). A proporção sexual variou entre os tratamentos, sendo T1 (1:1,52), T2 com (1:2,19), T3 (1:1,67) e T4 (1:2,40), onde houve uma proporção significativamente superior de fêmeas em relação a machos em todos os tratamentos ($p < 0,05$, teste Qui-quadrado) (Figura 1).

Figura 1. Proporção sexual dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes condições térmicas de maturação. (AI) – Amostragem inicial.

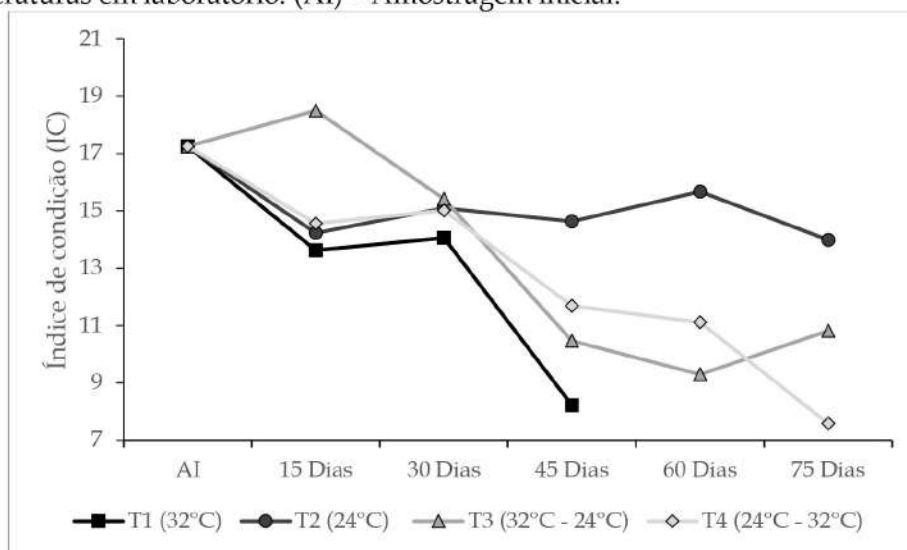


7.1.3.3. Índice de Condição (IC)

O índice de condição (IC) da amostragem inicial foi de 17,25 e durante o desenvolvimento do experimento, os reprodutores obtiveram maiores valores de IC em temperaturas entre 24°C e 26°C. Por outro lado, os valores mais baixos foram observados em temperaturas entre 30°C e 32°C (Figura 2).

Na avaliação do IC entre tratamentos, foi observada diferença significativa, onde T2 (24°C) foi superior aos demais tratamentos, apresentando uma média de 15,15 ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey). Os tratamentos T3 (32-24°C), T1 (32°C) e T4 (24-32°C), apresentaram médias de 13,62; 13,29 e 12,87 respectivamente.

Figura 2. Médias de IC dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes temperaturas em laboratório. (AI) – Amostragem inicial.



7.1.3.4. Estágios Gonadais

Os estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* demonstraram, ao avaliar todos os tratamentos no final do experimento, que sob temperatura constante de 24°C (T2), existe elevada maturação (IIIA) (86,67%) e baixa liberação de gametas (IIIB e IIID) (13,33%). Por outro lado, sob temperatura constante de 32°C (T1), os organismos apresentaram maior taxa de liberação de gametas (IIIB, IIIC e IIID) (57,14%), enquanto houve apenas 42,86% de reprodutores em maturação (IIIA) (Figura 3 e 4).

Nos tratamentos com variações térmicas (T3 e T4), observamos que em temperaturas entre 24°C e 26°C, há uma elevada maturação de gametas (IIIA) (65%) e uma baixa liberação de gametas (IIIB e IIID) de 35%. Em temperaturas mais altas, entre 28°C e 32°C, a maturação (IIIA) é de 40,44% e a desova (IIIB e IIID) de 59,56%.

O tratamento T4 (24°C a 32°C) apresentou 67,74% de reprodutores em maturação (IIIA) e 32,26% de liberação de gametas (IIIB e IIID). O T3 (32°C-24°C) apresentou resultados inversos ao anterior, demonstrando 58,62% em liberação de gametas (IIIB e IIID) e 41,38% de reprodutores maduros (IIIA) (Figura 3 e 4).

Figura 3. Estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* sob diferentes condições térmicas de maturação. AI - Amostragem inicial, IIIA - estágio de maturação, IIIB - estágio de liberação de gametas, IIIC - estágio de restauração entre desovas sucessivas e IIID - estágio de fim do período reprodutivo.

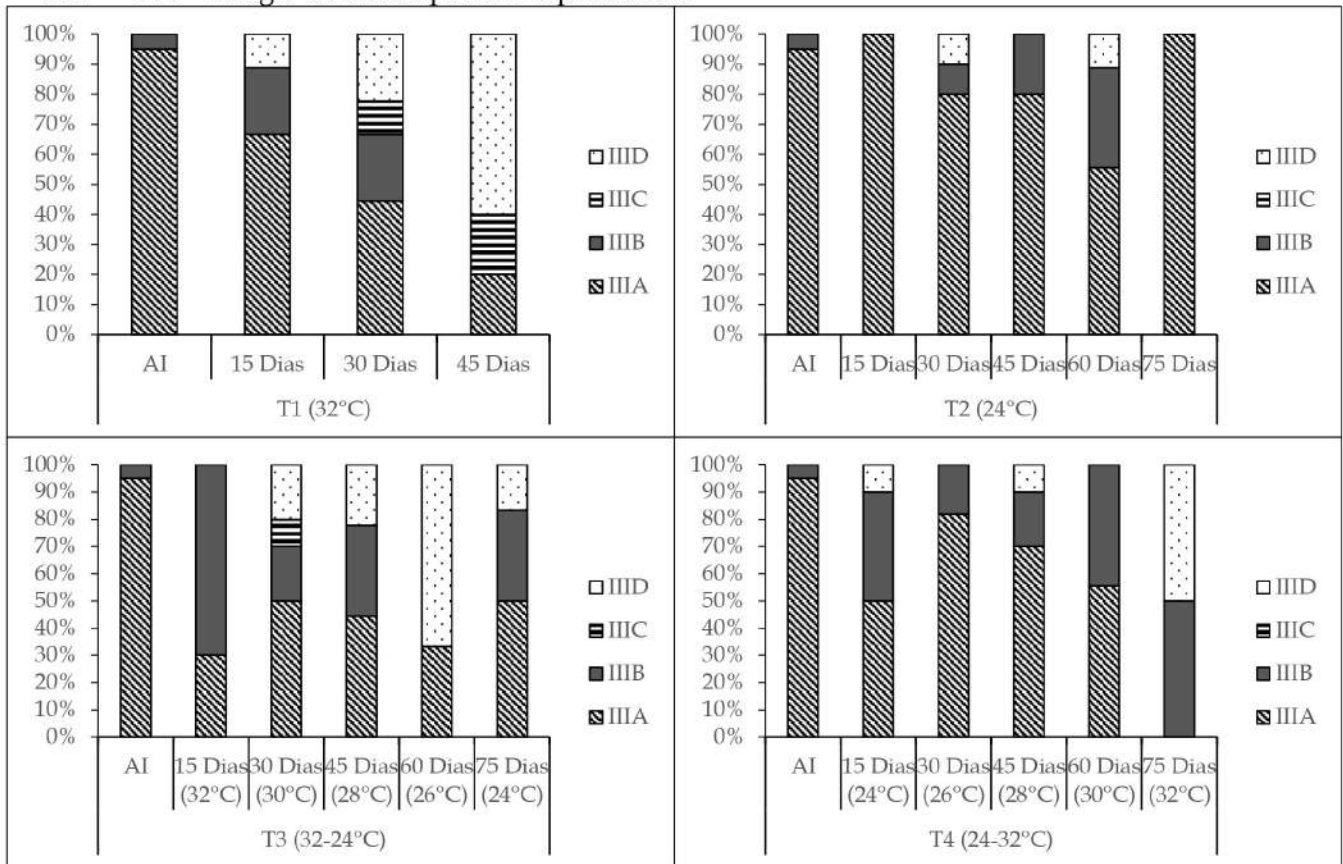
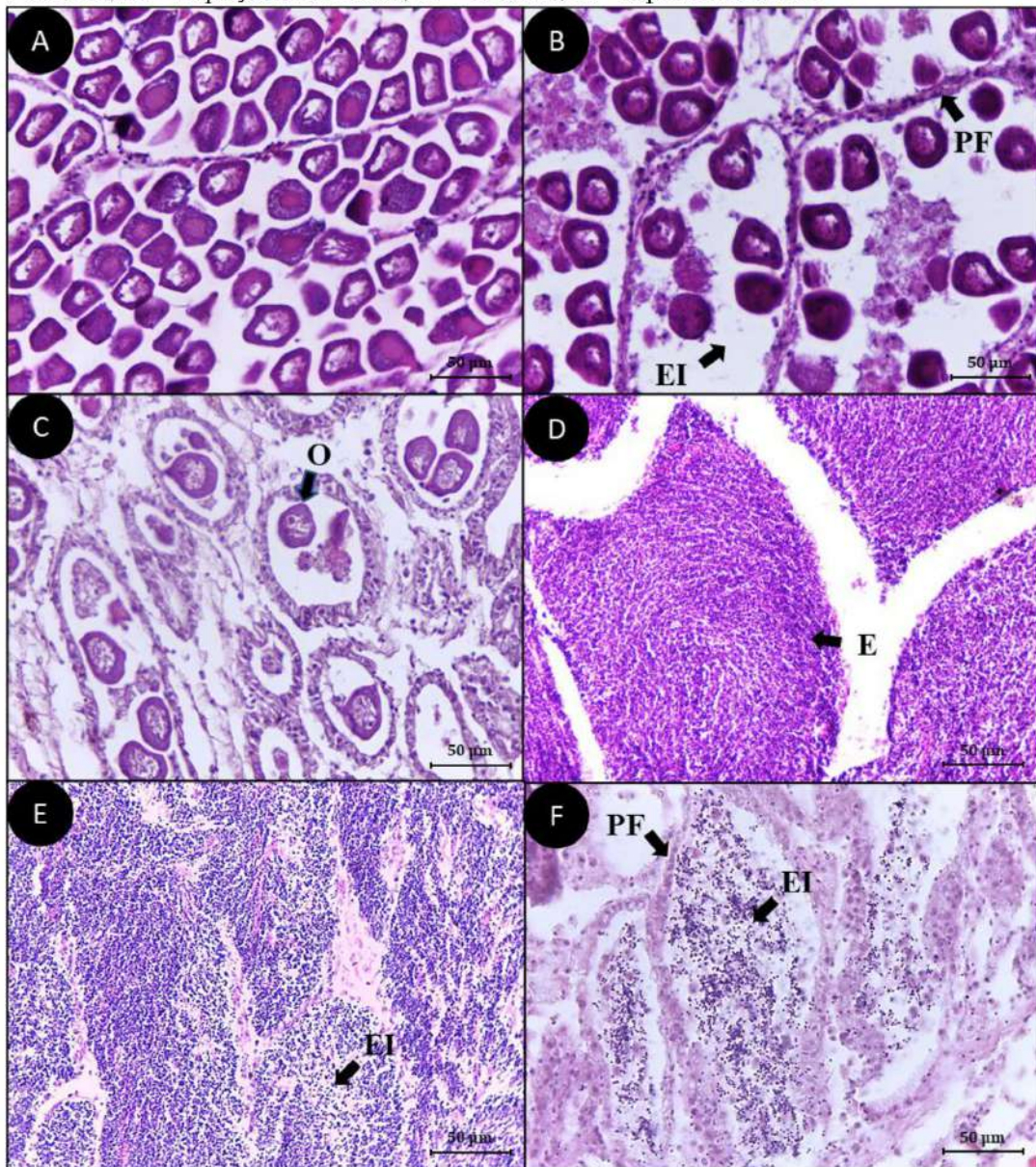


Figura 4. (A, B e C) Gônada feminina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm). (D, E, F) Gônada masculina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm). PF – Parede Folicular; EI – Espaço Intracelular; O – Ovócito; E – Espermatozoide.

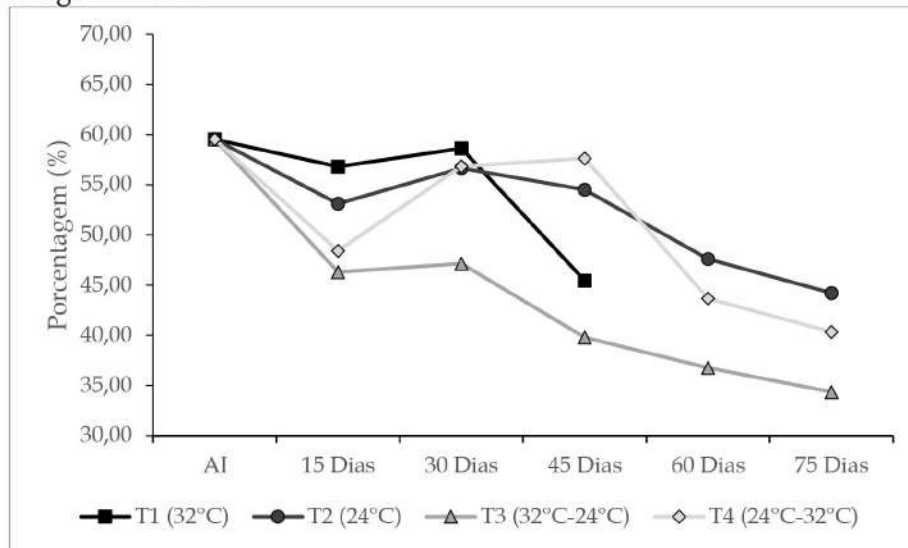


7.1.3.5. Índice de Ocupação Gonadal (IOG)

O índice de ocupação gonadal (IOG) demonstrou em temperatura alta do T1 (32°C) uma média de 46,23% e um decréscimo de 13,19% após 45 dias de experimento. Em temperaturas mais baixas entre 24°C e 28°C (T4), foram verificadas médias similares de 46,06%, porém demonstraram um acréscimo de 9,21% nesse mesmo período. O T2 (24°C) apresentou a maior média de área de ocupação gonadal ao final do experimento, com média de ocupação de 52,62%. O tratamento que apresentou menor valor médio após 75 dias de experimento foi o T3 (32°C-24°C) com 43,99% (Figura 5).

As análises estatísticas apontaram diferença significativa da área ocupada por gametas em relação aos tratamentos, sendo o T3 (32°C-24°C) inferior aos demais ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

Figura 5. Valores médios percentuais do índice de ocupação gonadal (IOG) dos reprodutores de *C. gasar* mantidos em laboratório em diferentes condições térmicas. (AI) – Amostragem inicial.

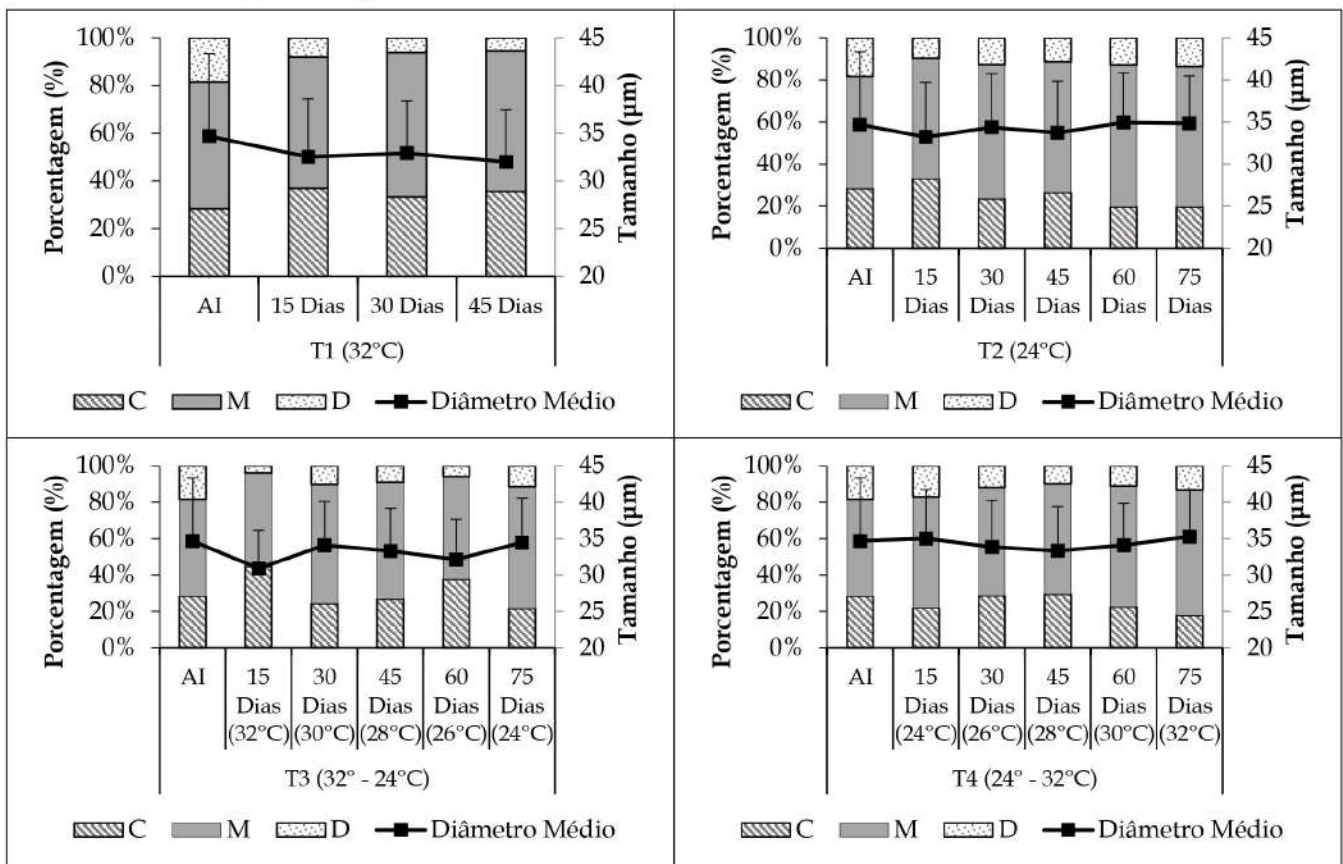


7.1.3.6. Tamanho Médio dos Ovócitos

A amostragem inicial apresentou um diâmetro médio dos ovócitos de $34,70 \pm 8,65 \mu\text{m}$. As médias mais altas de diâmetro de ovócitos foram observadas em temperaturas mais baixas ($34,59 \pm 5,98 \mu\text{m}$), enquanto as temperaturas mais altas contribuíram para uma diminuição do diâmetro médio ($32,91 \pm 5,98 \mu\text{m}$). A caracterização dos ovócitos em diferentes estágios identificou que 60% dos organismos apresentavam-se no estágio de maduro, exibindo ovócitos com diâmetros entre 30,1 e 41 μm (Figura 6).

Não houve diferença significativa do diâmetro médio de ovócitos em relação aos tratamentos ($p > 0,05$, ANOVA).

Figura 6. Diâmetro médio (μm) e classes de tamanhos dos ovócitos de *C. gasar* submetida a diferentes condições térmicas. (AI) - Amostragem inicial, (C) - Crescimento, (M) - Maduro, (D) - Degenerado.



7.1.3.7. Influência da Temperatura em Relação ao Índice de Condição (IC) e ao Índice de Ocupação Gonadal (IOG)

Os coeficientes de correlação de Pearson e os valores de r^2 foram mais elevados para o IC nos dois tratamentos que apresentaram variação térmica (T3 e T4), porém com tendências diferentes, onde a diminuição de temperatura (32-24°C) propiciou um incremento do IC e o aumento de temperatura (24-32°C) demonstrou uma relação inversa, com diminuição dos valores de IC. Em relação aos tratamentos com temperaturas constantes (T1 e T2) as correlações foram moderadas (Tabela 2).

A correlação do IOG com a temperatura apresentou em todos os tratamentos, uma elevada correlação, com valores superiores a 0,61. As maiores correlações foram com os tratamentos T2 (24°C) e T3 (32-24°C), indicando que as temperaturas mais baixas propiciaram os maiores valores de IOG. Por outro lado, o T4 (24°C-32°C) apresentou uma relação inversa, onde o aumento da temperatura levou a diminuição dos valores de IOG.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson e valores de r^2 obtidos na análise de regressão múltipla linear entre IC e IOG em relação a diferentes temperaturas.

	Tratamentos	Temperatura	r^2
IC	T1 (32°C)	0,56	0,31
	T2 (24°C)	0,37	0,14
	T3 (32°C-24°C)	0,77	0,59
	T4 (24°C-32°C)	-0,97	0,94
IOG	T1 (32°C)	0,61	0,36
	T2 (24°C)	0,84	0,71
	T3 (32°C-24°C)	0,85	0,72
	T4 (24°C-32°C)	-0,72	0,52

7.1.4. DISCUSSÃO

Um fator importante na obtenção de respostas para o experimento consiste no acompanhamento das variáveis abióticas da água. A salinidade obteve uma média de 27. A salinidade utilizada está bem próxima da faixa ideal para a espécie encontrada por Funo et al. (2015), estudando espécimes de *C. gasar* oriundas do estado do Pará, observaram que essa espécie apresenta sobrevivência acima de 80% entre a salinidade de 15 a 45 e superior a 90% entre salinidade de 20 e 25.

O pH não demonstrou uma grande variação entre os tratamentos, tendo uma média 7,82. De acordo com a legislação para águas de Classe 5, que são salinas propostas para criação natural de espécies destinadas a alimentação humana, o pH deve estar entre 6,5 e 8,5 (Brasil, 2005). Baixos valores de pH, próximo a 6,75 reduzem a taxa de filtração em moluscos bivalves e consequentemente há diminuição da captação de alimento (Imai, 1977).

O oxigênio dissolvido foi o parâmetro avaliado que mais variou entre os tratamentos, porém não significativamente ($p > 0,05$, ANOVA). Ele apresentou a média mais baixa no T1 (32°C) com 2,26 mg/L e a maior média no T2 (24°C) com 4,51 mg/L. Isto ocorre devido a solubilidade do oxigênio ser maior em água mais fria, ou seja, ela retém mais oxigênio. Já em água de maior temperatura, além de reter menos oxigênio, ainda tem o alto consumo devido ao aceleração do metabolismo dos organismos cultivados.

A exposição prolongada a temperatura constante de 32°C e o baixo teor de oxigênio dissolvido (2,26 mg/L) foi letal para os espécimes de *C. gasar*, suportando 45 dias de experimento. Segundo a Resolução CONAMA 357/05, é estabelecido um teor de 5,0 mg/L para preservação da vida aquática, mas existe uma variação na tolerância de espécie para espécie (Brasil, 2005). Espécimes de *C. rhizophorae* sobreviveram em água com teores de oxigênio dissolvido, entre 2,5 a 3,2 mg/L, quando submetidas a tratamentos de efluentes de carcinicultura em Canavieiras – BA por Oliveira et al. (2014). Baseando-se em estudo realizado por Reyes (1995), tais valores de oxigênio dissolvido não prejudicaram o desenvolvimento e a alimentação das ostras.

Os resultados de proporção sexual apresentaram uma prevalência de fêmeas (61,80%) sobre machos (31,74%), e em 6,46% dos reprodutores não foi possível identificar o sexo devido à ausência de gametas. A superioridade de proporção feminina também foi significativa e observada em todos os tratamentos, sendo T1 (1:1,52), T2 (1:2,19), T3 (1:1,67) e T4 (1:2,40) (M:F). Estes resultados são semelhantes aos encontrados para a mesma espécie por Christo (2006) com uma proporção de 1:1,4 (M:F) em Baía de Guaratuba – PR, por Ramos et al. (2014) com uma proporção de 1:1,68 em Florianópolis – SC e Sousa (2017) com uma proporção de 1:1,3 em Raposa – MA. Porém, a prevalência de fêmeas sobre machos não é regra para *C. gasar*, pois Galvão et al. (2000) observaram uma prevalência de 1:0,76 (M:F) em Cananeia – SP.

Nossos resultados de IC demonstraram que os reprodutores de *C. gasar* possuem condições favoráveis para incrementar seus valores de massa corporal em temperaturas mais baixas, entre 24°C e 26°C. O aumento de temperatura induz a diminuição desses valores, sendo estes mais baixos em temperaturas entre 30°C e 32°C. Em pesquisa realizada na Praia de Sambaqui - SC, utilizando a mesma espécie, Gomes et al. (2014) encontraram valores médios de IC (11,0) para essa mesma faixa de temperatura da água, sendo este valor bem próximo aos encontrados em nossa pesquisa. Este mesmo padrão de valores de IC foi encontrado em um estudo em Florianópolis-SC, onde os autores observaram um aumento progressivo do valor do IC em temperaturas mais baixas (T18) e valores de IC reduzidos em temperaturas mais altas (T26), com uma variação de IC entre 7,0 e 9,0 (Ramos et al., 2014), sendo estes valores inferiores aos encontrados em nossa pesquisa.

O IC tem sido usado para estimar as diferenças de crescimento entre ostras que vivem em ambientes sujeitos a diferentes salinidades e regimes de temperatura (Austin et al., 1993; Schumacker et al., 1998). A temperatura e outros fatores exógenos regem o ciclo reprodutivo de moluscos bivalves. Durante um período de inatividade sexual, são acumuladas reservas de energia e nutrientes. Elas são usadas principalmente na gametogênese e diminuem durante a desova (Gomes et al., 2014).

De acordo com alguns estudos, estágios de gônadas maduras coincidem com maiores valores de IC (Nascimento & Pereira 1980; Galvão et al., 2000; Christo e Absher 2006). Por outro lado, uma redução no IC pode representar períodos de estresse, envolvendo o uso de reservas energéticas e/ou eliminação de gametas (Bayne et al., 1985).

O IC compara um numerador sensível, peso das partes moles, com um numerador relativamente estável, peso das valvas (Mercado-Silva, 2005). O resultado está baseado no peso da carne sem a influência da água do organismo, perdida no processo de desidratação, porém não há como estimar o quanto dessa perda está relacionada ao volume da gônada.

A manutenção de temperaturas baixas mantém os animais em um processo de acúmulo de reservas e maturação de gametas, sem a liberação de gametas, porém

quando ocorre o aumento de temperatura, existe um estímulo a liberação de gametas o que pode indicar uma diminuição dos dados de IC. A temperatura da água do Maranhão varia entre 28°C – 32°C, logo, temperaturas abaixo dessa faixa podem manter os reprodutores de ostra em estado de acúmulo de reserva energética, indicando os valores altos de IC.

Em nossa pesquisa, os estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* demonstraram que a melhor condição térmica para maturação de gametas (IIIA) está entre 24°C e 26°C, com uma elevada porcentagem (65%), sendo o T2 (24°C) o mais adequado. Organismos em estágios IIIB e IIID (liberação de gametas) foram observados em maiores proporções em temperaturas mais altas, entre 28°C e 32°C, alcançando 59,56% na temperatura mais alta.

Estudando a espécie *C. gasar* em Raposa – MA, Sousa (2017) observou que houve liberação de gametas durante o ano todo, podendo estar relacionado à alta e pouca variação da temperatura da água no estado do Maranhão. Rodríguez-Jaramillo et al. (2008), em estudo realizado com a espécie de ostra tropical *Crassostrea corteziensis* em uma lagoa costeira no noroeste do México, observou que no período de agosto e setembro, momento em que a temperatura estava acima de 30°C, houve uma maior frequência de ostras nos estágios de desova.

A ostra do mangue *C. gasar* habita áreas costeiras e estuarinas de manguezais em regiões tropicais, sendo uma espécie euritermal, suportando uma ampla variação de temperatura (16°C - 35°C), sendo sua faixa confortável de temperatura entre 23°C e 31°C (Nascimento 1991, Ansa & Bashir 2007). Existem picos de desova que parecem estar relacionados principalmente aos períodos do ano de grande variação de salinidade e temperatura, notadamente presentes nos períodos de transição entre a época seca e chuvosa e vice-versa (Paixão et al., 2013). Dessa forma, é possível notar a influência direta da temperatura da água no desenvolvimento gonadal.

Os resultados do índice de ocupação gonadal (IOG) indicam que os reprodutores demonstraram valores de 46% de gametas ocupando a área gonadal em temperaturas altas entre 30°C e 32°C, e temperaturas mais baixas entre 24°C e 26°C. Porém, após 45 dias após o início do experimento, a alta temperatura do T1 (32°C) resultou em um decréscimo de 13,19% de gametas ocupando a área gonadal, enquanto que as baixas temperaturas do tratamento T4, entre 24°C e 28°C, proporcionou o melhor aumento de área, partindo de 48,42% para 57,63%, ocasionando um aumento de 9,21%, sendo esta faixa térmica a ideal.

A faixa térmica de maturação encontrada em nosso estudo foi próxima a encontrada por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008), onde eles sugerem que reprodutores masculinos e femininos de *C. corteziensis* maturam em temperaturas superiores a 20°C, porém desovam sob estímulo de temperaturas acima de 27°C. Frias-Espericueta et al. (1997) propuseram que uma redução no IOG em *C. corteziensis* era resultado da atividade de desova que ocorreu devido ao aumento da temperatura. Este mesmo padrão ocorre

para ostras de clima temperado, como por exemplo a *Crassostrea gigas* que desovam sob o estímulo do aumento de temperatura, sendo esta superior a 19°C (Mann 1979).

A biometria dos ovócitos apresentou uma grande porcentagem de ovócitos maduros (30,1 e 41,0µm) em todos os tratamentos, com um valor de 60% (n=13622). A amostragem inicial apresentou média de tamanho de 34,70±8,65µm. A média de tamanho de ovócito se manteve próxima da inicial em temperaturas mais baixas, entre 24°C e 26°C, com média de 34,59±5,98µm. O aumento da temperatura influenciou no aumento de ovócitos em crescimento, devido a ocorrência de desova, ocasionando em uma diminuição da média de ovócitos para 32,91±5,98µm.

Em estudo realizado com a espécie *C. corteziensis* em uma lagoa do México, Rodríguez-Jaramillo et al., (2008) observaram que os ovócitos estavam em sua maioria caracterizados como ovócitos maduros com uma média de 31,6±0,8µm, tendo maior presença a uma temperatura de 22°C. Os autores observaram também um aumento na quantidade de ovócitos em crescimento no início da primavera, quando há um aumento de temperatura, com média de tamanho de 27,1±1,4µm. Nossos resultados condizem com os encontrados pelos autores citados. Dessa forma, sugerimos que a alta temperatura favorece o crescimento dos ovócitos, tornando-os maduros e hábeis a fertilização.

Nossos resultados indicaram uma correlação negativa da temperatura com o IC e o IOG, onde o aumento da temperatura resultou na diminuição destes valores. Condições térmicas mais baixas, favoreceram o incremento dos valores de IC e IOG. Os resultados de índice de condição (IC), estágios gonadais e índice de ocupação gonadal (IOG) demonstraram que a maturação dos reprodutores ocorre preferencialmente em temperaturas entre 24°C e 26°C e que a liberação de gametas é estimulada em temperaturas mais altas entre 30°C e 32°C, proporcionando um aumento de ovócitos em crescimento.

Estudos com bivalves, apontam que a variação de temperatura está estritamente relacionada ao início da atividade gametogênica, desempenhando um papel primordial nos processos de maturação fisiológica dos gametas, sendo um dos principais fatores na regulação da reprodução em bivalves (Loosanoff e Davis 1952; Rodríguez-Jaramillo et al., 2001; Sastry, 1968; Robinson 1992; Vélez e Epifanio 1981).

7.1.5. CONCLUSÃO

Nossos resultados de índice de condição, estágios gonadais e índice de ocupação gonadal, revelaram um padrão de temperatura ideal para a maturação da ostra do mangue *C. gasar*, sendo este entre 24°C e 26°C. Temperaturas acima destas induzem os reprodutores a desovarem, influenciando um aumento de ovócitos em crescimento, caracterizado pelo surgimento de uma nova coorte de gametas.

Estes resultados são reforçados por uma correlação negativa da temperatura em relação a IC e ao IOG, ou seja, o aumento da temperatura resultou na diminuição destes valores. Condições térmicas mais baixas, favoreceram o incremento de valores.

Dessa forma, rejeitamos a hipótese proposta na pesquisa, de que a alta temperatura favorece a maturação dos reprodutores. Estes resultados servirão para integrar o protocolo de produção de sementes do Laboratório de Fisiocologia, Reprodução e Cultivo de Organismos Marinhos- FISIOMAR e iniciar a produção de sementes de ostras de conhecida procedência e especificidade.

7.1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ansa, E.J.; Bashir, R.M. 2007. Fishing and culture potential of mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) in Nigeria. **Research Journal of Biological Sciences**, (2): 392-394.

Antonio, I.G.; Camacho, A.P. 2019. Reproduction of the introduced oyster *Magallana gigas* (Bivalvia: Ostreidae) cultured on rafts in Spain. **Acta Zoologica**. Available on-line on 23 February 2018. <https://doi.org/10.1111/azo.12248>

Areias, D.L.L. 2012. **Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795)**. Porto. 74f. (Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto).

Austin, H.; Haven, D.S.; Moustafa, M.S. 1993. The relationship between trends in a condition index of the American oyster, *Crassostrea virginica*, and environmental parameters in three Virginia estuaries. **Estuaries**, 16 (2): 362-374.

Baldan, A.P.; Bendhack, F. 2009. Maricultura sustentável no litoral do Paraná, Brasil: atualidades e perspectivas. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, 7 (4):491-497.

Bayne, B.L.; Brow, D.A.; Burnas, K.; Dixon, D.R.; Ivanovici, A.; Ivingstone, D.R.; Lowe, D.M.; Moore, M.N.; Stebbing, A.R.D.; Widdows, J. 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. **Praeger Publishers**, New York, 384p.

Berthelin, C. H.; Laisney, J.; Espinosa, J.; Martin, O.; Hernandez, G.; Mathieu, M.; Kellner, K. 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**, 40 (1): 79-86. <https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1080/07924259.2001.9652500>

Brasil. 2005. **Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Parâmetros de qualidade das águas segundo seu uso preponderante. Resolução nº 357, 18 de março de 2005.** <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. (07/01/2020).

- 474 Castilho-Westphal, G.G.; Magnani, F.P.; Ostrensky, A. 2015. Gonad morphology and
475 reproductive cycle of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) in the
476 Baía de Guaratuba, Paraná, Brazil. *Acta Zoologica* (Stockholm) 96: 99-107.
- 477 Christo, S.W. 2006. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea***
478 **(Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo.** Paraná.
479 146f. (Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná).
- 480 Christo, S. W.; Absher, T. M. 2008. Prodissoconch growth of oysters *Crassostrea* Sacco,
481 1897 (Bivalvia, Ostreidae) **Boletim do Instituto de Pesca**, 34 (1): 71-77.
- 482 Delgado, M.; Pérez-Camacho, A. 2003. A study of gonadal development in *Ruditapes*
483 *decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: Influence of food
484 ration and energy balance. **Journal of Shellfish Research**, 22 (2): 435-441.
- 485 Dridi, S.; Rhomdhane, M. S.; Elcafsi, M. 2014. Gametogenic cycle of *Crassostrea gigas* in
486 contrasting Mediterranean habitats: Marine (Gulf of Tunis) and continental (Bizert
487 lagoon) culture sites. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, 21, 13. [https://doi-](https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1186/2241-5793-21-13)
488 [org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1186/2241-5793-21-13](https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1186/2241-5793-21-13)
- 489 Enríquez-Díaz, M.; Pouvreau, S.; Chávez-Villalba, J.; Le Pennec, M. 2009.
490 Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant
491 oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an environment-dependent strategy. **Aquaculture**
492 **International**, 17 (5): 491-506. [https://doi-](https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10499-008-9219-1)
493 [org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10499-008-9219-1](https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10499-008-9219-1)
- 494 Fabioux, C.; Huvet, A.; Le Souchu, P.; Le Pennec, M.; Pouvreau, S. 2005. Temperature
495 and photoperiod drive *Crassostrea gigas* internal clock. **Aquaculture**, 250 (1-2): 458-470.
496 <https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aquaculture.2005.02.038>
- 497 FAO. 2018. **The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable**
498 **development goals.** Roma, 227p.
- 499 Funo, I.C.S.; Antonio, I.G.; Marinho, Y.F.; Galvez, A.O. 2015. Influence of salinity on
500 survival and growth of *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 41 (4): 837-847.
- 501 Funo, I.C.S.A; Antonio, I.G.; Marinho, Y.F.; Monteles, J.S., Lopes, R.G.P.S., Galvez, A.O.
502 2019. Recruitment of artificial collectors on the Amazon macrotidal mangrove coast.
503 **Ciência Rural** 49 (03). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180482>
- 504 Frias-Espericueta, M.G.; Paez-Osuna, F.; Osuna-Lopez, J.I. 1997. Seasonal changes in the
505 gonadal state of the oysters *Crassostrea iridescens* and *Crassostrea corteziensis* (Filibranchia:
506 Ostreidae) in the Northwest coast of México. **Revista de Biología Tropical**, 45 (3): 1061-
507 1065.

- 508 Galvão, M. S. N.; Pereira, O. M.; Machado, I. C.; Henrique, M. B. 2000. Reproductive
509 characters of the oyster *Crassostrea brasiliiana* from mangroves of Cananéia estuary, São
510 Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 26 (2): 147-162.
- 511 Gomes, C.H.A.M.; Silva, F.C.; Lopes, G.R; Melo, C.M.R. 2014. The reproductive cycle of
512 the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**, 74 (4).
513 <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.04912>
- 514 Imai, T. 1977. The evolution of the oyster culture. In: ROTTERDAM, A.A. **Aquaculture**
515 **in Shallow Sea**. Balkema, p.115-262.
- 516 Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, JC e Le Pennec, M. 2000. Oocyte size, a
517 means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*
518 (Thunberg). **Aquaculture**, 190: 183 - 199.
- 519 Legat, J.F.A.; Puchnick-Legat, A.; Fogaça, F.H.S.; Tureck, C.R.; Suhnel, S.; Melo, C.M.R.
520 2017a. Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea gasar* cultured in the Northeast
521 and South of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 43(2): 172-184.
- 522 Legat, J.F.A.; Puchnick-Legat, A.; Gomes, C.H.A.M.; Suhnel, S.; Melo, C.M.R. 2017b.
523 Effects of salinity on fertilization and larviculture of the mangrove oyster, *Crassostrea*
524 *gasar* in the laboratory. **Aquaculture** 468: 545-548.
- 525 Loosanoff, V.L.; Davis, H. 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of
526 northern oyster. **Biology Bulletin**, 103: 80-96.
- 527 Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and
528 gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated
529 temperatures. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**,
530 59, 95- 110. <https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S0025315400046208>
- 531 Mercado-Silva, N. 2005. Condition index of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*
532 (Gmelin, 1791) in Sapelo Island Georgia--effects of site, position on bed and pea crab
533 parasitism. **Journal of Shellfish Research**, 24 (1): 121-126.
- 534 Nascimento, I.A.; Pereira, S.A. 1980. Change in the condition index from mangrove
535 oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from Todos os Santos Bay, Salvador, Brazil. **Aquaculture**
536 20: 9-15.
- 537 Nascimento, I.A. 1991. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) e *C. brasiliiana* (Lamarck) in
538 South and Central America. In: MENZEL, W. **Estuarine and Marine Mollusk Culture**,
539 125-134.

- 540 Oliveira, K.F.; Azevedo, R.V.; Pereira, M.C.; Santos, M.J.M.; Carvalho, J.S.O.; Braga,
541 L.G.T. 2014. Uso da ostra *Crassostrea rhizophorae* como filtro biológico para tratamento de
542 efluentes da carcinicultura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 35 (4): 2789-2798.
- 543 Paixão, L.; Ferreira, M.A.; Nunes, Z.; Fonseca-Sizo, F.; Rocha, R. 2013. Effects of salinity
544 and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster *Crassostrea gasar*:
545 Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture**, 380: 6-12.
546 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.019>
- 547 Ramos, C.O.; Ferreira, J.F.; Melo, C.M.R. 2013. Maturation of native oyster *Crassostrea*
548 *gasar* at different diets in the laboratory. **Boletim do Instituto de Pesca**, Sao Paulo, 39 (2):
549 107-120.
- 550 Ramos, C.O.; Gomes, C.H.A.M.; Magalhães, A.R.M.; Santos, A.I.; Melo, C.M.R. 2014.
551 Maturation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* at different temperatures in the
552 laboratory. **Journal of Shellfish Research**, 33 (1): 187-194.
- 553 Reyes, L. M. A. 1995. **Fundamentos de acuicultura marina**. Santafé de Bogotá: INPA,
554 225 p.
- 555 Robinson, A. 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina
556 Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture.
557 **Aquaculture** 106: 89-97. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90252-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90252-G)
- 558 Rodríguez-Jaramillo, C.; Hurtado, M.A.; Romero-Vivas, E.; Ramírez, J.L.; Manzano, M.;
559 Palacios, E. 2008. Gonadal development and Histochemistry of the Tropical Oyster,
560 *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an Annual Reproductive Cycle. **Journal of**
561 **Shellfish Research**, 27 (5): 1129-1141. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1129>
- 562 Rodríguez-Jaramillo, C.; Maeda-Martinez, N.A.; Valdez, M.E.; Reynoso-Granados, T.;
563 Monsalvo-Spencer, P.; Prado-Ancona, D.; Cardoza-Velasco, F.; Robles-Mungaray, M.;
564 Sicard, M.T. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell
565 *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). **Journal of Shellfish Research**, 20: 39-
566 47.
- 567 Ruiz, C.; Abad, M.; Sedano, F.; Garcia-Martin, L.O.; Sánchez López, J.L. 1992. Influence
568 of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical
569 composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia,
570 Spain. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 155: 249-262.
571 [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90066-I](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90066-I)
- 572 Sampaio, D.S.; Tagliaro, C.H.; Schneider, H.; Beasley, C.R. 2017. Oyster culture on the
573 Amazon mangrove coast: asymmetries and advances in an emerging sector. **Reviews in**
574 **Aquaculture**, 11 (1): 88-104. <https://doi.org/10.1111/raq.12227>

- 575 Sastry, A.N. 1968. The Relationships among Food, Temperature, and Gonad
576 Development of the Bay Scallops *Aequipecten irradians* Lamarck. **Physiological Zoology**,
577 41 (1): 44-53.
- 578 Silveira, R.C.; Silva, F.C.; Gomes, C.H.M.; Ferreira, J.F.; Melo, C.M.R. 2011. Larval
579 settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819)
580 using different systems to induce metamorphosis. **Brazilian Journal of Biology**, 71 (2):
581 557-562.
- 582 Sousa, A.C.R. 2017. **Biologia reprodutiva de *Crassostrea gasar* (Andanson, 1757) no**
583 **município de Raposa - MA.** São Luís. 33f. (Monografia. Universidade Estadual do
584 Maranhão).
- 585 Schumacker, E.J.; Dumbauld, B.R.; Kauffman, B.E. 1998. Investigations using oyster
586 condition index to monitor the aquatic environment of Wilapa Bay Washington. **Journal**
587 **of Shellfish Research**. 17: 338-339.
- 588 Thompson, R. J. 1984. The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel
589 *Mytilus edulis* in a subarctic, non-estuarine environment. **Marine Biology**, 79, 277- 288.
590 <https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1007/BF00393259>
- 591 Utting, S.D.; Millican, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve
592 broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. **Aquaculture**
593 155: 45-54.
- 594 Vélez, R.A.; Epifanio, C.E. 1981. Effects of temperature and ration on gametogenesis and
595 growth in the tropical mussel *Perna perna* (L.). **Aquaculture** 22: 21-26.
- 596 Walne, P.R. 1964. Observations of the fertility of the oyster (*Ostrea edulis*). **Journal of the**
597 **Marine Biological Association of the United Kingdom**, 44: 293-310.
- 598 Walne, P.R.; Mann, R. 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and
599 *Crassostrea gigas*. **Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium**, 587-
600 607.
- 601 Wakamatsu, T. 1973. **A ostra de Cananéia e seu cultivo.** São Paulo: SUDELPA, Instituto
602 Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 141p.
- 603 Weiss, M. B.; Caurant, P. B.; Peterson, B. J.; Gobler, C. J. 2007. The influence of plankton
604 composition and water quality on hard clam (*Mercenaria mercenaria* L.) populations
605 across Long Island's south shore lagoon estuaries (New York, USA). **Journal of**
606 **Experimental Marine Biology and Ecology**, 345, 12-25. [https://doi-](https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/0.1016/j.jembe.2006.12.025)
607 [org.ez80.periodicos.capes.gov.br/0.1016/j.jembe.2006.12.025](https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/0.1016/j.jembe.2006.12.025)

608 7.1.7. INSTRUÇÕES PARA AUTORES

609 *Boletim do Instituto de Pesca*

610 <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/about/submissions>

7.2. CAPÍTULO II

MATURAÇÃO DA OSTRA DO MANGUE (*Crassostrea gasar*) SOB DIFERENTES
SALINIDADES CONTROLADAS EM LABORATÓRIO

Aleff Paixão FRANÇA¹; Icaro Gomes ANTONIO¹

¹Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, Campus Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, nº 1000, Jardim São Cristovão, CEP 65055-310, São Luís, MA, Brasil. E-mail:

aleffpf@gmail.com

RESUMO

Nosso objetivo foi induzir o processo de maturação dos gametas através de diferentes salinidades controladas em laboratório. Foram testadas quatro condições salinas com 4 repetições cada: S1 – salinidade constante de 40; S2 – salinidade constante de 20; S3 – salinidade variando de 40 para 20 e S4 – salinidade variando de 20 para 40. O experimento foi conduzido em tanques retangulares de 12 L (53 x 32,5 x 10 cm) montados em um sistema de troca de água constante, mediante recirculação. Foram estocadas em cada unidade experimental 35 ostras. A proporção sexual (sex-ratio) demonstrou uma prevalência significativa de fêmeas (59,65%) em relação a machos (32,43%) e houve hermafroditismo em apenas 0,5% dos reprodutores. Com base em nossos resultados de índice de condição, estágios gonadais e índice de ocupação gonadal, observamos que os reprodutores de *C. gasar* apresentaram maiores médias de valores de maturação em salinidades mais baixas, entre 20 e 25. Este é reforçado pelos resultados de correlação, na qual a diminuição ou manutenção em salinidades mais baixas favorece o incremento de IC e IOG. Salinidades mais altas, entre 35 e 40, favorece um aumento de ovócitos em crescimento e liberação de gametas.

Palavra-chave: Desenvolvimento gonadal, análise de imagens, tamanho de ovócitos.

MANGROVE OYSTER MATURATION (*Crassostrea gasar*) AT DIFFERENT
LABORATORY CONTROLLED SALINITY

ABSTRACT

Our goal was to induce the maturation process of gametes through different salinities controlled in the laboratory. Four saline conditions were tested with 4 repetitions each: S1 - constant salinity of 40; S2 - constant salinity of 20; S3 - salinity varying from 40 to 20 and S4 - salinity varying from 20 to 40. The experiment was conducted in rectangular tanks of 12 L (53 x 32.5 x 10 cm) with a constant water exchange system, through recirculation. Third five oysters were stored in each experimental unit. The sex ratio showed a significant prevalence of females (59.65%) in relation to males (32.43%) and there was hermaphroditism in only 0.5% of the breeders. Based on our results of condition index, gonadal stages and gonadal occupation index, we observed that *C. gasar* breeders had higher average maturity values at lower salinities, between 20 and 25. This is reinforced by the correlation results, in which the decrease or maintenance in lower salinities favors the increase of CI and GOI. Higher salinities, between 35 and 40, favor an increase in growing oocytes and release of gametes.

Keywords: Gonadal development, image analysis, oocyte size.

7.2.1. INTRODUÇÃO

O litoral maranhense possui um grande potencial para a ostreicultura, devido as suas áreas estuarinas, que apresentam bancos naturais de ostras, sururus, sarnambis e outros moluscos bivalves, os quais vem sendo explorados pelas comunidades locais de uma forma desordenada, levando a uma exaustão dos bancos naturais em alguns casos (Monteles et al., 2009; Santos et al., 2016).

Uma exploração desordenada pode acarretar muitos problemas, como a escassez dessa espécie, influenciando falhas no recrutamento de sementes, insumo importante para o cultivo desses organismos. Devido à dificuldade e ao alto custo da produção de sementes em laboratório, grande parte do cultivo de ostras nativas na costa brasileira depende de sementes recrutadas do ambiente natural usando coletores artificiais (Pereira et al., 2003).

A maturação, por outro lado, pode ser uma forma de aumentar a capacidade do laboratório em produzir gametas de qualidade e consequentemente gerar larvas mais resistentes e saudáveis. A maturação é regida por fatores abióticos do meio em que o organismo está inserido e/ou por fatores genéticos. O ciclo de vida, distribuição e fisiologia dos organismos aquáticos são controlados principalmente por dois fatores: temperatura e salinidade da água do mar (Odum, 1975).

Vários estudos revelam a influência de salinidade no desenvolvimento de moluscos bivalves (Lee et al., 2017; Legat et al., 2017; Paixão et al., 2013; Yang et al., 2016). Em estuários tropicais e regiões costeiras, onde as temperaturas são constantes, a salinidade é considerada um dos principais fatores que determinam a distribuição, desenvolvimento e reprodução de ostras (Paixão et al., 2013; Santerre et al., 2013).

A baixa salinidade e a turbidez elevada são fatores ambientais característicos de ambientes estuarinos, que também podem influenciar o comportamento das ostras, pois quando ela é exposta a água doce, pode permanecer com as valvas fechadas, restringindo a alimentação e afetando a quantidade de energia armazenada pelo animal e a gametogênese (Christo, 2006; Hopkins, 1931).

Como os fatores exógenos podem afetar a duração dos estágios gonadais e, portanto, a produção de gametas, um bom conhecimento prático da relação entre as variáveis ambientais e o desenvolvimento gonadal é extremamente importante para melhorar as condições de armazenamento e os procedimentos de maturação em laboratório (Utting, 1993; Chávez-Villalba et al., 2002; Gosling, 2003).

Esta pesquisa surgiu da seguinte hipótese: Se a salinidade influencia de forma direta na maturação da ostra do mangue, então espera-se que em salinidades mais altas, haja uma maior porcentagem de reprodutores maduros. Portanto, nosso objetivo foi induzir o processo de maturação dos gametas através de graduações salinas controladas em laboratório, a fim de avaliar as melhores condições salinas para gametogênese e desova.

7.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.2.1. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em tanques retangulares de 12 L (53 x 32,5 x 10 cm), onde foram utilizados 4 tratamentos com 4 repetições cada (tanques), montados em um sistema de troca de água constante de 500mL/h, mediante recirculação. Foram estocadas em cada unidade experimental 35 ostras (total de 560). O volume utilizado para cada tanque foi de 9L de água marinha.

As ostras foram alimentadas com uma dieta mista composta pelas microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*. As microalgas foram cultivadas em sistema batch utilizando meio de cultura Conway (Walne, 1964) e foram ofertadas aos reprodutores durante a fase exponencial de crescimento em uma dieta diária de 10×10^4 cel mL⁻¹, ministrada duas vezes ao dia.

Os reprodutores utilizados no presente experimento foram trazidos do cultivo experimental realizado no município de Primeira Cruz - MA. Foi realizado uma amostragem inicial de 30 ostras para biometria e pesagem (20 para histologia e 10 para IC), a fim de avaliar as condições iniciais dos reprodutores. As ostras apresentaram, ao início do experimento, uma média de altura de $56,78 \pm 8,84$ mm e peso total de $21,45 \pm 6,41$ g (n=30). Para o início do experimento, os reprodutores foram induzidos a liberação massiva de gametas por indução térmica, conforme descrito por Silveira et al. (2011), a fim de padronizar o estágio inicial dos organismos.

Foram testadas quatro condições salinas com 4 repetições cada:

- S1 – salinidade constante de 40, representando o período seco;
- S2 – salinidade constante de 20, representando o período chuvoso;
- S3 – salinidade variando de 40 para 20, representando o período de transição do período de estiagem para o chuvoso;
- S4 – salinidade variando de 20 para 40, representando o período de transição do período chuvoso para o de estiagem;

Os tratamentos S3 e S4 tiveram suas salinidades ajustadas quinzenalmente, sendo alteradas em 5 partes de salinidade. A temperatura da água foi mantida a temperatura do laboratório, em média 23°C, afim de minimizar a influencia da temperatura nos estágios maturacionais dos reprodutores.

A salinidade foi verificada diariamente em dois momentos, manhã e tarde, juntamente com temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água. A correção da salinidade foi feita através da adição de água doce, quando o valor aumentasse, e água hipersalina, quando ela diminuísse. A temperatura foi aferida por termômetros de mercúrio e a salinidade por refratômetro. O oxigênio dissolvido e pH foram aferidos através de um multiparâmetro modelo AK88 da ASKO.

Foram realizadas amostragens quinzenais durante o período experimental, onde foram amostradas 5 ostras por unidade experimental, totalizando 20 ostras por tratamento e 80 ostras por amostragem. A cada amostragem foi realizada a biometria das ostras com paquímetro (altura, comprimento e largura das valvas) e pesagem das valvas, partes moles úmida e seca, utilizando balança de precisão. As amostras de partes

moles úmida seguiram para histologia e determinação do índice de condição, sendo utilizada 40 ostras em cada processo.

7.2.2.2. Histologia

No processo histológico, a determinação do estágio gonadal, foi realizada seguindo o protocolo de fixação, desidratação, corte e coloração modificado por Antonio e Camacho (2019).

Para cada espécime foram analisadas, utilizando um microscópio binocular, duas lâminas contendo em cada uma delas duas secções de ostra. A determinação dos estágios de desenvolvimento gonadal foi realizada utilizando a escala Antonio e Camacho (2019).

O momento de desova foi avaliado determinando a distribuição da frequência quinzenal dos diferentes estágios de maturação em relação ao índice de condição, ao índice de ocupação gonadal e ao diâmetro médio dos ovócitos.

7.2.2.3. Proporção Sexual

A proporção sexual (sex-ratio), foi estabelecida como a relação do número total de machos e fêmeas, e foi comparada em cada amostragem como a média do número total durante o experimento e entre os tratamentos utilizados.

7.2.2.4. Índice de Condição (IC)

Os organismos destinados ao IC foram sexados e em seguida foram levados a estufa a uma temperatura de 45°C até atingirem peso constante.

A determinação do IC foi realizada através da fórmula descrita por Walne e Mann (1975), a qual se calcula como:

$$IC = \frac{(P1 \times 1000)}{P2}$$

De forma que P1(g) é o peso seco das partes moles e P2(g) é o peso seco das valvas.

7.2.2.5. Índice de Ocupação Gonadal (IOG)

O IOG descrito por Delgado e Pérez Camacho (2003) como a porcentagem da área gonadal analisada que está ocupada por gametas foi obtida através da seguinte equação:

$$IOG = \left(\frac{\text{área ocupada por gametas}}{\text{área do campo analisado}} \right) \times 100$$

A análise de imagem é feita ao azar dentro da área gonadal. É obtido aleatoriamente uma imagem por secção, como uma matriz de pixels, com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, formando um total de três imagens por indivíduo. Estas imagens são capturadas das lâminas previamente preparadas para a determinação dos estágios gonadais com um aumento de 400X. Cada imagem foi analisada utilizando o software ImageJ® determinando o índice de ocupação gonadal (IOG) em ambos os sexos.

A determinação do IOG no caso dos machos está baseada na distinção cromática produzida pela coloração, que permite agrupar os gametas e medir a área ocupada, enquanto que no caso das fêmeas é feita através da seleção dos objetos por faixa de cor e tamanho, determinando a área e diâmetro máximo de cada ovócito. Somando a área de todos os ovócitos por imagem se obtêm a área ocupada por gametas. Em ambos os casos a área da imagem foi de 86.225,5 μm^2 .

7.2.2.6. Diâmetro Médio dos Ovócitos

O diâmetro médio foi determinado medindo somente os ovócitos que tinham uma vesícula germinativa bem definida. Para a caracterização da maturação dos ovócitos foi utilizada a escala descrita por Lango-Reynoso et al. (2000), que consiste em quatro estágios: gametogênese precoce (3,0-12,0 μm), crescimento (12,1 - 30,0 μm), maturidade (30,1 - 41,0 μm) e degeneração (41,1 - 60,0 μm).

7.2.2.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistica 7. Para todos os dados foram analisadas a normalidade mediante o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias através do teste de Cochran quando apresentam o mesmo número de dados e de Bartlett quando apresentam um número distinto. Os dados de IOG tiveram seus valores de porcentagem transformadas em (ARCO SENO da RAIZ). Os dados foram analisados através da Análise de Variância Simples (ANOVA). Para os testes a posteriori, foi utilizado o teste de Tukey (HSD). Em todos os casos foi utilizado um α de 5%.

Para análise da proporção sexual foi realizado o teste não paramétrico do qui-quadrado com nível de significância $\alpha = 5,0\%$. Para verificar a relação e influência da salinidade ao índice de ocupação gonadal (IOG) e ao índice de condição (IC), foi realizada análise de regressão múltipla linear separadamente, obtendo-se valores de r^2 e coeficientes de correlação de Pearson.

7.2.3. RESULTADOS

7.2.3.1. Variáveis Abiótica da Água

Em relação as variáveis abióticas da água, a salinidade ficou dentro do proposto para cada tratamento do experimento. A temperatura da água foi mantida a temperatura ambiente do laboratório, obtendo uma média de $22,82 \pm 0,64^\circ\text{C}$. Oxigênio dissolvido e pH obtiveram medias de $7,16 \pm 0,04\text{mg/L}$ e $8,46 \pm 0,06$, respectivamente (Tabela 1).

Houve diferença significativa entre tratamentos somente para temperatura e salinidade da água. A temperatura da água dos tratamentos S1 (40) e S2 (20) diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey). Em relação a salinidade, o tratamento S1 (40) diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

Tabela 1. Valores médio das variáveis da água aferidas por tratamento durante o experimento.

	T (°C)	S	O.D (mg/L)	pH
S1 (40)	23,43 ± 0,22 ^a	40,5 ± 0,23 ^a	7,18 ± 1,51	8,36 ± 0,14
S2 (20)	23,3 ± 0,17 ^a	20,07 ± 0,43 ^b	7,11 ± 1,28	8,52 ± 0,07
S3 (40-20)	22,34 ± 0,25 ^b	30,7 ± 8,10 ^{ab}	7,13 ± 1,46	8,47 ± 0,16
S4 (20-40)	22,18 ± 0,30 ^b	30,79 ± 7,57 ^{ab}	7,21 ± 1,4	8,49 ± 0,07

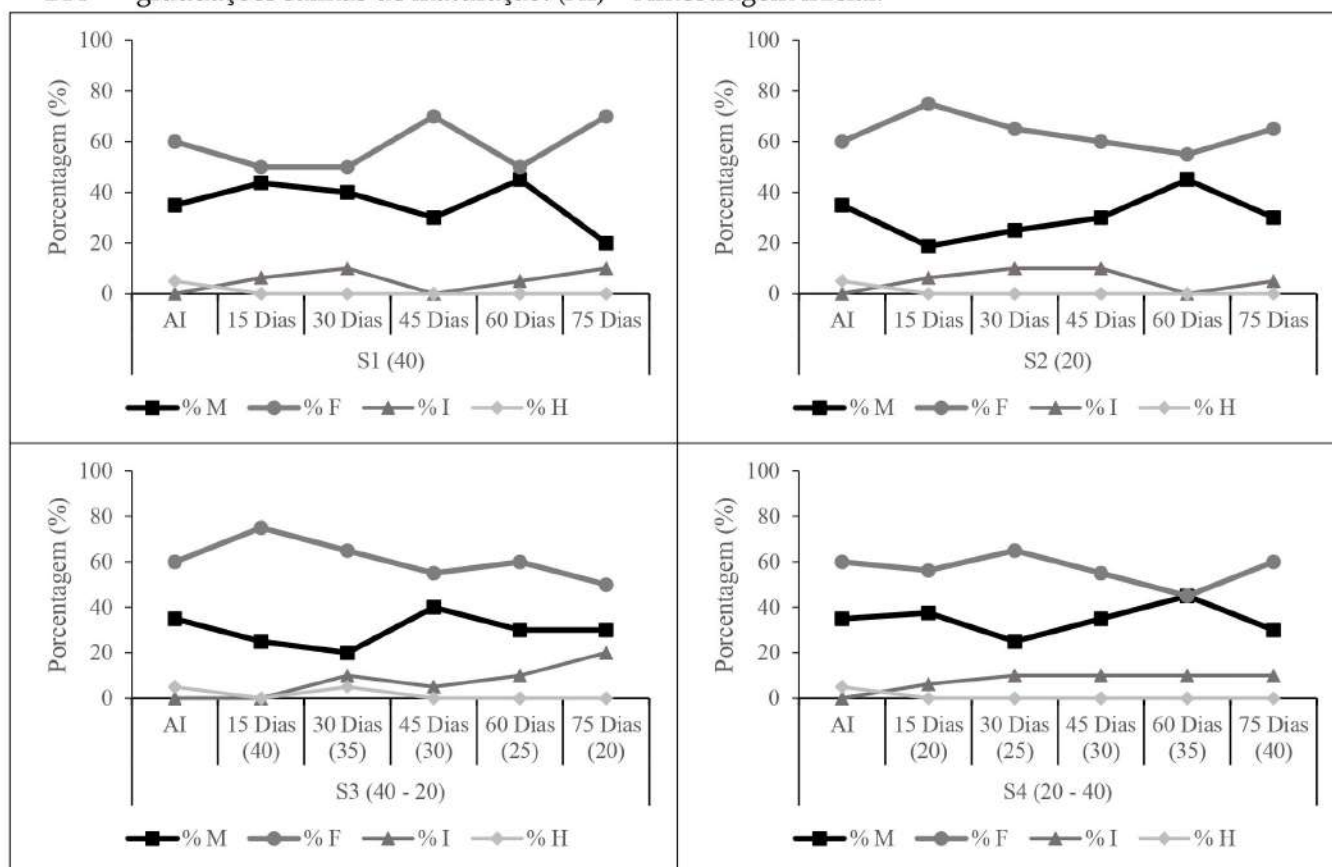
As letras minúsculas representam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

7.2.3.2. Proporção Sexual

A proporção sexual (Macho:Fêmea) durante todo o experimento foi de 1:1,84 demonstrando uma prevalência significativa de fêmeas (59,65%) em relação a machos (32,43%) ($p < 0,05$, teste qui-quadrado). Houve hermafroditismo em 0,5% dos reprodutores. Cerca de 7,43% dos espécimes foram caracterizados como indefinido, devido à ausência de gametas.

Analisando a razão sexual entre tratamentos, a proporção de fêmeas foi significativamente maior em relação a machos apenas nos tratamentos S2 (1:2,10) e S3 (1:2,07) ($p < 0,05$, teste qui-quadrado). A razão sexual do S1 foi de 1:1,65 e do S2 de 1:1,64 (M:F) (Figura 1).

Figura 1. Proporção sexual dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes graduações salinas de maturação. (AI) – Amostragem inicial.



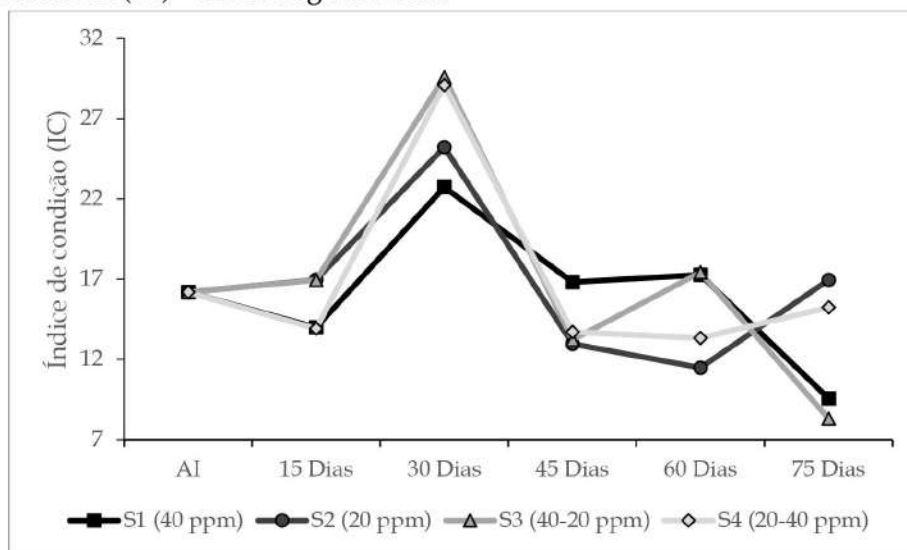
7.2.3.3. Índice de Condição (IC)

Reprodutores de *C. gasar* apresentaram um valor inicial de IC de 16,19. Foram observados incremento de valores na salinidade mais baixa (S2-20), com um valor de 16,94 na última amostragem. Por outro lado, apresentaram diminuição de valor na salinidade mais alta (S1-40), com um valor final de IC de 9,57 (Figura 2).

A manutenção inicial em baixa salinidade com aumento gradativo (S3 20-40) apresentou a maior média de valores de IC entre os tratamentos, com um valor de 16,94 (Figura 2).

Os valores médios de IC para os tratamentos S1, S2, S3 e S4, foram de 16,09; 16,63; 16,94 e 16,91 respectivamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$, ANOVA).

Figura 2. Médias de IC dos reprodutores de *C. gasar* submetidos a diferentes salinidades em laboratório. (AI) – Amostragem inicial.



7.2.3.4. Estágios Gonadais

Os reprodutores de *C. gasar* demonstraram uma condição inicial de 89,47% em maturação (IIIA) e 10,53% em liberação de gametas (IIIB e IIID). A salinidade mais baixa (S2-20) manteve os reprodutores em condições similares ao inicial, com valores de 81,48% em maturação e 18,51% em liberação de gametas. A salinidade mais alta (S1-40) resultou em uma diminuição na média de organismos maduros e aumento na média de desova em 25% para ambos (Figura 3 e 4).

Em graduações salinas, os resultados apresentaram maior porcentagem de organismos maduros (IIIA) em salinidade entre 20 e 25, com um valor médio de 76,80%, enquanto que a liberação de gametas (IIIB e IIID) foi verificada em 23,20% dos indivíduos. Em salinidades entre 35 e 40, a maturação e desova foram similares à faixa de salinidade anterior, com uma média de 75,81%, enquanto que a liberação de gametas foi verificada em 24,19% dos indivíduos (Figura 3 e 4).

Figura 3. Estágios gonadais dos reprodutores de *C. gasar* sob diferentes condições salinas de maturação. AI – Amostragem inicial, IIIA – estágio de maturação, IIIB – estágio de liberação de gametas, IIIC – estágio de restauração entre desovas sucessivas e IIID – estágio de fim do período reprodutivo.

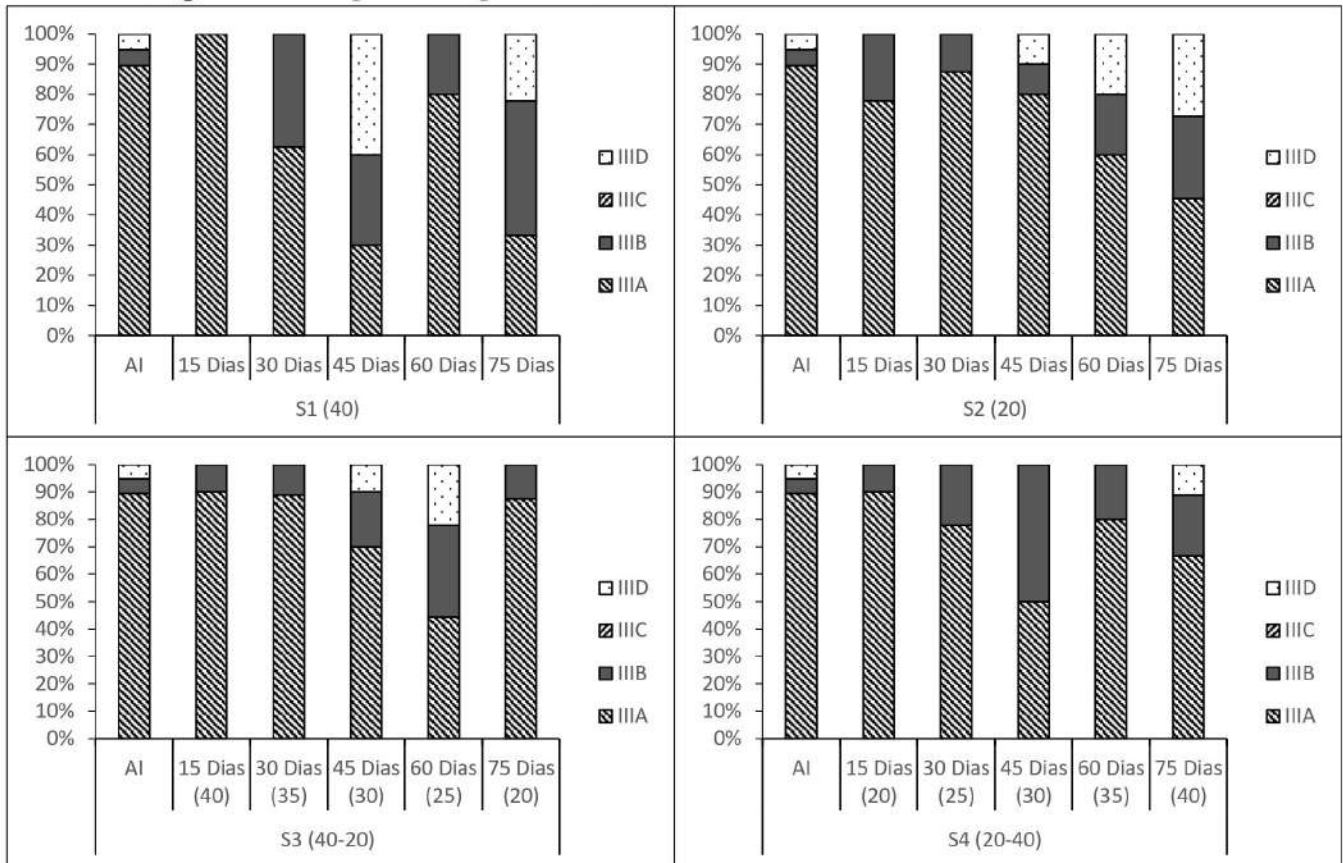
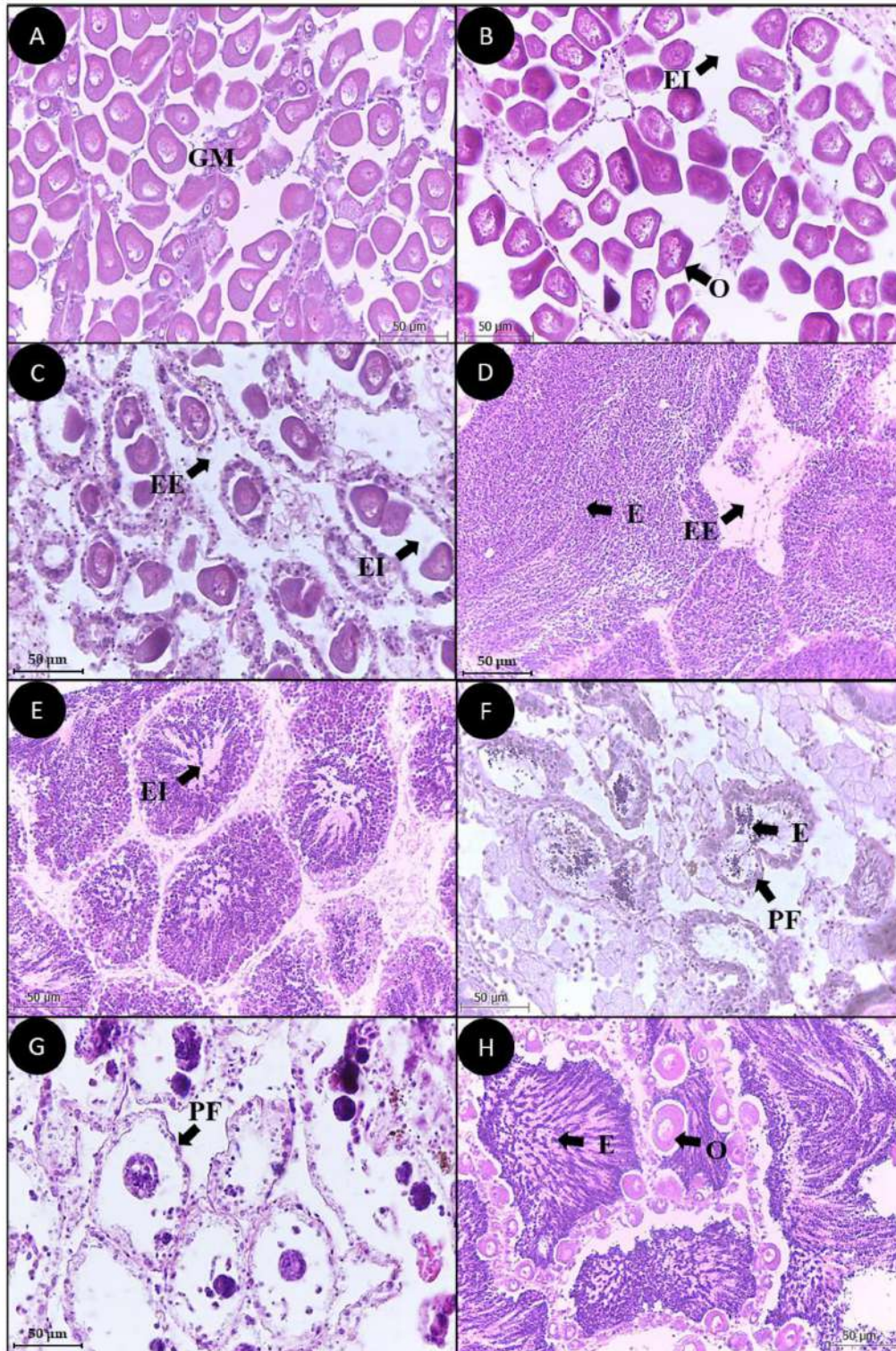


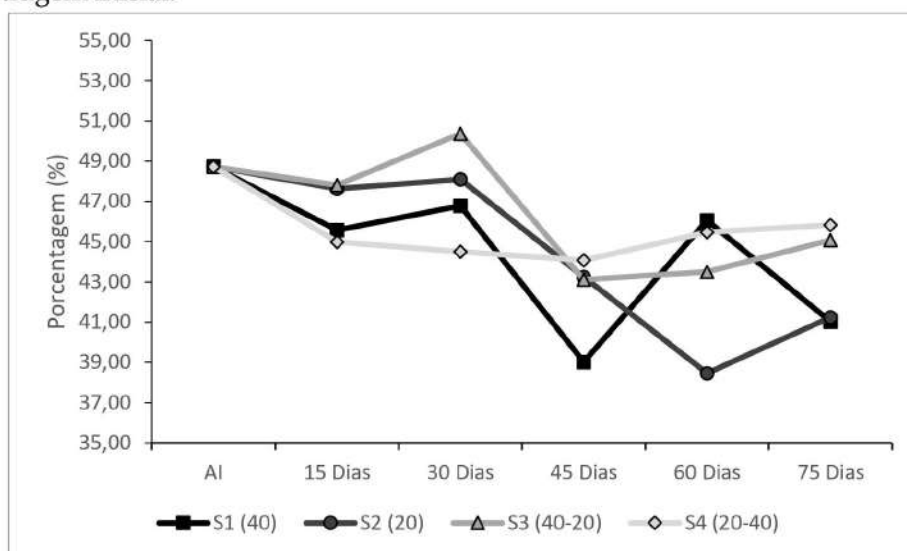
Figura 4. (A, B e C) Gônada feminina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm). (D, E, F) Gônada masculina de *C. gasar* em estágio IIIA, IIIB e IIID, respectivamente, em aumento de 400X (50µm), (G) – Gônada indefinida em aumento de 400x (50µm) e (H) Gônada hermafrodita em aumento de 400X (50µm). GM – Gônada Madura; PF – Parede Folicular; EI – Espaço Intracelular; EE – Espaço Extracelular; O – Ovócito; E – Espermatozoide.



7.2.3.5. Índice de Ocupação Gonadal (IOG)

O valor médio percentual do índice de ocupação gonadal (IOG) da amostragem inicial foi de 48,73%. Não houve diferença significativa do IOG entre os tratamentos ($p>0,05$, ANOVA). Os valores médios de ocupação de gametas na gônada foram em ordem decrescente de 46,44% para S3, 45,6% para S4, S2 com 44,57% e 44,53 para S1 (Figura 5).

Figura 5. Valores médios percentuais do índice de ocupação gonadal (IOG) dos reprodutores de *C. gasar* mantidos a diferentes condições salinas em laboratório. (AI) – Amostragem inicial.

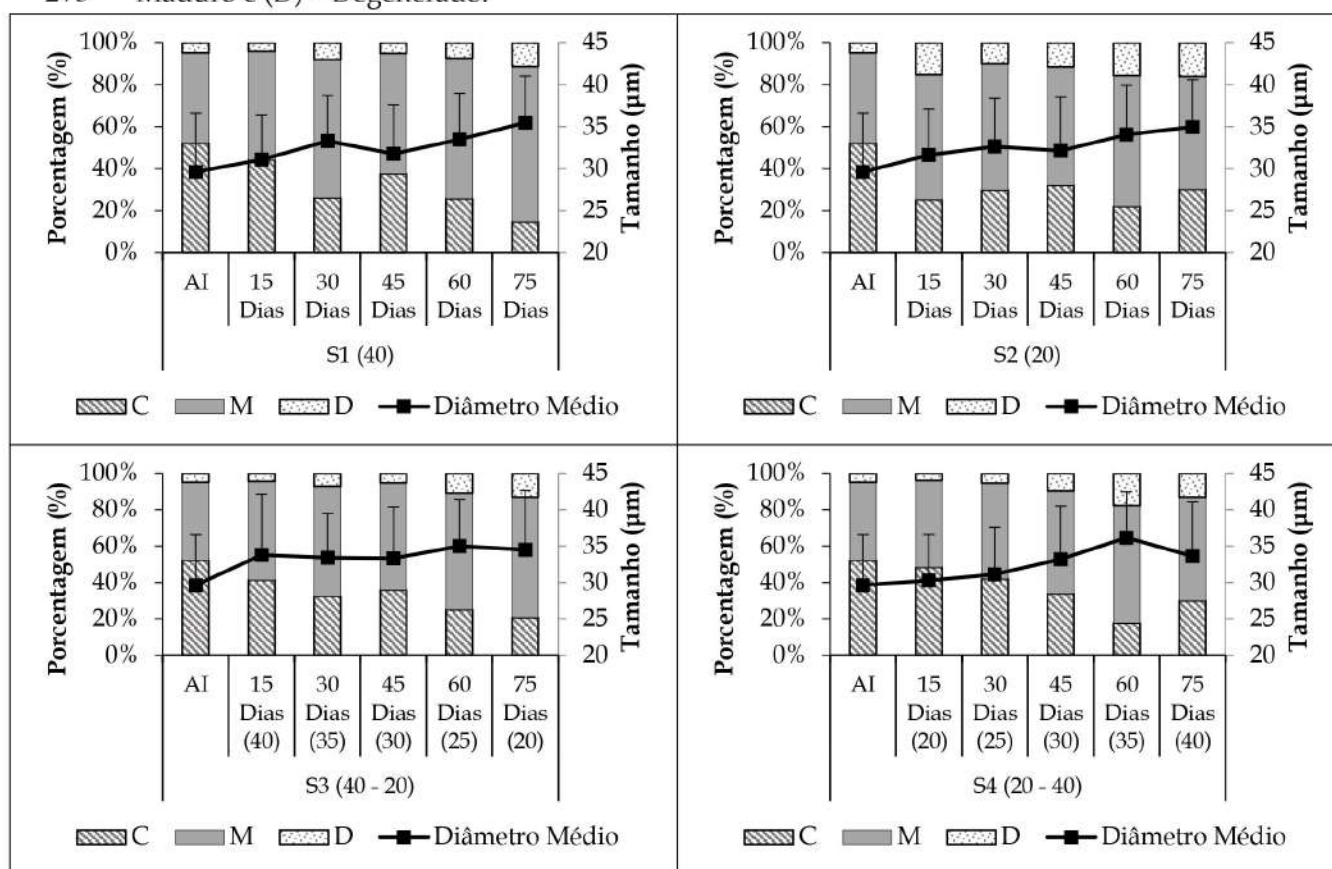


7.2.3.6. Tamanho Médio dos Ovócitos

A amostragem inicial apresentou ovócitos com um diâmetro médio de $29,62 \pm 6,97 \mu\text{m}$ (51,95% em crescimento e 42,93% maduros). Houve uma grande porcentagem de ovócitos maduros em todos os tratamentos durante o experimento ($n=18460$). O tratamento S1 (40) apresentou a maior média de ovócitos maduros (59,74%), possuindo um diâmetro médio de $33,02 \pm 5,51 \mu\text{m}$. O tratamento S4 (20-40) apresentou o menor diâmetro médio de $32,86 \pm 6,76 \mu\text{m}$, apresentando a menor média de ovócitos em maturação (53,43%) e a maior média de ovócitos em crescimento (37,11%) (Figura 6).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quando comparado o diâmetro médio dos ovócitos ($p>0,05$, ANOVA).

273 **Figura 6.** Diâmetro médio (μm) e classes de tamanhos dos ovócitos da *C. gasar* submetida
274 a diferentes condições salinas. (AI) – Amostragem inicial; (C) – Crescimento; (M) –
275 Maduro e (D) – Degenerado.



277 7.2.3.7. Influência da Salinidade no Índice de Condição (IC) e Índice de 278 Ocupação Gonadal (IOG)

279 O IC apresentou baixa correlação com a salinidade na maioria dos tratamentos,
280 com valores mais elevados (0,58) no tratamento S3 (40-20) demonstrando que a
281 diminuição de salinidade favoreceu o incremento de IC.

282 Em relação aos dados de IOG, os coeficientes de correlação foram moderados na
283 maioria dos tratamentos (S2, S3 e S4) e apresentaram valores baixos no tratamento S1.
284 Os valores mais elevados foram verificados nos tratamentos S2 (20) e S3 (40-20)
285 demonstrando que uma diminuição da salinidade ou a manutenção de valores de
286 salinidade baixos favorecem o incremento do IOG.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson e valores de r^2 obtidos na análise de regressão múltipla linear entre IC e IOG em relação a diferentes salinidades.

	Tratamentos	Salinidade	r^2
IC	S1 (40)	-0,19	0,04
	S2 (20)	0,03	0,00
	S3 (40-20)	0,58	0,33
	S4 (20-40)	-0,33	0,11
IOG	S1 (40)	0,23	0,05
	S2 (20)	0,63	0,39
	S3 (40-20)	0,63	0,39
	S4 (20-40)	0,59	0,35

7.2.4. DISCUSSÃO

A salinidade teve média de 40,5 para o S1, 20,1 para S2, e 30,7 para S3 e S4. Os espécimes foram submetidos a temperatura ambiente do laboratório, que obteve média de 22,83°C. Oxigênio dissolvido e pH apresentaram média de 7,16 mg/L e 8,49, respectivamente, estando dentro dos padrões da Resolução CONAMA 357/05 para águas de Classe 5, que são salinas destinadas a criação natural de espécies destinadas a alimentação humana, onde deve existir um teor de 5,0 mg/L e o pH deve estar entre 6,5 e 8,5 para preservação da vida aquática (Brasil, 2005).

Dos reprodutores avaliados 59,65% eram fêmeas, demonstrando prevalência significativa em relação aos machos, que apresentaram 32,43%, apresentando uma proporção de 1:1,84 (M:F). Cerca de 7,43% foi caracterizado como indefinido devido à ausência de gametas. Houve prevalência significativa de fêmeas sobre macho somente para os tratamentos S2 (1:2,07) e S3 (1:2,10). A proporção dos tratamentos S1 e S4 foram 1:1,65 e 1:1,64, respectivamente.

Estes resultados coincidem com os de Christo e Absher (2006) no Paraná-PR, Ramos et al. (2014) em Florianópolis - SC e Souza (2017) em Raposa - MA, que observaram a prevalência de fêmeas em relação a machos para a mesma espécie estudada em nossa pesquisa. Porém, não é regra as fêmeas serem em maior número que os machos, pois Galvão et al. (2000) observaram uma prevalência de machos em Cananéia-SP para esta mesma espécie. A prevalência de fêmeas em moluscos bivalves pode ser tendenciosa em áreas que sofrem influências oceânicas, o que resulta em aumento da salinidade (Le Dantec, 1968). A maior quantidade de fêmeas em relação a machos pode estar relacionada com a estratégia reprodutiva de ostras do gênero *Crassostrea* (Lenz, 2008).

Houve a presença de hermafroditismo em apenas 0,5% dos reprodutores avaliados, em que foi observada a presença de ovócitos em meio os folículos espermáticos. Este fato reforça a constatação de alguns autores que sugerem o hermafroditismo como um estágio de transição entre a condição masculina e feminina (Baghurst e Mitchell, 2002; Lango-Reynoso et al., 2006).

A amostragem inicial apresentou um valor de IC de 16,19. Observamos um

incremento de valores em salinidade mais baixa (S2-20), apresentando um valor de 16,94 na última amostragem. Por outro lado, houve decréscimo dos valores em salinidade mais alta (S1-40), demonstrando um valor de 9,57 ao final, porém sem diferença significativa.

Nossos resultados divergem com os estudos de biologia reprodutiva desta espécie realizado por Gomes et al. (2014) em Santa Catarina, Brasil, onde eles observaram os valores mais altos de IC (15,5), no momento em que a salinidade estava diminuindo, alcançando 28 de salinidade, e (16,5) no momento em que a salinidade se mantinha alta e com pouca variação durante o ano, obtendo 32 de salinidade. Sousa (2017) observou o maior valor de IC (47,37) no momento do ano em que a salinidade estava aumentando, apresentando uma salinidade de 38. Os valores encontrados pelos autores citados estão sob influência de salinidade próxima da encontrada em nossa pesquisa, porém, a temperatura da água no momento de obtenção desses valores estava acima da temperatura em que nossos reprodutores foram submetidos. Dessa forma, a temperatura possivelmente influenciou nos valores de IC encontrados pelos autores citados.

Nossos resultados de estágios gonadais demonstraram uma condição inicial em que 87,47% dos reprodutores de *C. gasar* estavam em maturação (IIIA) e 10,53% em liberação de gametas (IIIB e IIID). Em salinidade mais baixa (S2-20) os reprodutores apresentaram valores similares ao inicial, já em salinidade mais alta (S1-40) ocorreu uma diminuição de reprodutores maduros e aumento da liberação de gametas em 25%.

Estes resultados divergem dos encontrados no município de Raposa-MA por Sousa (2017), que observou que nos meses em que a salinidade estava mais baixa (entre 32 e 34), entre fevereiro e maio de 2015 (período chuvoso na região), houve maiores taxas de fêmeas maduras. Os machos maduros foram observados nos meses entre setembro de 2014 e fevereiro de 2015, momento em que a salinidade estava entre 36 e 38. Isto ocorreu devido a influência da temperatura que estava aumentando nesses meses, induzindo as ostras a maturarem. Porém, nossos resultados coincidem com os resultados encontrados em Santa Catarina por Gomes et al. (2014), onde eles constataram as maiores proporções de ostras maduras nos meses de dezembro de 2008, janeiro fevereiro de 2009, momento em que houve a diminuição de salinidade (25).

Os resultados de índice de ocupação gonadal (IOG), demostram que a salinidade não influenciou a ponto de haver diferenças significativas entre os tratamentos, apresentando uma média de 45% de ocupação de área. Porém, a diminuição gradativa de salinidade proposta no tratamento S3 (40-20) apresentou, ao final do experimento, uma média de 46,44%.

Segundo as análises de ovócitos, as salinidades mais altas favoreceram a maturação em 59,74% dos ovócitos, apresentando um diâmetro médio de ovócito de $33,02 \pm 5,51 \mu\text{m}$, já as salinidades mais baixas favorecem o crescimento 48,02% dos ovócitos, tendo um diâmetro médio de $32,86 \pm 6,76 \mu\text{m}$.

Os valores de IOG e diâmetro médio dos ovócitos variam de acordo com o estágio gonadal do organismo. O desenvolvimento gonadal é influenciado por fatores exógenos

como salinidade e temperatura. Nossos resultados divergiram dos encontrados para essa mesma espécie por Paixão et al. (2013) e Gomes et al. (2014), que observaram o mesmo padrão de maturação dos reprodutores em uma salinidade de 25, e temperatura da água de 28,5°C e 24°C, respectivamente. A temperatura da água nesses estudos estava acima da temperatura que os nossos reprodutores foram submetidos (22,82°C), podendo este ter sido o fator determinante para esta divergência.

A ostra do mangue *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) é amplamente distribuída e pode ser encontrada ao longo da costa da África Ocidental (Angell 1986, Lapegue et al. 2002) e na América do Sul, da Guiana Francesa ao sul do Brasil (Lapegue et al. 2002, Lazoski et al. 2011). Ela é capaz de tolerar variações consideráveis nas condições das marés e na salinidade, sendo encontrada principalmente em regiões que são significativamente influenciadas pelo influxo de água doce do continente e que apresentam grandes variações na salinidade (Pereira et al., 2003; Siqueira, 2008; Castilho-Westphal, 2012).

Em regiões tropicais, como o norte e nordeste do Brasil, os moluscos tendem a apresentar uma reprodução contínua durante o ano com picos de eliminação de gametas, em períodos mais quentes, não registrando um período de repouso sexual (Christo, 2006; Lenz, 2008; Paixão, 2012; Sousa, 2015).

A salinidade é fundamental e deve ser levada em consideração, pois no estado do Maranhão, Brasil, é o fator que mais varia durante o ano, devido ao regime de chuva e estiagem ser bem caracterizado. Alguns autores observaram em diferentes bivalves marinhos que a salinidade e a quantidade de alimento são aquelas que influenciam a atividade reprodutiva (Bayne, 1973; Wilson et al., 2005; Neto et al., 2013). A desova causa diminuição nos valores de IC e IOG, que pode ser causada pela diminuição ou aumento de salinidade. Zamora et al. (2003), estudando uma ostra tropical (*C. virginica*) no México, descobriram uma alta correlação entre salinidade e eventos reprodutivos, como gametogênese e desova.

Porém, em nossa pesquisa, a salinidade apresentou uma fraca correlação com o IC. Para IOG, a salinidade demonstrou uma correlação moderada para os tratamentos, com exceção do S1 (40). Neste caso, a diminuição gradual de salinidade ou manutenção de reprodutores em salinidades mais baixas favorece o incremento de valores para esses dois parâmetros.

A fraca correlação da salinidade com os parâmetros avaliados pode estar relacionada a capacidade que a ostra do mangue *C. gasar* possui de tolerar uma grande variação salina. Esta sugestão é reforçada por Funo et al. (2015), onde submeteram espécimes de *C. gasar* a salinidades extremas, entre 5 e 50, apresentando nesse intervalo uma taxa de sobrevivência superior a 75%.

7.2.5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados de índice de condição, estágios gonadais e índice de ocupação gonadal, observamos que os reprodutores de *C. gasar* apresentaram maiores médias de valores de maturação em salinidades mais baixas, entre 20 e 25. Este é

reforçado pelos resultados de correlação, na qual a diminuição ou manutenção em salinidades mais baixas favorece o incremento de IC e IOG. Salinidades mais altas, entre 35 e 40, favorecem um aumento de ovócitos em crescimento e liberação de gametas.

Dessa forma, refutamos a hipótese proposta na pesquisa na qual a alta salinidade propiciaria a maturação da ostra do mangue *C. gasar*. Estes resultados servirão para integrar o protocolo de produção de sementes do Laboratório de Fisiocologia, Reprodução e Cultivo de Organismos Marinhos – FISIOMAR e iniciar a produção de sementes de ostras de conhecida procedência e especificidade.

7.2.6. REFERENCIAS

Angell, C. L. 1986. **A biologia e cultura de ostras tropicais. Filipinas: Centro Internacional para Gerenciamento de Recursos Aquáticos Vivos.** 42 pp.

Antonio, I.G.; Camacho, A.P. 2019. Reproduction of the introduced oyster *Magallana gigas* (Bivalvia: Ostreidae) cultured on rafts in Spain. **Acta Zoologica.** <https://doi.org/10.1111/azo.12248>.

Baghurst, B.; Mitchell, J.G. 2002. Sex specific growth and condition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). **Aquaculture Research**, 33: 1253-1263.

Bayne, B. L. 1973. Physiological changes in *Mytilus edulis* L., induced by temperature and nutritive stress. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 53 (01): 39-58.

BRASIL. 2005. **Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Parâmetros de qualidade das águas segundo seu uso preponderante. Resolução nº 357, 18 de março de 2005.** <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. (07/01/2020).

Castilho-Westphal, G.G. 2012. **Ecologia da ostra do Mangue *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em manguezais da Baía de Guaratuba-PR.** Paraná. 118f. (Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná).

Chavez-Villalba, J.; Pommier, J.; Andriamiseza, J.; Pouvreau, S.; Barret, J.; Cochard, J.C.; Le Pennec, M. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. **Aquaculture** 214: 115-130.

Christo, S.W. 2006. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo.** Paraná. 146f. (Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná).

Christo, S.W.; Absher, T.M. 2006. Reproductive period of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Parana, Brazil. **Journal of Coastal Research**, 39: 1215-1218.

- 438 Delgado, M.; Pérez-Camacho, A. 2003. A study of gônadal development in *Ruditapes*
439 *decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: Influence of food
440 ration and energy balance. **Journal of Shellfish Research**, 22 (2). 435-441.
- 441 Funo, I.C.S.; Antonio, I.G.; Marinho, Y.F.; Galvez, A.O. 2015. Influence of salinity on
442 survival and growth of *Crassostrea gasar*. **Boletim do Instituto de Pesca** 41 (4): 837-847.
- 443 Galvao, M. S. N.; Pereira, O. M.; Machado, I. C.; Henrique, M. B. 2000. Reproductive
444 characters of the oyster *Crassostrea brasiliiana* from mangroves of Cananéia estuary, São
445 Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 26 (2): 147-162.
- 446 Gomes, C.H.A.M. 2009. **Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck,**
447 **1819) em cultivo e maturação em laboratório.** Florianópolis. 57f. (Dissertação de
448 Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina). Disponível em:
449 <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/93088>
- 450 Gomes, C.H.A.M.; Silva, F.C.; Lopes, G.R; Melo, C.M.R. 2014. The reproductive cycle of
451 the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**, 74 (4): 967-976.
452 <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.04912>.
- 453 Gosling, E. 2003. Bivalve molluscs: Biology, ecology and culture. 1ª edition. **Oxford:**
454 **Fishing News Books.** 443 p.
- 455 Hopkins, A. E. 1931. Factors influencing the spawning and setting of oysters in
456 Galveston Bay, Texas. **Bulletin of the United States Bureau of Fisheries**, 47: 57-83.
- 457 Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, JC e Le Pennec, M. 2000. Oocyte size, a
458 means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*
459 (Thunberg). **Aquaculture**, 190: 183 - 199.
- 460 Lango-Reynoso, F.; Chávez-Villalba, J.; Le Pennec, M. 2006. Reproductive patterns of the
461 pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. **Invertebrate Reproduction & Development**,
462 49 (1-2): 41-50. <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2006.9652192>
- 463 Lapègue, S.; Boutet, I.; Leitão, A.; Heurtebise, S.; Garcia, P.; Thiriot-Quiévreux, C.;
464 Boudry, P. 2002. Trans- Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by
465 16S mtDNA and karyological analyses. **Biology Bulletin** 202: 232-242.
- 466 Lazoski, C., J. Gusmao, P. Boudry e AM Sole-Cava. 2011. Phylogeny and
467 phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic
468 connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, 426: 197-212.
469 <http://dx.doi.org/10.3354/meps09035>
- 470 Le Dantec, J. 1968. Reproduction em *Crassostrea angulata* (Lamarck 1819) dans le Bassin D'
471 Arcachon. Quelques comparaisons avec les huitres de la Gironde. **Revue des Travaux**
472 **de Intitut Pêches Maritimes**, 32: 300-362.

- Lee, Y.J.; Kang, H.Y.; Lee, W.C.; Kang, C.K. 2017. Hydrodynamic effects on growth performance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in suspension in a Temperate Bay on the coast of Korea. **Estuaries Coasts**, 40: 1551-1565. <http://dx.doi.org/10.1007/s12237-017-0252-z>
- Legat, J.F.A.; Puchnick-Legat, A.; Gomes, C.H.A.; Sühnel, S.; Melo, C.M.R. 2017. Effects of salinity on fertilization and larviculture of the mangrove oyster, *Crassostrea gasar* in the laboratory. **Aquaculture**, 468: 545-548. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.016>
- Lenz, T.M. 2008. **Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA)**. Bahia. 54f. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz).
- Mercado-Silva, N. 2005. Condition index of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in Sapelo Island Georgia--effects of site, position on bed and pea crab parasitism. **Journal of Shellfish Research**, 24 (1): 121-126.
- Monteles, J.S.; Castro, T.C.S.; Viana, D.C.P.; Conceição, F.S.; França, V.L.; Funo, I.C.S.A. 2009. Percepção socio-ambiental das marisqueiras no município de Raposa-MA. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, 4 (2): 34-45. <https://doi.org/10.18817/repesca.v4i2>
- Neto, R.; Zeni, T.O.; Ludwig, S.; Horodesky, A.; Girotto, M.V.; Castilho-Westphal, G.G.; Ostrensky, A. 2013. Influence of environmental variables on the growth and reproductive cycle of *Crassostrea* (Mollusca, Bivalvia) in Guaratuba Bay, Brazil. **Invertebrate reproduction & Development**, 57 (3): 208-218.
- Odum, E. P. 1975. **Ecologia**. São Paulo: Pioneira, 201 p.
- Paixão, L.F. 2012. **Estudo da Biologia Reprodutiva de *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), no nordeste paraense**. Pará. 37f. (Tese de Doutorado. Federal do Estado do Pará). Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br:8080/jspui/handle/2011/6019>
- Paixão, L.; Ferreira, M.A.; Nunes, Z.; Fonseca-Sizo, F.; Rocha, R. 2013. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster *Crassostrea gasar*: Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture**, 380: 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.019>
- Pereira, O.M.; Henriques, M.B.; Machado, I.C. 2003. Growth curve estimation of the oyster *Crassostrea brasiliiana* in the mangrove and a proposal to their sustainable extraction in Cananeia Estuary, SP, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 29 (1): 19-28.
- Quayle, D.B. 1969. **Pacific Oyster Culture, na Colúmbia Britânica**. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 169-192 p.

- 508 Ramos, C.O.; Gomes, C.H.A.M.; Magalhães, A.R.M.; Santos, A.I.; Melo, C.M.R. 2014.
- 509 Maturation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* at different temperatures in the
- 510 laboratory. **Journal of Shellfish Research**, 33 (1): 187-194.
- 511 Santerre, C.; Sourdain, P.; Marc, N.; Mingant, C.; Robert, R.; Martinez, A.S. 2013. Oyster
- 512 sex determination is influenced by temperature - first clues in spat during first gonadic
- 513 differentiation and gametogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A:**
- 514 **Molecular & Integrative Physiology**, 165 (1): 61-69.
- 515 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.007>
- 516 Santos, N.M.V.; Sousa Neto, A.P.; Cunha, F.E.A.; Fernandes, C.A.F. 2016. A produção
- 517 extrativista da ostra *Crassostrea* spp. na região do Delta do Rio Parnaíba, Brasil. **Revista**
- 518 **Brasileira de Engenharia de Pesca**, 9(1): 1-11. <https://doi.org/10.18817/repesca.v9i1>
- 519 Silveira, R.C.; Silva, F.C.; Gomes, C.H.M.; Ferreira, J.F.; Melo, C.M.R. 2011. Larval
- 520 settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819)
- 521 using different systems to induce metamorphosis. **Brazilian Journal of Biology**, 71 (2):
- 522 557-562.
- 523 Siqueira, K. L. F. 2008. *Crassostrea* (SACCO, 1897) no estuário do rio Vaza-Barris
- 524 (Sergipe). Aracaju. 77f. (Dissertação de Mestrado. Unidade Universidade Tiradentes).
- 525 Sousa, A.K.R. 2015. **Biologia reprodutiva da “ostra nativa” *Crassostrea rhizophorae* na**
- 526 **Ilha do Maranhão – Ma.** São Luís. (Monografia. Universidade Estadual do Maranhão).
- 527 Sousa, A.C.R. 2017. **Biologia reprodutiva de *Crassostrea gasar* (Andanson, 1757) no**
- 528 **município de Raposa – MA.** São Luís. 33f. (Monografia. Universidade Estadual do
- 529 Maranhão).
- 530 Utting, S. 1993. Procedures for maintenance and hatchery conditioning of bivalve
- 531 broodstock. **World Aquaculture**, 24: 78-82.
- 532 Walne, P.R. 1964. Observations of the fertility of the oyster (*Ostrea edulis*). **Journal of the**
- 533 **Marine Biological Association of the United Kingdom**, 44: 293-310.
- 534 Walne, P.R.; Mann, R. 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and
- 535 *Crassostrea gigas*. **Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium**, 587-
- 536 607.
- 537 Wilson, C.; Scotto, L.; Scarpa, J.; Volety, A.; Laramore, S.; Haunert, D. 2005. Survey of
- 538 water quality, oyster reproduction and oyster health status in the St. Lucie estuary.
- 539 **Journal of Shellfish Research**, 24 (1): 157-165.
- 540 Yang, C.Y.; Sierp, M.T.; Abbott, C.A.; Li, Y.; Qin, J.G. 2016. Responses to thermal and
- 541 salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas*. **Comparative**
- 542 **Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 201: 22-29.
- 543 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.024>

544 Zamora, A.; Hernández, M.L.S.; Aranda, D.A. 2003. Ciclo gonádico del ostión americano
545 *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) em Mecoacán, Tabasco, México.
546 **Revista Biología Tropical**, 51 (4): 109-117.

547 **7.2.7. INSTRUÇÕES PARA AUTORES**

548 *Boletim do Instituto de Pesca*

549 <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/about/submissions>

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados revelaram um padrão ideal para maturação da ostra do mangue *C. gasar*, sendo em condições térmicas entre 24°C e 26°C, e faixa salina entre 20 e 25. Este é reforçado pelos resultados de correlação, na qual a diminuição ou manutenção em salinidades e temperaturas mais baixas favorecem o incremento de IC e IOG, enquanto o aumento dessas variáveis favoreceu um aumento de ovócitos em crescimento e liberação de gametas.

Sugerimos que os reprodutores de *C. gasar* sejam mantidos a temperatura entre 24°C e 26°C, e faixa salina entre 20 e 25. Dessa forma haverá grande proporção de organismos maduros e em gametogênese.

Dessa forma, rejeitamos as hipóteses propostas na pesquisa, de que a alta temperatura e alta salinidade favorecem a maturação dos reprodutores. Estes resultados servirão para integrar o protocolo de produção de sementes do Laboratório de Fisiocologia, Reprodução e Cultivo de Organismos Marinhos– FISIOMAR e iniciar a produção de sementes de ostras de conhecida procedência e especificidade.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANGELL, C. L. **A biologia e cultura de ostras tropicais. Filipinas: Centro Internacional para Gerenciamento de Recursos Aquáticos Vivos.** p. 42. 1986.

ANGEL-DAPA, M.A.; RODRIGUEZ-JARAMILLO, C; CACERES-MARTINEZ, C.J.; SAUCEDO, P.E. Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: A study of histochemistry and digital image analysis. **Journal of Shellfish Research**, v. 29, n. 2, p. 407. 2010.

ANTONIO, I.G.; CAMACHO, A.P. Reproduction of the introduced oyster *Magallana gigas* (Bivalvia: Ostreidae) cultured on rafts in Spain. **Acta Zoologica**. v. 100, n. 3, p. 257-267. 2019. <https://doi.org/10.1111/azo.12248>

ARAÚJO, C.M.Y. Biologia reprodutiva do berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé. **Doutorado (Tese)**. Instituto de biociências, Universidade de São Paulo, Brasil, p. 204. 2001.

- AREIAS, D.L.L. Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795). **Mestrado (Dissertação)**. Universidade do Porto, p. 74. 2012.
- BALDAN, A.P.; BENDHACK, F. Sustainable mariculture in Paraná coast, Brazil: updates and perspectives. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 4, p. 491-497. 2009.
- BARBIERI, E.; MARQUEZ, H.L.A.; CAMPOLIM, M.B.; SALVARANI, P.I. Avaliação dos Impactos ambientais e socioeconômicos da aquicultura na região estuarina-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**. vol. 14, n. 3, p.385-398. 2014. <http://dx.doi.org/10.5894/rgci486>
- BEGON, M.; HARPER, J.; TOWNSEND, C. Ecologia: de Indivíduos a Ecossistemas. 4ª ed. Porto Alegre: **Artmed Editora S/A**. p. 740. 2007.
- BURTON, R.F. Ionic regulation and water balance. In: SALEUDDIN, A.S.M. **The Mollusca- Physiology**. Part 2. New York: Academic Press. p. 291 - 352. 1983.
- CASTILHO-WESTPHAL, G.G. Ecologia da ostra do Mangue *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em manguezais da Baía de Guaratuba-PR. **Doutorado (Tese)**. Universidade Federal do Paraná. p. 118. 2012.
- CASTILHO-WESTPHAL, G.G.; MAGNANI, F.P.; OSTRENSKY, A. Gonad morphology and reproductive cycle of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) in the Baía de Guaratuba, Paraná, Brazil. **Acta Zoologica** (Stockholm) v. 96, p. 99-107. 2015.
- CAVALEIRO, N.P.; SOLÉ-CAVA, A.M.; MELO, C.M.R.; DE ALMEIDA, L.G.; LAZOSKI, C.; VASCONCELOS, A.T.R. The complete mitochondrial genome of *Crassostrea gasar* (Bivalvia: Ostreidae). Mitochondrial DNA. **Part A**. v. 27, n. 4, p. 2939-2940. 2016.
- CHAVEZ-VILLALBA, J.; POMMIER, J.; ANDRIAMISEZA, J.; POUVREAU, S.; BARRET, J.; COCHARD, J.C.; LE PENNEC, M. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. **Aquaculture**, v. 214, p. 115-130. 2002.

- CHRISTO, S. W.; ABSHER, T. M. Prodissoconch growth of oysters *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 34, n. 1, p. 71–77. 2008.
- CHRISTO, S.W. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo. **Doutorado (Tese)**. Universidade Federal do Paraná, p. 146. 2006.
- DA SILVA, P.M.; SCARDUA, M.P.; VIEIRA, C.B.; ALVES, A.C.; DUNGAN, C.F. Survey of pathologies in *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) oysters from cultured and wild populations in the Sao Francisco estuary, Sergipe, Northeast Brazil. **Journal of Shellfish Research**. vol. 34, n. 2. p. 289. 2015.
- DELGADO, M.; PÉREZ-CAMACHO, A. A study of gonadal development in *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: Influence of food ration and energy balance. **Journal of Shellfish Research**, 22 (2): 435-441. 2003.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 204p. 2016.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals**. Roma, 227p. 2018.
- FARIAS, N.D.; DE OLIVEIRA, N.F.P.; DA SILVA, P.M. *Perkinsus* infection is associated with alterations in the level of global DNA methylation of gills and gastrointestinal tract of the oyster *Crassostrea gasar*. **Journal of Invertebrate Pathology**. vol. 149, p. 76-81. 2017.
- FRANÇA, V.L.; MONTELES, J.S.; ALMEIDA FUNO, I.C.S.; CASTRO, A.C.L. Seleção de áreas potenciais para o cultivo de Ostra nativa, *Crassostrea* spp. e Sururu, *Mytella falcata*, em Raposa, Maranhão. **Arquivo Ciências do Mar**, vol. 46, n. 1, p. 62-75. 2013.
- FSADU. Fundação Sousaândrade de Apoio. **Plano Local de Desenvolvimento da Maricultura - PLDM's do Maranhão: Icatu, Humberto de Campos e Primeira Cruz**. São Luís. 2010.
- FUNO, I.C.S.A. Avaliação de parâmetros produtivos e biológicos da ostra nativa *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757) como subsídio ao desenvolvimento da

ostreicultura em ambientes estuarinos do Estado do Maranhão. **Doutorado (Tese)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. p. 120. 2016.

FUNO, I.C.S.A.; ANTONIO, I.G.; MONTELES, J.S.; PEREIRA, A.J.; GUTERRES, I.R.; GALVEZ, A.O. **Crescimento e mortalidade da ostra nativa *Crassostrea gasar* no município de Raposa, Maranhão. In: Congresso Brasileiro de Aquicultura de Espécies Nativa**. Anais. Belém/PA. UFPA, p. 12-12. 2013.

FUNO, I.C.S.A.; LOPES, R.G.P.S.; ANTONIO, I.G.; GALVEZ, A.O.; MARINHO, Y.F. Recruitment of oyster in artificial collectors on the Amazon macrotidal mangrove coast. **Ciência Rural**, v. 49, p. 1-12. 2019.

GOMES, C.H.A.M. Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório - 2009. **Mestrado (Dissertação)**. Universidade Federal de Santa Catarina. p. 57. 2009.

GOMES, C.H.A.M.; SILVA, F.C.; LOPES, G.R.; MELO, C.M.R. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology**. v.74 n.4. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.04912>.

GOSLING, E., Bivalve molluscs: Biology, ecology and culture. **1ª edition. Oxford: Fishing News Books**. p. 443. 2003.

HOPKINS, A. E. Factors influencing the spawning and setting of oysters in Galveston Bay, Texas. **Bulletin of the United States Bureau of Fisheries**, v. 47, p. 57-83. 1931.

KINNE, O. **Marine Ecology**. A comprehensive, Integrated Treatise on Life in the Oceans and Coastal Waters. John Wiley and Sons (Eds.). A Wiley-Interscience Publication, p. 577. 1976.

KINNE, O. **Diseases of marine animals**. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. p. 467-475. 1983.

LANGO-REYNOSO, F., CHÁVEZ-VILLALBA, J., COCHARD, JC E LE PENNEC, M. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, 190: 183 - 199. 2000.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOT-QUIÉVREUX, 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.

LAZOSKI, C.; GUSMAO, J.; BOUDRY, P.; SOLE-CAVA, A.M. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 426, p. 197-212. 2011. <http://dx.doi.org/10.3354/meps09035>

LEE, Y.J.; KANG, H.Y.; LEE, W.C.; KANG, C.K. Hydrodynamic effects on growth performance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in suspension in a Temperate Bay on the coast of Korea. **Estuaries Coasts**, p. 1-15. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s12237-017-0252-z>

LEGAT, J.F.A.; PUCHNICK-LEGAT, A.; FOGAÇA, F.H.S.; TURECK, C.R.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea gasar* cultured in the Northeast and South of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 2, p. 172-184. 2017a.

LEGAT, J.F.A.; PUCHNICK-LEGAT, A.; GOMES, C.H.A.M.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. Effects of salinity on fertilization and larviculture of the mangrove oyster, *Crassostrea gasar* in the laboratory. **Aquaculture**, v. 468, p. 545-548. 2017b.

LOPES, R.G.P.S. Identificação molecular de ostras nativas do Maranhão utilizando o gene COI. **Mestrado (Dissertação)**. Universidade Estadual do Maranhão. p. 52. 2016.

LOPES, R.G.P.S.; ANTONIO, I. G.; TCHAIKA, L.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. Molecular identification of native oysters on the coast of Maranhão, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, p. 377. 2018.

MACIEL, D.C. **Biologia Reprodutiva e Efeitos do Tributilestano sobre a *Mytella charruana* e *Mytloopsis leucophaeta* (Bivalvia – Mollusca) do Estuário do Rio Capibaribe, Pernambuco**. Universidade Federal do Pernambuco. 2011.

MARENZI, A.W.; CASTILHO-WESTPHAL, G.G. **Cultivo de organismos aquáticos-malacocultura**. Disponível em <https://pt.slideshare.net/patriciastierr/malacocultura-52215180>. Acessado em 29 de junho de 2018. 2011.

MELO, M.A.D.; DA SILVA, B.R.A.; VARELA, E.S.; SAMPAIO, I.; TAGLIARO, C.H. Development and characterization of ten microsatellite markers for population studies of the native Brazilian oyster *Crassostrea gasar*. **Conservation Genetics Resources**. v. 4. p. 583–586. 2012.

MONTELES, J.S.; CASTRO, T.C.S.; VIANA, D.C.P.; CONCEIÇÃO, F.S.; FRANÇA, V.L.; FUNO, I.C.S.A. Percepção socio-ambiental das marisqueiras no município de Raposa, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 2, p. 34-45. 2009.

MOREIRA, I.C.N. Impactos do extrativismo da *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) nos estuários dos Rios Paciência e Cururuca, São Luís, Maranhão: uma visão etnoconservacionista. **Mestrado (Dissertação)**. Universidade Federal do Maranhão. 2007.

NASCIMENTO, I. A.; SILVA, E. M.; RAMOS, M. I. S.; SANTOS, A. E. Desenvolvimento da gônada primária em ostras do mangue *Crassostrea rhizophorae*: idade e tamanho mínimo de maturação sexual. **Ciência e Cultura**, v. 32, n. 6, p. 736-742. 1980.

NEWELL, R.C.; BRANCH, G.M. The Influence of Temperature on the Maintenance of Metabolic Energy Balance in Marine Invertebrates. **Advances in Marine Biology**, v. 17, p. 329-396. 1980. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60304-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60304-1)

OLIVERA, A.; CAMPOS, S.S.; BRITO, L.O.; CASTRO, M.F.; FARIAS, M.E.; FRANÇA, E. Oyster culture in the state of Pernambuco-Brazil: Perspectives and Barriers. **World Aquaculture**. v. 37, n. 1, p.13-15. 2006.

ORTON, J.H. Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 12, p. 339-336. 1920. <https://doi.org/10.1017/S0025315400000102>

PAIXÃO, L.; FERREIRA, M.A.; NUNES, Z.; FONSECA-SIZO, F.; ROCHA, R. Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster *Crassostrea gasar*: Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture** 380-383: 6-12. 2013.

POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; TEIXEIRA, A.L. **Introdução à biologia das ostras**. Florianópolis. p.18. 2006.

PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL (PPM). IBGE, 2018.

QUAYLE, D.B. **Pacific Oyster Culture in British Columbia**. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada. p. 192. 1969.

QUAYLE, D.B. E NEWKIRK, G.F. Farming Bivalve Molluscs: methods for study and development. Louisiana. **The World Aquaculture Society**, p. 294. 1989.

QUEIROGA, F.R.; VIANNA, R.T.; VIEIRA, C.B.; FARIAS, N.D.; DA SILVA P.M. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**. v. 142, p. 756-766. 2015.

RABELO, M.F., AMARAL, M.C.R.; PFEIFFER, M.C. 2005. Índice de Condição de ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) de uma baía contaminada por metais pesados. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 2, p. 345-351. 2005.

RAMOS, C.O.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. Maturation of native oyster *Crassostrea gasar* at different diets in the laboratory. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 107-120. 2013.

RAMOS, C.O.; GOMES, C.H.A.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; SANTOS, A.I.; MELO, C.M.R. Maturation of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* at different temperatures in the laboratory. **Journal of Shellfish Research**. v. 33, n. 1, p. 187-194. 2014.

ROBINSON, A. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. **Aquaculture**. v. 106, n. 1, p. 89-97. 1992. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90252-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90252-G)

RODRIGUEZ-JARAMILLO, C.; MAEDA-MARTINEZ, N.A.; VALDEZ, M.E.; REYNOSO-GRANADOS, T.; MONSALVO-SPENCER, P.; PRADO-ANCONA, D.; CARDOZA-VELASCO, F.; ROBLES-MUNGARAY, M.; SICARD, M.T. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). **Journal of Shellfish Research**. v. 20, n. 1, p. 39-47. 2001.

RODRIGUEZ-JARAMILLO, C.; HURTADO, M.A.; ROMERO-VIVAS, E.; RAMÍREZ, J.L.; MANZANO, M.; PALACIOS, E. Gonadal Development and Histochemistry of the Tropical Oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an Annual Reproductive Cycle. **Journal of Shellfish Research**, v. 27, n. 5, p. 1129-1141. 2008. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1129>

ROMO, Z.M.; RE, A.D.; DÍAZ, F.; MENA, A. Physiological responses of pink abalone *Haliotis corrugata* (Gray, 1828) exposed to different combinations of temperature and salinity. **Aquaculture Research**. v. 41, n. 7, p. 953- 960. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02377.x>

SAMPAIO, D.S.; TAGLIARO, C.H.; SCHNEIDER, H.; BEASLEY, C.R. Oyster culture on the Amazon mangrove coast: asymmetries and advances in an emerging sector. **Reviews in Aquaculture**. v. 11, n. 1, p. 88-104. 2017. <https://doi.org/10.1111/raq.12227>

SANTERRE, C.; SOURDAINE, P.; MARC, N.; MINGANT, C.; ROBERT, R.; MARTINEZ, A.S. Oyster sex determination is influenced by temperature - first clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 165, n. 1, p. 61-69. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.007>

SANTOS, G.M. Caracterização das marisqueiras e cultivo experimental de *Crassostrea gasar* no município de Raposa-MA. São Luís. **Monografia (Graduação)**. Universidade Estadual do Maranhão. 51p. 2013.

SANTOS, N.M.V.; SOUSA-NETO, A.P.; CUNHA, F.E.A.; FERNANDES, C.A.F. A produção extrativista da ostra *Crassostrea* spp. na região do Delta do Rio Parnaíba, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 9, n. 1, p. 1-11. 2016.

SASTRY, A.N. The Relationships among Food, Temperature, and Gonad Development of the Bay Scallops *Aequipecten irradians* Lamarck. **Physiological Zoology**, v. 41, n. 1, p. 44-53. 1968.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Ideias de negócio: criação de ostras**. 2010. Disponível em: <http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/ostra%20sebrae.pdf>. Acessado em 15 de janeiro de 2020.

SILVA, P.M.; SCARDUA, M.P.; VIANNA, R.T.; MENDONÇA, R.C.; VIEIRA, C.B.; DUNGAN, C.F.; SCOTT, G.P.; REECE, K.S. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 119, p. 62-71. 2014.

SILVEIRA, R.C.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.M.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. **Brazilian Journal of Biology**. v. 71, n. 2, p. 557-562. 2011.

SIQUEIRA, K. L. F. *Crassostrea* (SACCO, 1897) no estuário do rio Vaza-Barris (Sergipe). Aracaju. **Mestrado (Dissertação)**. Unidade Universidade Tiradentes. 77 p. 2008.

SOUSA, A.C.R. Biologia reprodutiva de *Crassostrea gasar* (Andanson, 1757) no município de Raposa – MA. São Luís. **Monografia (Graduação)**. Universidade Estadual do Maranhão, 33p. 2017.

STEELE, S.; MULCAHY, M.F. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 79, n. 4, p. 673-686. 1999. <https://doi.org/10.1017/S0025315498000836>

SUPLICY, F. M. Cultivo de moluscos: Uma atividade que produz inúmeros impactos ambientais positivos. **Panorama da Aquicultura**, v. 9, n. 5, p. 27–31. 2005.

THOMPSON, R.J. The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel *Mytilus edulis* in a subarctic, non-estuarine environment. **Marine Biology**, v. 79, p. 277-288. 1984.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Relatório Sobre o Cultivo de Ostras**. Departamento de Aquicultura, Laboratório de Cultivo de Moluscos Bivalves no Brasil, Florianópolis – SC. 1997.

UTTING, S. Procedures for maintenance and hatchery conditioning of bivalve broodstock. **World Aquaculture**, v. 24, p. 78-82. 1993.

UTTING, S.D.; MILLICAN, P.F. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. **Aquaculture**, v. 155, p. 45-54. 1997.

VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N.S.; TAGLIARO, C.H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**, v. 73, p. 229-234. 2007.

VÉLEZ, A. Crecimiento, edad y madurez sexual del ostión *Crassostrea rhizophorae* de Bahía de Mochima. Boletín **Instituto Oceanográfico Universidad del Oriente**, Venezuela, v. 15, n. 1, p. 65-72. 1976.

VINATEA, L.A. **Aqüicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura**. Florianópolis, SC: EDUFSC, p. 310 p. 1999.

WALNE, P.R. Observations of the fertility of the oyster (*Ostrea edulis*). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 44: 293-310. 1964.

WALNE, P.R.; MANN, R. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. **Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium**, 587-607. 1975.

YANG, C.Y.; SIERP, M.T.; ABBOTT, C.A.; LI, Y.; QIN, J.G. Responses to thermal and salinity stress in wild and farmed Pacific oysters *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 201, p. 22-29. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.024>