



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA - AQI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório

Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. Cláudio Manoel R. de Melo

Florianópolis / SC
2009

Gomes, Carlos Henrique de Araújo Miranda

Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório / Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes – 2009.

57 f: grafs.

Orientador: Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1. Ostras; 2. Ciclo reprodutivo; 3. *Crassostrea brasiliiana*; 4. Maturação.

Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório.

Por

CARLOS HENRIQUE ARAÚJO DE MIRANDA GOMES

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo – *Orientador*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dra. Guisla Boehs

Aos meus filhos

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Caique e Sofia por me darem tanta felicidade e amor, gerando energia para superar os obstáculos do dia a dia.

A minha amada esposa Dani, por todos os momentos maravilhosos e pelo companheirismo nos momentos mais difíceis de nossa caminhada, e por todo carinho e apoio dedicados, com muito amor, a nossa família.

Em especial aos meus pais, Antônio Carlos e Vera Nícia, pelo amor, dedicação e incentivo durante os últimos meses.

Aos meus irmãos Mônica, Felipe e Antônio que mesmo não estando tão presentes no meu cotidiano, permanecem em meus pensamentos diariamente.

Com todo carinho a minha avó Dona Dulce, por sempre estar pensando nos seus e por sempre ter sido minha referência de força e honestidade.

A minha sogra Nice, que tem sido uma peça fundamental em nossa família, por todo apoio.

Ao meu amigo, Professor Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, pela orientação, ensinamentos, apoio, dedicação e motivação na realização deste trabalho e a sua família por sempre me receber tão bem em seu lar.

A “grande família” do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Zezé, Sino, Eduardo, Alexandre, Bê, Jaqueline, Marisa, Adriana Pereira, Claudio Blacher, Ricardo, Itamar e ao supervisor Professor Dr. Jaime Fernando Ferreira que possibilitaram a realização deste trabalho. Em especial ao grande companheiro, chefe de produção Francisco Carlos da Silva pelos grandes ensinamentos.

Aos amigos Francisco Lagreze, Rafael V. Vilela e Claudio R. Tureck, que sempre estiveram dispostos a discutir e ajudar e em especial ao amigo Gustavo Ruschel Lopes pela paciência e convivência diária.

A todos os alunos que pelo LMM passaram e no qual pude fazer grandes amizades, entre eles Anefelice e Ricardo Ventura que contribuíram diretamente na realização deste trabalho.

A Professora Dra. Aimê Rachel M. Magalhães pela estrutura do Laboratório de Malacologia Experimental e a colega Ana Lucia, pela ajuda e dedicação durante a confecção das lâminas histológicas.

Ao CNPq e ao CT-HIDRO/CT-AGRO/MCT/SEAP-PR/FINEP pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o ciclo reprodutivo da ostra nativa *Crassostrea brasiliana*, em campo e em laboratório. O estágio de desenvolvimento do ciclo reprodutivo dos animais foi acompanhado na praia do Sambaqui/Florianópolis/SC (27°29'18"S e 48°32'12"W) entre maio de 2008 a novembro de 2009. No mês de julho os animais encontravam-se no estágio de repouso, entre os meses de agosto a outubro, as ostras seguiram nos estádios de pré-maturação e maturação. Entre os meses de novembro e dezembro, as ostras começaram a ser encontradas no estágio maturo, havendo predominância de fêmeas aptas a eliminação de gametas. Houve associação positiva ($r=0,77$; $P<0,01$) entre o estágio de desenvolvimento do ciclo reprodutivo das ostras e a temperatura, bem como associação negativa com a salinidade ($r=-0,56$; $P=0,042$), demonstrando que tanto o aumento da temperatura como a redução da salinidade são fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento reprodutivo das ostras da espécie. O índice de condição (IC) dos animais, também teve relação com a temperatura da água do mar, sendo os maiores índices observados nos meses em que a temperatura da água do mar teve aumento gradativo. Também foi realizado um experimento, no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, visando testar o efeito da salinidade da água sobre o desenvolvimento reprodutivo das ostras. Para tanto, os animais foram condicionados em tanques padronizados e testaram-se duas salinidades (24‰ e 34‰). No experimento de laboratório, observou-se que o regime de salinidade influenciou o desenvolvimento do tecido gonádico das ostras, sendo que a salinidade de 24 permitiu aos animais maior desenvolvimento reprodutivo. Os resultados obtidos neste estudo contribuíram com informações para auxiliar o condicionamento e a reprodução da espécie em laboratório.

Palavras chaves: 1. Ostras; 2. Ciclo reprodutivo; 3. *Crassostrea brasiliana*; 4. Condicionamento em laboratório.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the native oyster *Crassostrea brasiliana* reproductive cycle, on field and laboratory. The stage of development of reproductive cycle of those animals was accompanied on the beach of Sambaqui / Florianópolis / SC (27 ° 29'18 "S and 48 ° 32'12" W) between the May 2008 to November 2009. In July the animals were at rest stage, between August to October, the oysters carried out on pre-maturation and maturation. On November and December the oysters were on mature stage, occurring predominance of females able to eliminate gametes. There was a positive association ($r = 0.77$, $P < 0.01$) between the stage of development of reproductive cycle of oysters and temperature, as well the negative association between salinity ($r = -0.56$, $P = 0.042$), demonstrating that both the temperature increase as the reduction of salinity are environmental factors that influence the reproductive development of oysters. The condition index (IC) of the animals also had relation with the seawater temperature, being the highest rates observed in the months that the temperature of seawater had a gradual rising. It was also realized an experiment at the Laboratory of Marine Mollusks, of Federal University of Santa Catarina in order to test the effect of water salinity on the reproductive cycle of oysters. To this end, the animals were conditioned on standardized tanks and tested two salinities (24‰ and 34‰). This experiment showed that the regime of salinity influenced the development of gonadal tissue of oysters, being the salinity of 24‰ enabled the animals to a higher reproductive development. The results obtained on this study contributed with information to help the conditioning and reproduction on this specie at laboratory.

Key words: 1. Oysters; 2. Reproductive cycle; 3. *Crassostrea brasiliana*; 4. Hatchery conditioning

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	15
Ciclo reprodutivo da ostra <i>Crassostrea brasiliiana</i> (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório.....	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 Experimento de campo.....	27
2.2 Experimento de laboratório.....	30
2.3 Análises Estatísticas.....	30
3 RESULTADOS.....	31
3.1 Experimento de campo.....	31
3.2 Experimento de laboratório.....	38
4 DISCUSSÃO.....	39
4.1 Experimento de campo.....	39
4.2 Experimento de laboratório.....	42
5 CONCLUSÕES.....	43
6 AGRADECIMENTOS.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	50

INTRODUÇÃO

A malacocultura tem se desenvolvido no Brasil baseada na produção de mexilhões e ostras, sendo Santa Catarina o estado de maior destaque, tendo produzido 11.297,5 toneladas de moluscos no ano de 2007 (IBAMA, 2007). Na produção da aquicultura mundial, o grupo dos moluscos aparece como o segundo mais cultivado, com 27% da produção total (FAO, 2008).

No Brasil, o cultivo de ostras se dá em torno de três espécies do gênero *Crassostrea*: as ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) e a ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). A última é a que possui maior volume de produção nacional, situação que também se observa em nível mundial (FAO, 2008). Em Santa Catarina, o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) tem realizado trabalhos de pesquisa e extensão proporcionando o desenvolvimento do cultivo de ostras, que atualmente se baseia no fornecimento de sementes produzidas pelo LMM.

As ostras são hermafroditas rítmicas sequenciais, geralmente apresentando o sexo masculino quando jovem, podendo mudar quando adulta em diferentes períodos de desova, variando de acordo com fatores genéticos e ambientais. Nos dois principais gêneros de ostras, *Crassostrea* e *Ostrea* ocorrem a fecundação externa e cruzada após o contato entre o espermatozóide e ovócito até a fusão dos pró-núcleos, entretanto as espécies dos dois gêneros possuem estratégias reprodutivas diferentes. No gênero *Ostrea*, os gametas masculinos são liberados na água, podendo entrar em contato com os ovócitos que, após a desova, permanecem na câmara suprabranquial, na região inalante do manto das fêmeas desde a desova até parte do desenvolvimento larval (QUAYLE, 1980; ALVAREZ, 1991). Nas ostras do gênero *Crassostrea*, durante a desova, tanto os gametas masculinos quanto os femininos são liberados na água, onde ocorre a fecundação e o desenvolvimento larval (QUAYLE, 1980).

As espécies do gênero *Crassostrea* são consideradas eurihalinas e euritéricas (GALTSOFF, 1964; QUAYLE, 1988). Elas habitam diferentes ambientes, como regiões costeiras com características de ambiente marinho onde a salinidade é alta, ou onde há fluxo regular de

água doce como algumas regiões de baías e ambientes estuarinos (IMAI, 1982).

De acordo com Absher (1989), as espécies deste gênero são sésseis, e possuem uma grande diversidade na morfologia da concha, relacionadas com o substrato onde estão fixadas. Existem controvérsias na identificação. Autores como Rios (2009) consideram sinonímias as espécies *C. rhizophorae* e *C. brasiliana*, enquanto que, com base na caracterização genética, alguns trabalhos sugerem a distinção entre as espécies (IGNACIO et al., 2000, LAPÈGUE et al., 2002, LAZOSKI, 2004, PIE et al., 2006). Trabalhos realizados nas décadas que antecedem a caracterização genética de ostras nativas através da utilização de marcadores moleculares geram discussões a respeito das espécies que os estudos enfocam, principalmente quando desenvolvidos por autores que as consideram sinonímias.

C. rhizophorae é encontrada aderida as raízes de árvores de mangue (*Rhizophorae mangle*) e costões rochosos, no mesolitoral, desde o sul do Brasil até o litoral caribenho (Panamá), enquanto que *C. brasiliana* é encontrada no infralitoral e mesolitoral também fixadas a raízes de árvore de mangue e costões de baías (estuários), enseadas e regiões estuarinas-lagunares desde o sul do Brasil até o Pará (LAZOSKI, 2004). Contudo, Absher (1989) descreve que *C. brasiliana* habita, preferencialmente, o infralitoral.

Boa parte do litoral brasileiro é constituída de ambientes estuarinos onde populações litorâneas consomem, bem como comercializam, as ostras nativas extraídas destes ambientes, sobressaindo a região sul e sudeste (MACHADO et al., 2000). As regiões estuarinas possuem sua área definida pelo limite superior da preamar. Sua extensão é dividida em três setores: o baixo estuário que possui conexão direta com o mar; o médio estuário, onde ocorrem fortes misturas entre água doce e salgada e o alto estuário, que é mais influenciado pela água doce dos rios e tem influência das grandes marés (FAIRBRIDGE, 1980). Destacam-se por serem regiões protegidas, com alto aporte de matéria orgânica e com grande produtividade primária. Estas regiões podem sustentar, parcialmente ou por completo, o ciclo de vida de organismos eurihalinos (PERILLO, 1995).

Em estudo pioneiro sobre o desenvolvimento das ostras e ostreicultura nos arredores de Santos (SP), há relato que coletores de ostras utilizavam canoas e com o auxílio de varas, sondavam o fundo de estuários a procura dos bancos de ostra as quais eram coletadas através de mergulho (LIMA e VAZZOLER, 1963). Os estuários possuem em

comum, características influenciadas pelo aporte de água doce, apresentando grandes variações na salinidade, restringindo a distribuição de espécies. Nos estuários de Cananéia, região do litoral sul de São Paulo, a distribuição de *C. brasiliiana* é fortemente influenciada pela salinidade, havendo redução dos bancos de ostras devido ao gradiente decrescente de salinidade em direção as cabeceiras (PEREIRA et al., 2001). O complexo estuarino de Cananéia é considerado o maior produtor de ostras de bancos naturais do Brasil (PEREIRA et al., 2001). Vários autores (PEREIRA et al., 1988; PEREIRA e CHAGAS SOARES, 1996; PEREIRA, 1997; PEREIRA et al., 2003) têm apontado a viabilidade zootécnica e econômica do cultivo desta espécie.

Neste contexto, observações efetuadas no canal da Bertioga, litoral de São Paulo, demonstram que as ostras nativas atingem o tamanho médio comercial (de seis a dez centímetros) em, aproximadamente, seis meses (LIMA e VAZZOLER, 1963). Segundo Absher (1989), *C. brasiliiana* pode atingir altura (medida do umbo a margem oposta) de mais de 20 centímetros. Em outro estudo (PEREIRA e SOARES, 1996), foi constatado que animais cultivados em sistema de tabuleiro na localidade de Guarapari, região da Cananéia/SP, atingiram tamanho comercial (mais de 50 mm de altura) a partir de nove meses de cultivo. Na mesma região, foi realizada uma estimativa dos estoques de ostras, mostrando que a pressão sobre o banco natural está próxima da sua capacidade máxima de exploração (PEREIRA et al., 2000).

Os bivalves marinhos diferem na produção de outros organismos aquáticos cultiváveis devido a capacidade de converter parte da produção primária do mar em proteína animal que, comparada a outros organismos da maricultura, reflete em baixo custo de produção e menor impacto ambiental. Aliado a isso, o cultivo de ostras nativas é uma atividade aquícola geradora de renda que contribui na conservação dos estuários, diminuindo a pressão sobre os estoques naturais e promovendo uma exploração sustentável do ambiente (GUIMARÃES et al., 2008). Entretanto, o cultivo de ostras nativas depende quase exclusivamente de sementes coletadas no ambiente natural (PEREIRA et al. 2003). Para isso são necessários estudos sobre o ciclo reprodutivo e época de ocorrência de larvas aptas ao assentamento para a colocação de coletores (NASCIMENTO, 1983). Além disso, a necessidade de reprodutores aptos a desova, do ambiente natural, torna de suma importância o conhecimento do ciclo reprodutivo das espécies em seus locais de cultivo.

Segundo Alvarez (1991), o ciclo reprodutivo é o conjunto de eventos a partir da ativação do desenvolvimento do tecido gonádico até a produção das células sexuais maduras (gametogênese). As variações importantes relacionadas aos ciclos de maturação em bivalves são associadas a fatores ambientais e características genéticas (ALVAREZ, 1991; VILLALBA et al., 2001). As mudanças sazonais no tecido gonádico podem ser estudadas através da histologia, composição bioquímica, fatores de condição e observações visuais (QUAYLE e NEWKIRK, 1989).

Os ciclos reprodutivos de ostras vêm sendo estudados por décadas. Parte da produção científica é direcionada para espécies do hemisfério norte como a ostra Norte Americana, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), ou para espécies mundialmente cultivadas como a ostra do pacífico (*C. gigas*) (COE, 1932; LOOSANOF, 1942; KENNEDY e BATTLE, 1964; LE DANTEC, 1968; DINAMANI, 1974). Da mesma forma o ciclo reprodutivo de ostras nativas tem merecido atenção de diversos autores (LIMA e VAZZOLER, 1963; NASCIMENTO, 1978; NASCIMENTO e LUNETTA, 1978; NASCIMENTO e PEREIRA, 1980; NASCIMENTO, 1980; NASCIMENTO e MIRAGLIA, 1983; LITTLEWOOD e GORDON, 1988; NASCIMENTO, 1990; GALVÃO et al., 2000; CHRISTO, 2006; CHRISTO e ABSHER, 2006). Outros autores (FERNANDES, 1975; LEMOS et al., 1994; OLIVERA e GUIMARÃES, 2003; COSTA e ALCÂNTARA NETO, 2004; LENZ, 2008) têm estudado aspectos ecológicos e reprodutivos em ostras.

O sistema reprodutivo das ostras é formado pelo conjunto de células que formam o tecido gonádico, composto de folículos, gonodutos e aberturas urogenitais (MORALES, 1991). O tecido gonádico reveste a superfície externa da glândula digestiva, sendo coberta pelo manto. O mesmo inicia na região do esôfago estendendo-se pela massa visceral até a área do pericárdio, onde bifurca em lobo dorsal na extensão do reto e lobo ventral, na parte posterior da massa visceral (EBLE e SCRO, 1996). Durante a fase de repouso, o tecido gonádico não pode ser diferenciado totalmente do tecido conjuntivo vesicular. As células do tecido conectivo intersticial, presentes na região interfolicular, servem como local de armazenamento de glicogênio, dando maior volume a massa visceral (IMAI, 1982). Este carboidrato é armazenado principalmente a partir do alimento ingerido, sendo mobilizado para fornecer energia durante a gametogênese (PERDUE et al., 1981; EBLE e SCRO, 1996).

A cada ciclo reprodutivo, após a última desova e reabsorção dos gametas não liberados, o tecido gonádico entra na fase indiferenciada, os folículos se tornam muito pequenos e separados, contendo apenas células indiferenciadas, com isso o sexo torna-se indistinguível. A partir das células indiferenciadas, irão se formar as oogônias e espermatogônias (KENNEDY e BATTLE, 1964; GALTSOFF, 1964; EBLE e SCRO, 1996).

De acordo com Alvarez (1991), neste momento ocorrem sucessivas mitoses e a quantidade de oogônias de núcleo ovóide e citoplasma basófilo aumenta, aumentando também o tamanho dos folículos. A transição para ovócito primário é marcado pela mudança na aparência do núcleo, que se torna maior e esférico, assim como o volume do citoplasma. Isso ocorre com a quebra do glicogênio e a biossíntese dos lipídeos, havendo a deposição de vitelo na célula (RUIZ et al.; 1992; EBLE e SCRO, 1996). No momento da desova, muitos dos ovócitos primários ainda permanecem aderidos a parede do folículo pelo pedúnculo, outros ficam livres no lúmen prontos para serem expelidos (GALTSOFF, 1964). Quando expelidos a maioria dos ovócitos encontram-se em diferentes fases da primeira meiose, e com constituição diplóide (KENNEDY e BATTLE, 1964).

Nos machos, as espermatogônias se dividem rapidamente e constituem a principal tipo de célula do epitélio germinativo nos estágios de diferenciação sexual inicial. As espermatogônias se diferenciam em espermatócitos primários, estes começam a se dividir por meiose formando os espermatócitos secundários que com a continuação da divisão meiótica formarão as espermátides, de constituição haplóide, que darão origem aos espermatozóides (ALVAREZ, 1991; EBLE e SCRO, 1996).

Por décadas, a reprodução de ostras tem sido descrita, enfatizando as fases do ciclo reprodutivo baseadas no desenvolvimento das células sexuais do tecido gonádico (DINAMANI, 1987). O método mais confiável de avaliar o desenvolvimento do ciclo reprodutivo em bivalves é baseado na histologia, que classifica os animais de acordo com as características apresentadas pelas células do tecido gonádico, em diferentes estádios de desenvolvimento (GOSLING, 2003). Contudo, devido a complexidade e diferenciação do ciclo gametogênico das ostras encontram-se na literatura diferentes classificações. A maioria dos trabalhos realizados com o gênero *Crassostrea* refere-se a *C. gigas* (MANN, 1979; DINAMANI, 1987; ROBINSON, 1992; STEEL e MULCAHY, 1999; LANGO REYNOSO et al., 2000; CHÁVEZ-

VILLALBA et al., 2002; CHÁVEZ-VILLALBA et al., 2003a; CHÁVEZ-VILLALBA et al., 2003b; FABIUUX et al., 2005; NORMAND et al., 2008).

A análise histológica tende a ser subjetiva, entretanto estudo de Gosling (2003) mostra haver concordância entre as metodologias histológicas e os métodos quantitativos com técnicas de estereologia.

Além do método histológico, outros métodos também são usados para avaliar o desenvolvimento reprodutivo, como a análise de imagem da secção histológica, que determina o estágio gametogênico através da área (PERDUE et al., 1981; CHÁVEZ-VILLALBA et al., 2003), variações na quantidade de DNA e RNA do tecido gonádico (QI LI et al., 2000) e mudanças no tamanho e densidade dos oócitos (LANGO-REYNOSO et al. 2000).

Contudo, todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, sendo recomendado que sejam feitas em conjunto as análises qualitativa (histologia) e quantitativa (GOSLING, 2003).

Através do método quantitativo de índice de condição (IC), é possível avaliar indiretamente o estágio reprodutivo do animal (QUAYLE E NEWKIRK, 1989; RABELO et al., 2005). Neste sentido, diversos autores têm publicado informações sobre o IC de ostras nativas (NASCIMENTO e PEREIRA, 1980; ABSHER, 1989; GALVÃO et al., 2000; RABELO et al., 2005; CHRISTO e ABSHER, 2006). Altos valores de IC são determinados pela quantidade de reserva de glicogênio e quantidade de tecido reprodutivo do animal. Segundo Perdue et al (1983), o tecido gonádico pode ser responsável por 55% do total do peso seco de carne. Os valores do IC que consideram o peso da carne em relação ao peso da concha e peso total da ostra podem representar a formação de reserva de glicogênio, maturação sexual e período de desova (NASCIMENTO et al., 1980; GALVÃO et al., 2000).

Como um índice ecofisiológico, o IC pode ser afetado por vários fatores abióticos e atividades fisiológicas, dentre as quais a desova é um dos mais importantes (RABELO et al., 2005). Dentre os fatores exógenos que influenciam no desenvolvimento gonádico estão as variações de temperatura e salinidade da água, quantidade e qualidade de alimento (SANTOS, 2001). Destes, a temperatura da água é o fator ambiental de maior relevância, sendo bem documentada por diversos autores (WALNE, 1972; MANN, 1979). A diversidade dos ambientes nas diferentes latitudes leva diferentes comportamentos dos animais de acordo com as características de cada região. Desta forma o controle

destes fatores abióticos possibilita, até certo ponto, induzir os animais ao estágio gonadal desejado (UTTING e MILLICAN, 1997).

Em Santa Catarina, o desenvolvimento de tecnologia na produção de ostras nativas vem sendo realizado pelo LMM e a EPAGRI desde 1996 (GUZENSKI, 1996; FREITAS et al., 2004). Contudo, a falta de fornecimento regular de sementes, em quantidade e com qualidade asseguradas, tem sido um dos principais obstáculos para o estabelecimento de cultivos das espécies. Para contornar este problema, há necessidade de produção de sementes em laboratório. No entanto, um dos fatores limitantes para esta produção é a imprevisibilidade na obtenção de reprodutores maduros oriundos do mar.

Assim, o presente estudo tem por objetivo determinar o ciclo reprodutivo de ostras nativas da espécie *C. brasiliiana* e correlacionar o mesmo com a temperatura e salinidade da água bem como avaliar a maturação desta espécie em laboratório.

O artigo científico a seguir foi redigido de acordo com as normas da revista *Aquaculture*, a qual será posteriormente submetido para publicação.

Ciclo reprodutivo da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em cultivo e maturação em laboratório

Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes, Ane Felice Medeiros Françoso, Gustavo Ruschel Lopes, Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, Servidão dos Coroas, s/n, Barra da Lagoa, CEP 88061-600, Florianópolis, SC/Brasil

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o ciclo reprodutivo da ostra nativa *Crassostrea brasiliana*, em campo e em laboratório. O estágio de desenvolvimento do ciclo reprodutivo dos animais foi acompanhado na praia do Sambaqui/Florianópolis/SC (27°29'18"S e 48°32'12"W) entre maio de 2008 a novembro de 2009. No mês de julho os animais encontravam-se no estágio de repouso, entre os meses de agosto a outubro, as ostras seguiram nos estádios de pré-maturação e maturação. Entre os meses de novembro e dezembro, as ostras começaram a ser encontradas no estágio maturo, havendo predominância de fêmeas aptas a eliminação de gametas. Houve associação positiva ($r=0,77$; $P<0,01$) entre o estágio de desenvolvimento do ciclo reprodutivo das ostras e a temperatura, bem como associação negativa com a salinidade ($r=-0,56$; $P=0,042$), demonstrando que tanto o aumento da temperatura como a redução da salinidade são fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento reprodutivo das ostras da espécie. O índice de condição (IC) dos animais, também teve relação com a temperatura da água do mar, sendo os maiores índices observados nos meses em que a temperatura da água do mar teve aumento gradativo. Também foi realizado um experimento, no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, visando testar o efeito da salinidade da água sobre o desenvolvimento reprodutivo das ostras. Para tanto, os animais foram condicionados em tanques padronizados e testaram-se duas salinidades (24‰ e 34‰). No experimento de laboratório, observou-se que o regime de salinidade influenciou o desenvolvimento do tecido gonádico das ostras, sendo que a salinidade de 24 permitiu aos animais maior desenvolvimento reprodutivo. Os resultados obtidos neste estudo contribuíram com informações para auxiliar o condicionamento e a reprodução da espécie em laboratório.

Palavras chaves: Ostras; Ciclo reprodutivo; *Crassostrea brasiliana*; Condicionamento em laboratório.

TITLE: Reproductive cycle of the oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) in field and laboratories condition

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the native oyster *Crassostrea brasiliana* reproductive cycle, on field and laboratory. The stage of development of reproductive cycle of those animals was accompanied on the beach of Sambaqui / Florianópolis / SC (27 ° 29'18 "S and 48 ° 32'12" W) between the May 2008 to November 2009. In July the animals were at rest stage, between August to October, the oysters carried out on pre-maturation and maturation. On November and December the oysters were on mature stage, occurring predominance of females able to eliminate gametes. There was a positive association ($r = 0.77$, $P < 0.01$) between the stage of development of reproductive cycle of oysters and temperature, as well the negative association between salinity ($r = -0.56$, $P = 0.042$), demonstrating that both the temperature increase as the reduction of salinity are environmental factors that influence the reproductive development of oysters. The condition index (IC) of the animals also had relation with the seawater temperature, being the highest rates observed in the months that the temperature of seawater had a gradual rising. It was also realized an experiment at the Laboratory of Marine Mollusks, of Federal University of Santa Catarina in order to test the effect of water salinity on the reproductive cycle of oysters. To this end, the animals were conditioned on standardized tanks and tested two salinities (24‰ and 34‰). This experiment showed that the regime of salinity influenced the development of gonadal tissue of oysters, being the salinity of 24‰ enabled the animals to a higher reproductive development. The results obtained on this study contributed with information to help the conditioning and reproduction on this specie at laboratory.

Key words: 1. Oysters; 2. Reproductive cycle; 3. *Crassostrea brasiliana*; 4. Hatchery conditioning

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo de ostras tem se desenvolvido em torno de três espécies do gênero *Crassostrea*: as ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) e a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). O cultivo da ostra do pacífico está bem estabelecido no estado de Santa Catarina, que é responsável pela maior parte da produção nacional de ostras de cultivo. Entretanto, as características de clima tropical dificultam o cultivo de *C. gigas* nas demais regiões do país. Nestas regiões a “ostra do mangue” *C. brasiliana*, geralmente é utilizada em sistemas de cultivo (Christo, 2006).

O cultivo de ostras nativas depende quase exclusivamente de sementes coletadas no ambiente natural (Pereira et al., 2003). O método de cultivo utilizado constitui da transferência de ostras jovens coletadas no ambiente natural para sistemas de cultivo, onde são mantidas até atingirem o tamanho comercial. Assim, para o sucesso na obtenção de sementes são necessários estudos sobre o período reprodutivo, bem como da época de ocorrência de larvas aptas ao assentamento para a colocação de coletores em cada região (Nascimento, 1983). O estudo do ciclo reprodutivo das ostras nativas, relacionados com os fatores ambientais, pode fornecer informações para o desenvolvimento de técnicas para sua manutenção em laboratório e seu manejo no ambiente. Da mesma forma, indica as melhores épocas para obtenção de reprodutores maduros para produção de sementes em laboratório.

O ciclo reprodutivo no ambiente natural, de ostras do gênero *Crassostrea*, tem sido descrito principalmente para *C. gigas*, (Mann, 1979; Perdue, 1982; Dinamani, 1987; Ruiz et al., 1992; Steele e Mulcahy, 1999; Lango-Reynoso et al., 2000; QI Li et al., 2000; Chavez-Villalba et al., 2001; Lango-Reynoso et al., 2006; Normand et al., 2008).

Dentre os métodos de avaliação do desenvolvimento do ciclo reprodutivo de bivalves, o mais confiável é o baseado na histologia, que classifica a ostra de acordo com as características apresentadas pelas células do tecido gonádico em diferentes estágios de desenvolvimento (Gosling, 2003). Entretanto, este tipo de classificação tende a ser subjetivo e deve ser acompanhado por métodos quantitativos, como, por exemplo, da análise do índice de condição dos animais (Barber e Blake, 1991; Gosling, 2003). Através do método quantitativo de índice de condição (IC) é possível avaliar indiretamente o estágio reprodutivo do animal (Quayle e Newkirk, 1989; Rabelo et al., 2005).

O condicionamento de reprodutores de bivalves em laboratório pode ser feito através da manipulação ambiental, física e nutricional em várias épocas do ano (Gallager e Mann, 1986; Utting e Millican, 1997). Diversos trabalhos relatam que a temperatura junto a alimentação influencia no desenvolvimento gonádico (Loosanoff e Davis, 1951; Lannan et al., 1980; Muranaka e Lannan, 1984; Utting, 1993; Utting e Millican, 1997). Loosanoff e Davis (1951) relatam que condições artificiais proporcionam o desenvolvimento normal de gametas viáveis em várias espécies de bivalves, permitindo, assim, a produção de sementes destes moluscos fora do período de desova.

A espécie de ostra nativa *C. brasiliana* é principalmente encontrada em regiões que possuem expressiva influência do aporte de água doce do continente, apresentando grandes variações na salinidade. Nos estuários de Cananéia, região do litoral sul de São Paulo, a distribuição de *C. brasiliana* é fortemente influenciada pela salinidade, havendo redução dos bancos de ostras devido ao gradiente decrescente de salinidade em direção as cabeceiras (Pereira et al., 2001). A influência da salinidade no processo de gametogênese de *C. gigas* foi verificada por Muranaka e Lannan (1984). Por ser uma espécie típica de estuário, *C. brasiliana* pode ter o ciclo reprodutivo influenciado, quando condicionada, por diferentes regimes de salinidade.

Uma das técnicas de condicionamento em laboratório consiste na elevação gradativa da temperatura para estimular a gametogênese, sendo este processo responsável pelo aumento do período em que se dispõe de reprodutores com gametas aptos para a reprodução (Muranaka e Lannan, 1984).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo acompanhar o ciclo reprodutivo da ostra *C. brasiliana* em campo, bem como, avaliar dois regimes de salinidade sobre o desenvolvimento gonádico desta espécie em laboratório.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Experimento de campo

Foram utilizadas ostras da espécie *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819), provenientes da segunda geração do cruzamento de animais selvagens coletados na Baía da Babitonga, São Francisco do Sul, SC. Os animais foram produzidos no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, em janeiro de 2007 e mantidas em lanternas em sistema de cultivo suspenso, tipo espinhel, localizado na Praia da Ponta do Sambaqui (27°29'18"S e 48°32'12"W).

Os animais foram previamente identificados através de técnicas moleculares, conforme metodologia descrita por Lazoski (2004) visando confirmar a espécie em estudo. As ostras, com altura entre 43 e 70 mm, foram acondicionadas em lanternas de cultivo onde foram mantidas durante todo período experimental.

Experimento ocorreu entre maio de 2008 e novembro de 2009. A cada coleta foram amostrados aleatoriamente, aproximadamente, 20 indivíduos. As amostras foram levadas para o LMM para realização da biometria, índice de condição e obtenção do material para histologia. Os dados de temperatura e salinidade foram coletados a aproximadamente um metro de profundidade, utilizando uma sonda multiparâmetro marca YSI Enviromental Mode 556.

Durante o período experimental foram amostradas 94 ostras para análise do IC, a cada coleta, cerca de cinco indivíduos foram pesados (peso vivo total) com o auxílio de uma balança com precisão de 0,001 g.

Em seguida, após a secção do músculo adutor e remoção das partes moles, pesou-se a carne e a concha, separadamente, obtendo-se o peso úmido. A carne e a concha foram para estufa a 68°C onde permaneceram por 48h. Após este período, o material foi novamente pesado e obteve-se o peso seco conforme descrito por (Lawrence e Scott, 1982). O índice de condição foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Crosby e Gale (1990).

Para as análises histológicas, a parte mole dos animais (15 animais a cada coleta) foi mantida em solução fixadora de Davidson marinho (Shaw e Battle, 1957) por 48h. Após a fixação, através da secção transversal dos palpos labiais até a região do reto, foi obtida uma fatia de 4 mm de espessura, que foi posteriormente acondicionada em cassetes para processamento histológico e inserção nos blocos de parafina. Os cortes em secções de sete µm de espessura foram feitos em micrótomo e a fatia obtida corada com hematoxilina e eosina de Harrys. Estes procedimentos foram realizados no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ) do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. As lâminas histológicas obtidas foram, então, analisadas em microscopia óptica para determinação do sexo e estágio do ciclo reprodutivo. A determinação das fases do ciclo reprodutivo foram baseadas nas classificações qualitativas de Mann (1979) e Lango Reynoso et al. (2000) apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos estádios de desenvolvimento do tecido gonádico

Estádios (código)	Descrição histológica em fêmeas	Descrição histológica em machos
Repouso (0)	Ausência de folículos ou folículos muito pequenos e alongados com células do epitélio germinativo sem diferenciação.	Ausência de folículos ou folículos muito pequenos e alongados com células do epitélio germinativo indiferenciadas.
Pré-maturação (1)	Folículos alongados e isolados ainda com muito tecido conjuntivo. Presença de alguns gonócitos primordiais, ovogônias e ovócito em pré-vitelogênese.	Folículos pequenos e isolados, ainda com muito tecido conjuntivo. Presença de gonócitos primordiais, espermatogônia e espermatócitos.
Maturação (2)	Folículos mais próximos, pouco tecido conjuntivo com células sexuais em diferentes estágios de desenvolvimento.	Folículos mais próximos, com células sexuais em diferentes estágios de desenvolvimento. Espermatozóides no centro dos folículos.
Maduro (3)	Folículos justapostos, densamente preenchidos com gametas maduros. Predominância de ovócitos maduros alguns com núcleo visível.	Folículos justapostos, densamente preenchidos com espermatozóides com flagelo orientado para o lúmen.
Desova e reabsorção (4)	Folículos com gametas remanescentes, alguns alongados, quebrados ou se degenerando. Algumas vezes é observado o re-desenvolvimento das células germinativas dos folículos, com a presença de ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Tecido conjuntivo começa a se desenvolver entre os folículos.	Folículos com gametas remanescentes, espermatozóides se degenerando. Tecido conjuntivo começa a se desenvolver entre os folículos.

2.2 Experimento de laboratório

No laboratório, foi testada a influência da salinidade (24 e 34‰) sobre o ciclo reprodutivo dos animais. Foram utilizados seis tanques retangulares de fibra de vidro com capacidade de 150 litros. Em cada tanque foram acondicionadas ostras de duas classes de tamanho, sendo 24 indivíduos com altura entre 45 e 59 mm e peso médio total de 813 g e 12 ostras medindo 60 a 70 mm e peso médio total 642 g. Utilizou-se fluxo contínuo de água de 500 ml/min. (ajustados duas vezes ao dia), aeração moderada e alimentação na concentração de aproximadamente 16×10^4 células/ml de microalgas da espécie *Chaetoceros mulleri*. A temperatura média da água dos tanques foi de $24 \pm 0,8^\circ\text{C}$.

Os tanques foram limpos diariamente através do sifonamento de cerca de 10% do volume total da água para remover as fezes e pseudofezes do fundo.

Foram utilizados dois tanques (um para cada salinidade) de 6.000 litros como reservatórios de água e alimentação. Uma bomba de $\frac{1}{2}$ CV foi utilizada para recircular a água (com alimento) do reservatório até as unidades experimentais.

Os reservatórios, de água e alimento de cada tratamento, foram abastecidos duas vezes ao dia. No tratamento de salinidade 24‰ utilizou-se água do mar filtrada, com filtros de retenção de partícula de 5 μm , misturada a água doce, permanecendo a salinidade entre 23 a 25‰. No segundo tratamento (salinidade 34‰) foi utilizado o procedimento anteriormente descrito, porém com a água do mar sem mistura de água doce, permanecendo a salinidade entre 33 a 34‰. Posteriormente adicionaram-se microalgas em volume necessário para obtenção da concentração desejada (16×10^4 células/ml) aos tanques.

Para a análise do estágio de maturação dos animais foram realizadas cinco coletas por classe de tamanho de oito indivíduos tomados aleatoriamente de cada repetição. As coletas ocorreram entre 07 de maio a 31 de julho de 2008. Após a coleta procedeu-se a análise histológica como já descrita para o experimento de campo.

2.3 Análises estatísticas

No experimento de campo o desenvolvimento gonádico das ostras foi comparado utilizando teste t via permutação ao nível de 5% de probabilidade. Estimou-se a correlação linear simples entre a média do desenvolvimento gonadal dos animais e a salinidade e temperatura da

água do mar. O índice de desenvolvimento gonadal dos animais foi analisado através de análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey.

No experimento de laboratório, a comparação entre as médias do desenvolvimento gonadico das ostras foi realizada, também, utilizando teste t via permutação, dado que os mesmos não atendem as pressuposições estatísticas para testes paramétricos.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote computacional SAS® (2003).

3. RESULTADOS

3.1 Experimento de campo

A temperatura da água do mar variou de 16,1 a 26,6°C. As temperaturas, nos meses de inverno e primavera, tiveram o mesmo comportamento nos dois anos estudados, sendo os valores mais baixos registrados nos meses de junho a agosto, com média de $19,1 \pm 0,67^\circ\text{C}$, em 2008 e $17,68 \pm 0,94^\circ\text{C}$, em 2009. No mês de setembro ocorreram oscilações de temperatura com queda brusca da mesma, a qual voltou a subir gradativamente a partir de outubro, atingindo a máxima de $26,61^\circ\text{C}$ em março de 2009 (Figura 1).

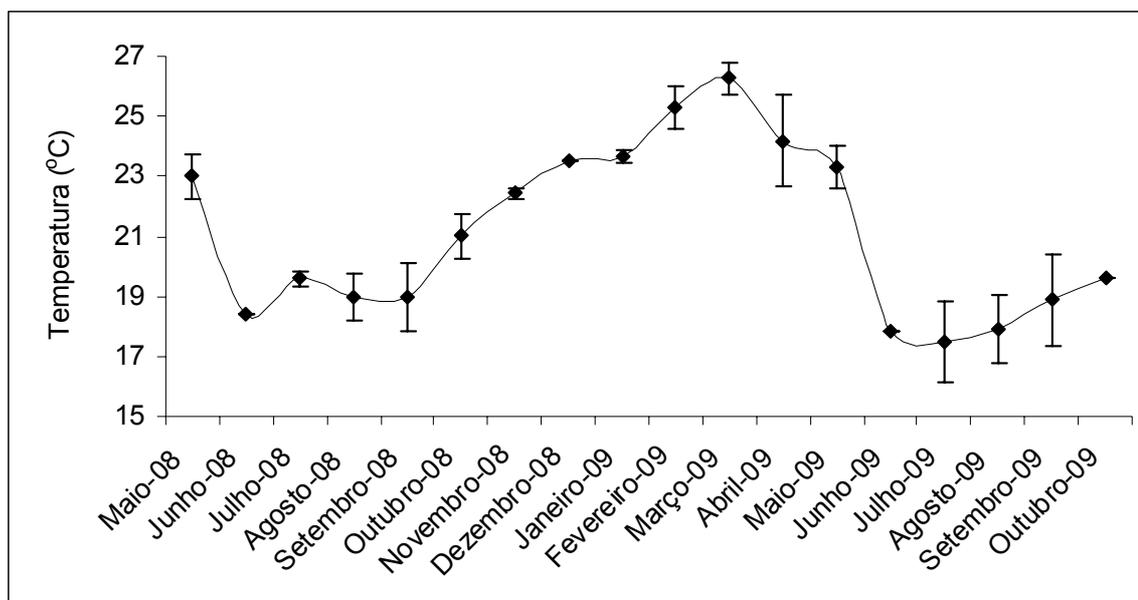


Figura 1 – Temperatura média da água do mar nos meses de coleta.

A salinidade média foi de $32,4 \pm 2,11\%$, com a média mínima de $21,7\%$ no mês de novembro de 2008, após o período de precipitação muito elevada e máxima de $34,1\%$ em fevereiro (Figura 2).

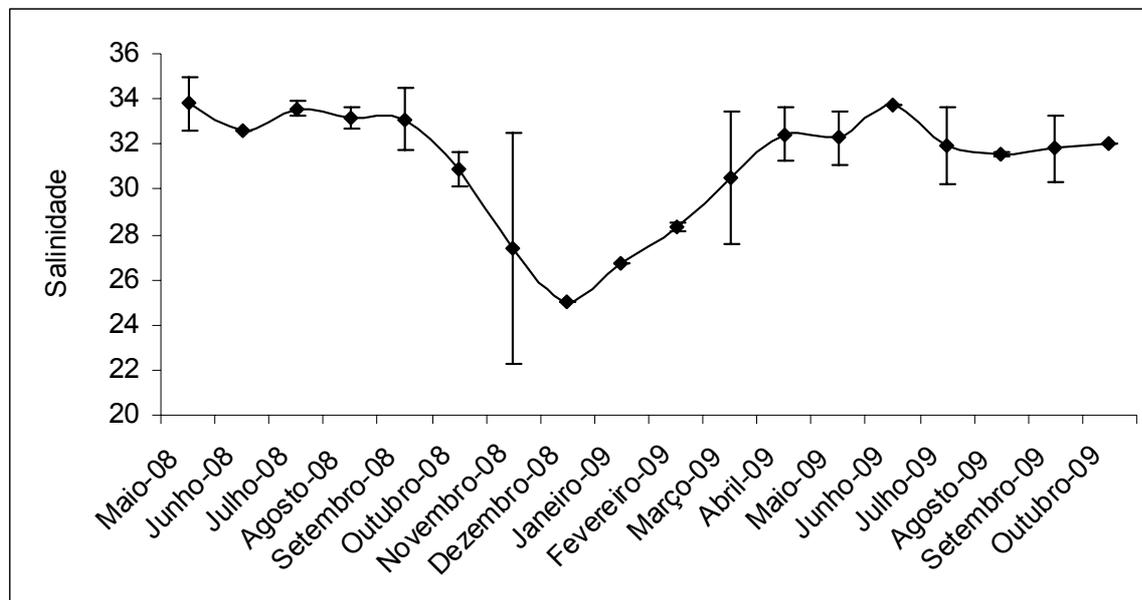


Figura 2 – Salinidade média da água do mar nos meses de coleta.

Nas análises histológicas das ostras do campo, houve predominância do estádio de repouso (0) nos meses de junho, julho e agosto, havendo diferença estatística ($P < 0,05$) apenas nos meses de julho, quando 100% das ostras encontravam-se neste estágio, em 2008, e 96,77% em 2009. Em agosto observou-se as primeiras ostras em pré-maturação (1). Nestes meses os estádios das ostras diferiram estatisticamente do mês de setembro, que apresentou um aumento significativo nas ostras em estágio de pré-maturação (87,5%), de outubro, em que parte das ostras entraram em maturação e de novembro, quando ocorreu a presença de ostras em diferentes estádios de desenvolvimento do tecido gonádico, com indivíduos maduros e, as primeiras desovas, ocorrendo no início de 2009 (Figura 3).

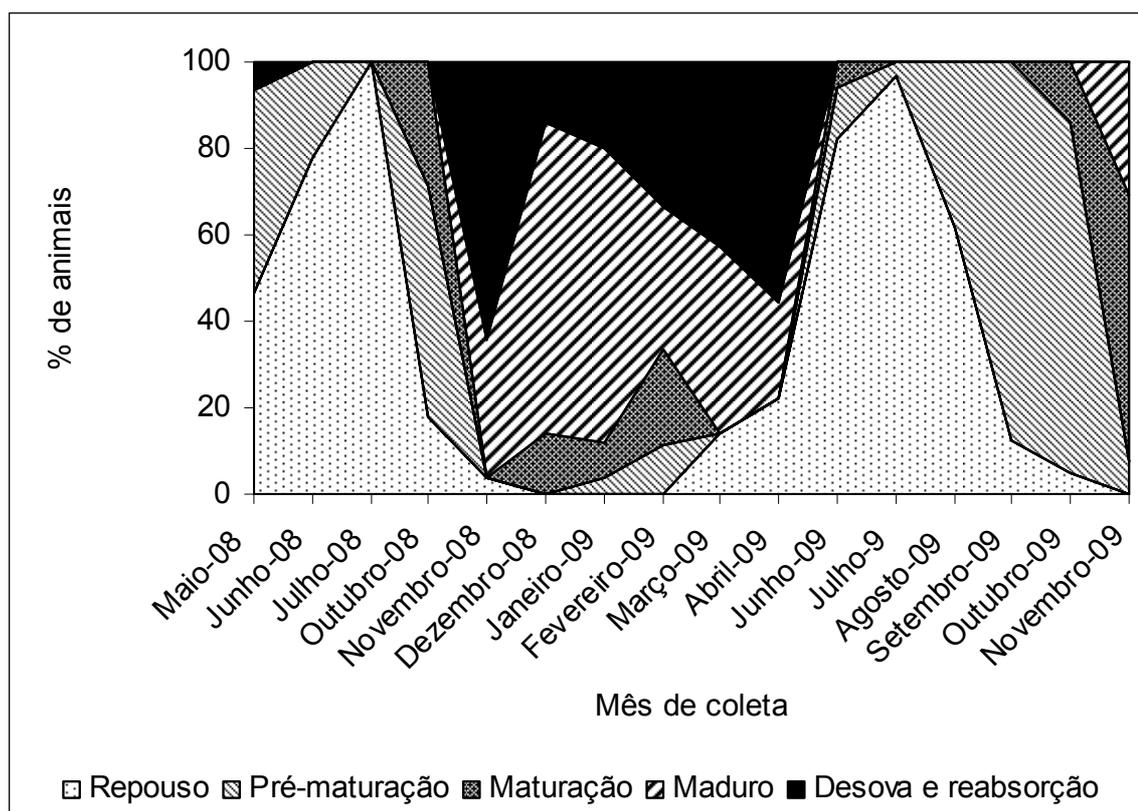


Figura 3 - Distribuição dos animais com diferentes condições de maturação gonadal ao longo do período de amostragem.

O estágio gonádico dos animais diferiu, significativamente, entre os meses de setembro e agosto de 2009, em que aproximadamente 40% dos indivíduos estavam no estágio de pré maturação. Porém, as ostras no mês de setembro não diferem das do mês de outubro, marcado pelo início dos indivíduos em maturação.

O estágio de maturação dos animais no mês de novembro diferiu ($P < 0,05$) de todos os outros. Neste mês apareceram os primeiros indivíduos maduros e, no decorrer do mesmo, os animais começam a apresentar sinais de desova. A maior quantidade de ostras maduras ocorreu nos meses de dezembro, janeiro e março; sendo que as desovas estiveram presentes de novembro a abril, havendo um pico em novembro e outro em abril. Durante os meses de dezembro a fevereiro, não foram encontradas ostras no estágio de repouso, sendo as mesmas presentes de forma crescente a partir de março, atingindo 14,28% do total.

Nas figuras 4 e 5 são apresentados cortes transversais de ostras nativas, *Crassostrea brasiliiana*, em diferentes estágios de desenvolvimento gonádico.

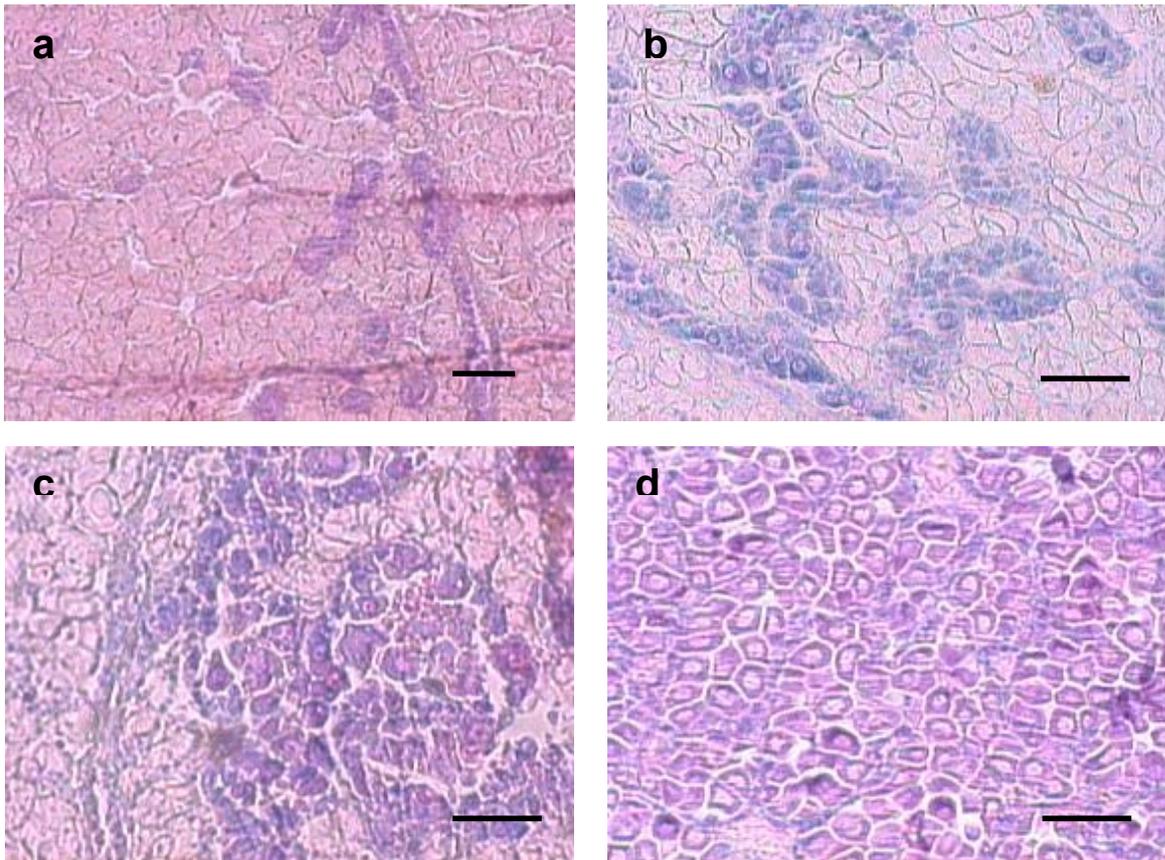


Figura 4 - Fotomicrografias do corte transversal da ostra nativa *Crassostrea brasiliana*, fêmeas em diferentes estádios do ciclo reprodutivo. (a) repouso; (b) pré-maturação; (c) maturação; (d) maduro. A barra representa 100 μ .

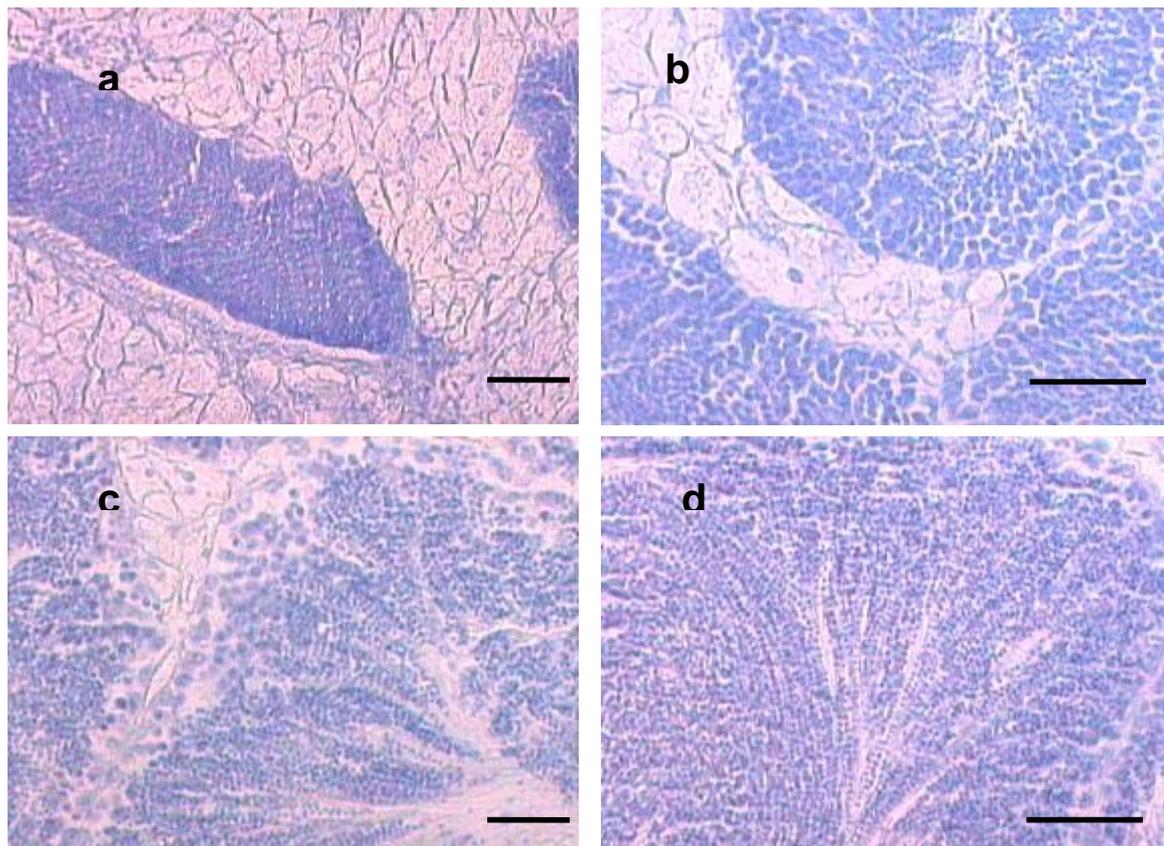


Figura 5 - Fotomicrografias do corte transversal da ostra nativa *Crassostrea brasiliana*, machos em diferentes estágios do ciclo reprodutivo. (a) repouso; (b) pré-maturação; (c) maturação; (d) maduro. A barra representa 50 μ .

Na Figura 6 é apresentado um corte transversal de um indivíduo hermafrodita simultâneo encontrado em uma ostra amostrada no mês de outubro que representou 0,29% da amostra.

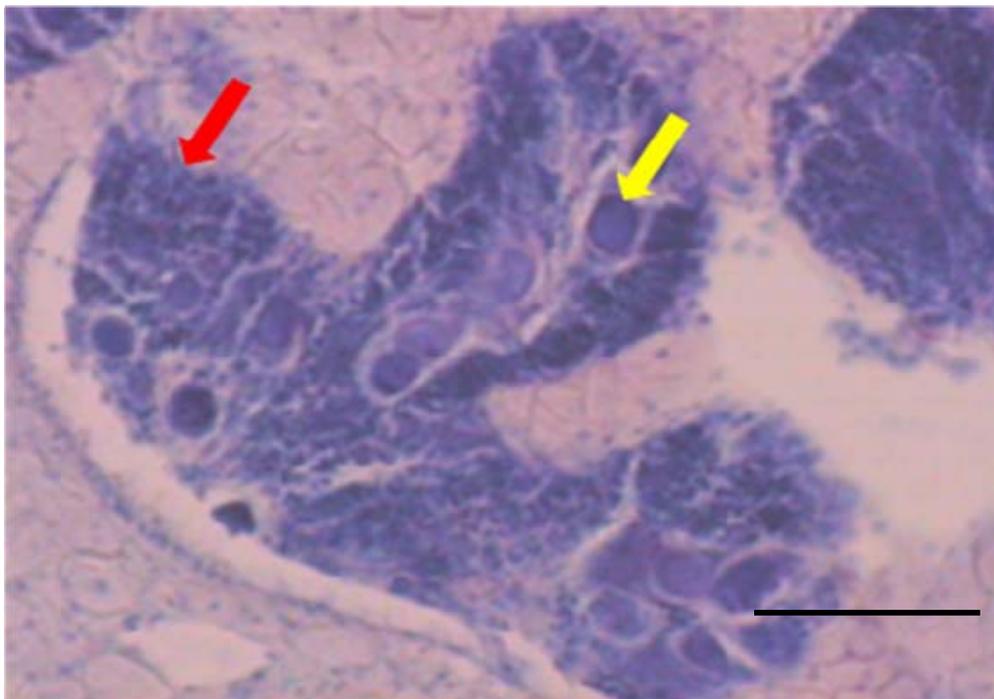


Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal de ostra nativa *Crassostrea brasiliana*, hermafrodita. Seta vermelha indica espermatócito e seta amarela indica ovócito. A barra representa 400 μ .

Houve associação positiva ($r=0,77$; $P<0,01$) entre o estágio de desenvolvimento gonadal das ostras e a temperatura, bem como associação negativa entre o estágio de desenvolvimento gonadal ($r=-0,56$; $P=0,042$) e salinidade da água do mar. O IC dos animais relacionou-se com a temperatura da água do mar sendo os maiores índices nos meses onde a temperatura da água do mar era mais quente. A partir do mês de julho os valores começaram a aumentar, com média de 13,0 (DP \pm 2,14) em 2008 e de 11,3 (DP \pm 2,21) em 2009, mês em que a grande maioria das ostras encontravam-se em repouso (Figura 7). Os valores foram crescentes durante as fases de gametogênese e, com o início da ocorrência de ostras no estágio maduro (novembro). Os animais apresentaram os maiores valores de IC no mês novembro, com média de 15,42 (DP \pm 2,3) e 16,40 (DP \pm 3,4), respectivamente, em 2008 e 2009, diminuindo a partir de janeiro, após as desovas de novembro e dezembro (Figura 7), chegando aos menores valores em abril, fim do período reprodutivo, onde a maior parte das ostras encontravam-se em desova ou reabsorvendo os gametas remanescentes. Houve diferença

estatística entre as médias de IC dos animais entre meses de janeiro-junho e os meses de outubro-dezembro.

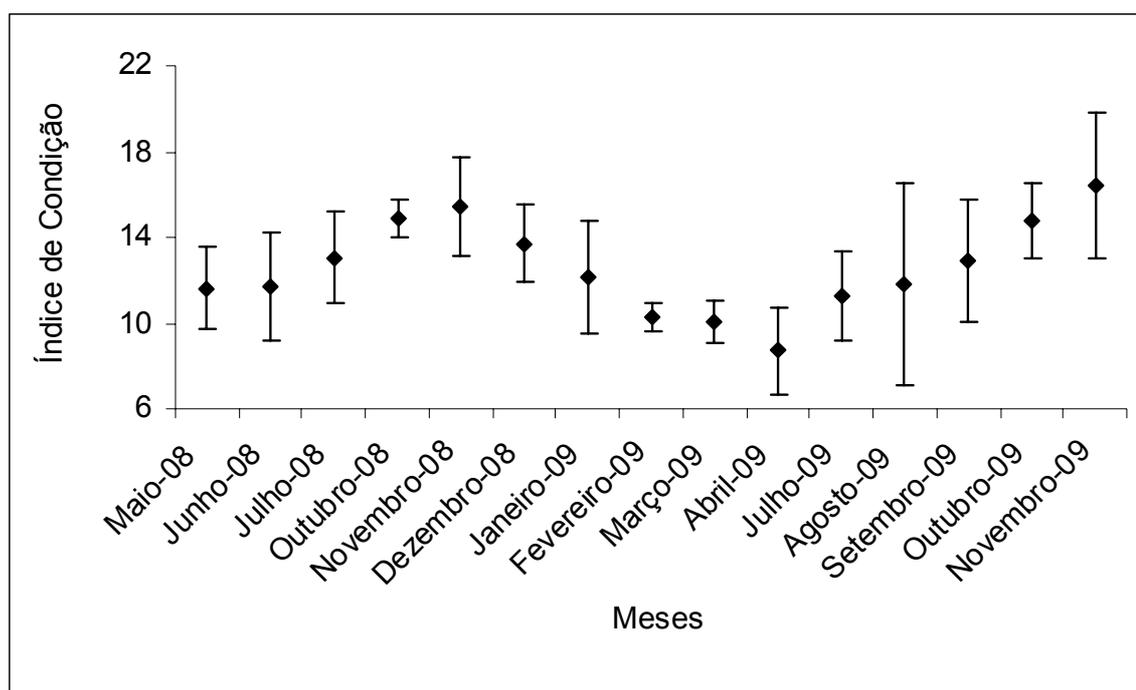


Figura 7 – Índice de condição médio das ostras ao longo dos meses de coleta

Na Figura 8 é apresentada a distribuição dos sexos dos animais ao longo dos meses e estágio de desenvolvimento gonádico, em que houve predominância de ostras fêmeas no estágio do ciclo reprodutivo maduro nos meses de novembro e dezembro de 2008, revertendo para 100% de machos das ostras maduras de janeiro de 2009.

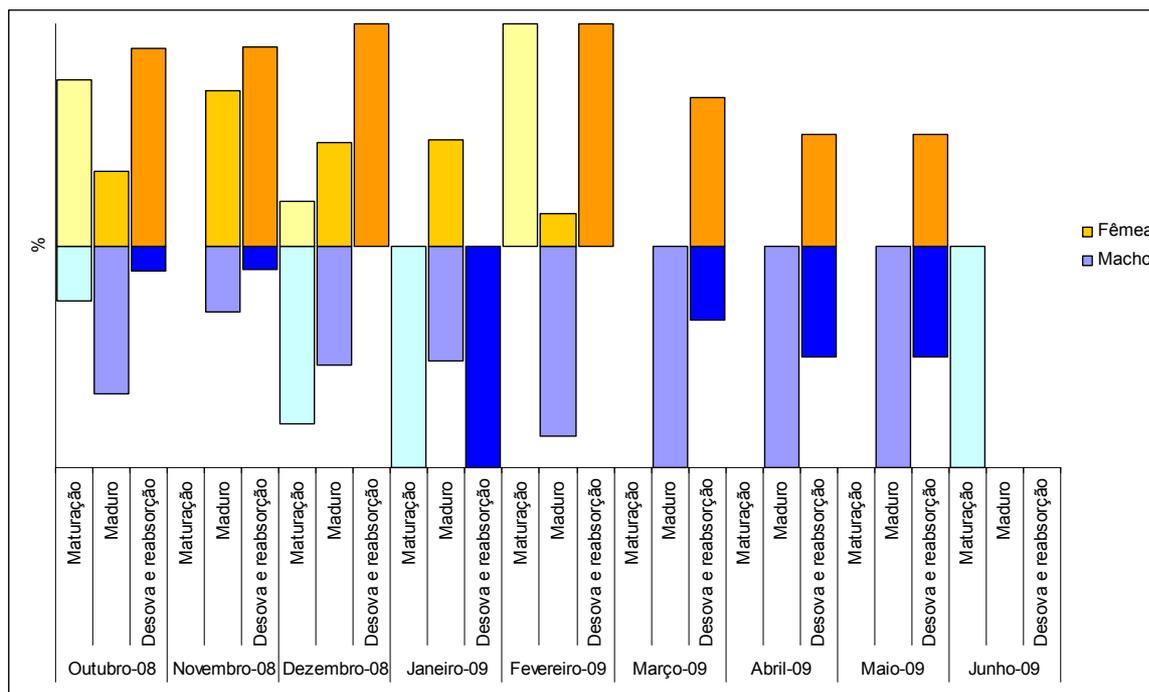


Figura 8 – Distribuição dos sexos dos animais ao longo dos meses e fases do ciclo reprodutivo.

3.2 Experimento de laboratório

A temperatura e a salinidade da água nos diferentes tratamentos em laboratório foram mantidas aproximadamente constantes durante os 78 dias do período experimental. Houve uma mortalidade inicial de 12% das ostras, que demoravam a fechar as valvas quando estimuladas durante a limpeza dos tanques. Observou-se que 100% destes animais estavam infestados por planárias. No início do experimento, as ostras encontravam-se em repouso e pré-maturação ou em absorção. Após 15 dias de condicionamento, 75% das ostras encontravam-se em pré-maturação, não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). No mês de junho, o tratamento de baixa salinidade apresentou a maior parte dos indivíduos em maturação (66,67%), enquanto que no tratamento de alta salinidade, os animais estavam distribuídos nos estádios de repouso (20%), pré-maturação (40%) e maturação (40%). No mês de julho houve diferença significativa entre os dois tratamentos, em que 45,31% das amostras do condicionamento em baixa salinidade já haviam maturado e encontravam-se no estágio de desova e reabsorção, enquanto que 19,3% no tratamento em alta salinidade os animais encontravam-se em desova e reabsorção e com 49,12% em repouso (Figura 9). Durante todo o período amostral não houve

diferença entre as classes de tamanho das ostras e o estágio do ciclo reprodutivo.

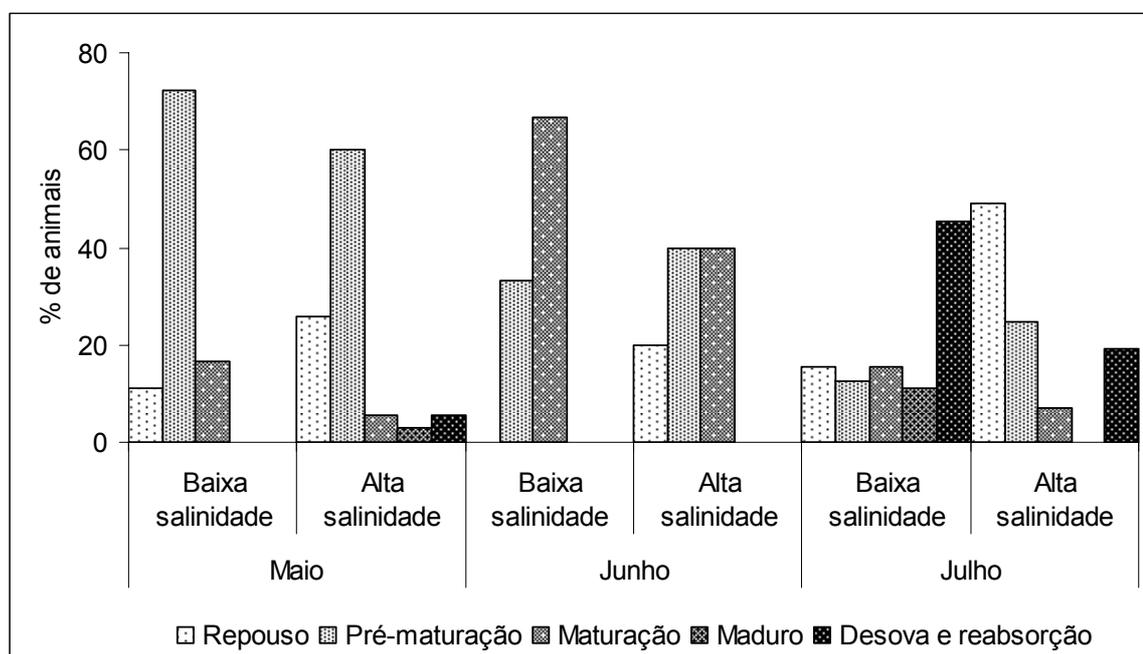


Figura 9 – Proporção de animais nas diferentes classes de maturação gonadal entre os tratamentos estudados.

4. DISCUSSÃO

4.1 Experimento de campo

O desenvolvimento reprodutivo em ostras se dá com a mudança das estações e conseqüentemente com o aumento da temperatura da água do mar. Com isso os períodos de gametogênese de uma mesma espécie em áreas geográficas distintas podem ser diferentes (Lannan et al., 1980). Observa-se em estudos realizados em diferentes localidades que, com o aumento da latitude aumenta também o tempo necessário, durante a gametogênese, para as células sexuais chegarem a maturidade (Mann, 1979). Shpigel (1989) estudando *C. gigas* em Israel, descreveu que o processo de gametogênese desta espécie é mais curto nesta localidade, cerca de 50 a 60 dias, assim como a idade da primeira maturação, 4 a 6 meses, do que os registrados em regiões mais frias.

No presente estudo, as ostras nativas apresentaram um período de gametogênese maior e bem definido, quando comparado aos resultados de Nascimento (1978), em estudo com ostras do mangue da espécie *C. rhizophorae* analisadas no estuário do rio Jacuruna, na Bahia (latitude

13°). Galvão et al. (2000), que estudaram a ostra nativa *C. brasiliiana*, na região de Cananéia, no estado de São Paulo, demonstraram que entre agosto a novembro de 1998, as ostras encontravam-se em todos os estádios de desenvolvimento gonádico, sendo que no mês de agosto a maior parte dos indivíduos estavam em pré-maturação. No presente trabalho, as ostras coletadas apresentaram estádios de desenvolvimento do tecido gonádico em épocas bem definidas. Em julho de 2008 e 2009, períodos em que se registraram as médias de temperatura mais baixas, quase a totalidade dos animais encontravam-se em repouso. No mês de agosto menos da metade das ostras coletadas estavam no estágio de pré-maturação e, somente em setembro de 2009, a maioria das ostras encontravam-se neste este estágio. Segundo Nascimento e Lunetta (1978) estes estádios são extremamente raros nas populações de ostra nativa do Nordeste, sendo mais frequentes as desovas parciais ao longo do ano, seguidas da fase de recuperação. Lenz (2008), em estudo da biologia reprodutiva de *C. rhizophorae* em dois ambientes da Baía de Camamu (BA), verificou que as ostras da espécie encontravam-se nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo durante todo ano. É provável que o ciclo reprodutivo das ostras nestas regiões esteja menos sujeito a influência das estações do ano do que os ambientes da região Sul e Sudeste, sendo mais suscetível a outros eventos ambientais, como o regime de chuvas. Observando os resultados pode-se inferir que, no cultivo na praia de Sambaqui, a espécie apresenta características de bivalves de região de clima temperado, onde ocorre o período de repouso bem definido durante as estações do ano que apresentam temperaturas mais baixa.

Os resultados das análises histológicas das ostras demonstraram que a gametogênese é mais intensa durante a primavera, com a presença de poucos estádios de desenvolvimento gonádico. Constatou-se, observando os dados de temperatura e análises histológicas, que as ostras começaram a ser encontradas no estágio de pré-maturação durante os meses em que a temperatura da água do mar encontrava-se próxima aos 18°C. Já os animais apresentando o estágio maduro, começaram a ocorrer durante o mês de outubro, quando a média da temperatura registrada estava acima de 20°C. Com a elevação da temperatura, no mês de novembro, até abril, ocorreram ostras maduras e desovas, sendo estes eventos mais constantes no início e fim deste período. Na região de Paranaguá, relatos baseados no recrutamento de ostras mostraram que o assentamento ocorre de setembro a abril, com picos em dezembro e em abril (ABSHER, 1989). Entretanto, Pereira et al. (1991) concluíram que

a desova da espécie em Cananéia, região próxima a Baía de Paranaguá, ocorre intensamente no período de novembro a maio e intermitentemente ao longo do resto do ano.

A proporção entre machos e fêmeas variou durante todo o período, sendo que os indivíduos que apresentaram o sexo indeterminado estiveram presentes no inverno e início da primavera. Christo (2006) verificou um equilíbrio na proporção sexual nas ostras coletadas, enquanto que Galvão et al. (2000) observaram a predominância de machos, com exceção de um dos pontos de coleta, que apresentou salinidade da água superior aos demais pontos e a predominância de ostras fêmeas, este fato pode ter influenciado na proporção sexual. A incidência de hermafroditas nas populações de *Crassostrea* é baixa, como encontrado no referido estudo. Galvão et al. (2000) observaram em 0,6% da população de *C. brasiliana*, resultado este corroborado por Nascimento (1978) e Lenz (2008), que obtiveram, respectivamente, 0,52 e 0,76% de ostras hermafroditas em *C. rhizophorae*.

Shpigel (1989) observou em *C. gigas* e em *Ostrea edulis*, que os machos se tornam maduros antes das fêmeas, fato este que pode ser explicado devido a demanda energética durante a vitelogênese. Na maturação das células sexuais há o sincronismo entre machos e fêmeas em relação aos períodos de eliminação e repouso (Nascimento e Lunetta, 1978). Tal fato foi verificado, também, em *C. virginica* (Kennedy e Battle, 1964).

Os indivíduos estudados tiveram o desenvolvimento sincrônico, isto é, com machos e fêmeas chegando a maturidade no mesmo momento, apesar de terem ocorrido em proporções distintas, diferentemente do observado nos estudos supracitados. Entretanto, foi observado que indivíduos machos, no estágio de maturação, onde já apresentavam espermatozoides formados, ocorrem antes do aparecimento de ostras apresentando ovócitos primários com a fase de vitelogênese finalizada. Galvão et al. (2000) analisando a distribuição de machos e fêmeas nos diferentes estádios entre os meses de agosto a novembro de 1998, verificaram que em agosto cerca de 70% dos indivíduos machos estavam em pré maturação e os restantes (30%) estavam nos demais estágios de desenvolvimento gonádico. Nos meses seguintes houve uma redução dessa porcentagem e aumento no número de animais em maturação e desova.

Existem diferentes metodologias para se estimar o índice de condição (IC). Autores como Galvão et al. (2000) basearam-se na

metodologia onde o peso da carne seca é dividido pelo peso total da ostra, não levando em conta o quanto da biomassa da carne seca pode ocupar no volume interno da concha.

No presente estudo, os maiores valores de índice de condição encontrados nos dois anos estudados foram nos meses de novembro. Estes resultados diferem daqueles relatados na literatura (Christo e Absher, 2006) onde no mesmo mês ocorreram os menores valores de IC, sendo os maiores valores observados no mês de maio. Os autores citados relataram que a reprodução dos animais foi contínua, o que pode explicar o fato dos resultados de IC obtidos por estes autores, diferirem dos resultados encontrados onde o período de repouso é bem definido. As análises histológicas demonstraram que os animais estavam em repouso em julho e começaram a apresentar sinais de desova apenas em novembro, onde encontramos animais maturando, maduros e começando a desovar e apresentar valores menores de IC. Outros autores (Nascimento, 1978; Nascimento e Pereira, 1980; Galvão, 2000; Christo e Absher, 2006), também verificaram que altos valores de IC coincidem com o período de gônadas maduras.

No mês de abril, em que foram constatados os menores valores de IC, as ostras se encontravam no fim do período de desova. Entre julho a setembro os animais passaram pelo período de repouso seguido da pré-maturação, com isso começando a formar reserva de glicogênio.

Dridi et al. (2007) pesquisando *C. gigas* encontraram altos valores de IC no inverno, período de inatividade sexual, durante o qual, as reservas são acumuladas nos tecidos das ostras, para serem utilizadas, principalmente, na gametogênese e diminuindo durante a desova. Em condições experimentais ostras da espécie *C. gigas* acomodadas em condições de inverno apresentaram alto IC, fato explicado pela ausência de desova (Fabioux et al., 2005).

4.2 Experimento de laboratório

Os animais condicionados em laboratório logo diferenciaram dos mantidos em campo. Após 15 dias de condicionamento, mais da metade da quantidade de ostras amostradas encontravam-se em pré-maturação, enquanto que no campo os animais regrediram seu estágio de desenvolvimento, com quase a metade das ostras amostradas na fase de repouso. Apesar de não apresentar diferença significativa entre os tratamentos, no mês de junho, as ostras mantidas em baixa salinidade

apresentaram um desenvolvimento gonádico superior, com a maior parte dos animais amostrados no estágio de maturação enquanto que em alta salinidade apenas 40% dos animais encontravam-se neste estágio. Entre as ostras mantidas em campo, a maior parte estava em repouso. Ao fim do experimento os tratamentos apresentaram diferença significativa, em que o regime de baixa salinidade (24‰) apresentou ostras nos diferentes estágios de desenvolvimento com 10,9% maduras e 45,3% em desova e reabsorvendo. Na condição de salinidade alta (34‰), 19,3% das ostras estavam desovando ou reabsorvendo enquanto que 49,1% estavam em repouso. Dentre os diversos fatores ambientais que interferem na gametogênese, a temperatura e a alimentação desempenha um papel fundamental (Chávez-Villalba, 2001; Chávez-Villalba et al., 2002a; Chávez-Villalba et al., 2002b, Chávez-Villalba et al., 2003).

O experimento teve início na época em que as ostras apresentaram menores valores de índice de condição (IC) e, conseqüentemente, ausência de material de reserva. Entretanto as condições de laboratório permitiram o desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas, com produção de gametas. Segundo os autores Gallager e Mann (1986), a interrupção do ciclo reprodutivo no ambiente natural, através do condicionamento em laboratório, mediante a elevação da temperatura, pode forçar o desenvolvimento de gametas antes da ocorrência de etapas importantes, como a formação de reserva de glicogênio, geralmente usada pelos bivalves na síntese de lipídeos durante a vitelogênese. Devido a este fato, o período em que é realizado o condicionamento, reflete na qualidade dos gametas, na viabilidade e sobrevivência larval (Lannan et al., 1980). O estímulo da gametogênese e maturação de reprodutores oriundos do campo é um procedimento utilizado por laboratórios de produção de sementes de moluscos durante o período de inverno e início da primavera, época em que o molusco apresenta a reserva formada. Este fato demonstra a importância da determinação da época ideal para se obter reprodutores do ambiente natural, e o desenvolvimento de diferentes técnicas de condicionamento para se obter reprodutores capazes de produzir gametas que permitam o desenvolvimento de larvas aptas a produção de sementes de ostra.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do ciclo reprodutivo das ostras nativas, da espécie *C. brasiliiana*, é influenciado positivamente pelo aumento da temperatura e pela diminuição da salinidade da água do mar.

A espécie é considerada de clima tropical e, no local de estudo, apresenta o ciclo reprodutivo diferente de populações estudadas em menores latitudes, por apresentar os estádios de desenvolvimento gonádico bem definidos durante a primavera e período de repouso sexual no inverno.

Durante os meses de agosto e setembro, as ostras encontram-se no estágio de pré maturação, em outubro no estágio maturando, e animais maduros e em desova nos meses de novembro e dezembro.

Os animais apresentaram os maiores valores do índice de condição no mês de novembro, regredindo com a ocorrência de eliminação de gametas.

O condicionamento em laboratório, através da elevação da temperatura, permite o desenvolvimento reprodutivo a partir de ostras com baixo índice de condição, sendo que, o regime de salinidade baixa (24‰) mostrou-se mais adequado a maturação dos animais em laboratório.

O condicionamento de reprodutores em laboratório mostra ser uma alternativa viável para a obtenção de gametas, fora da época em que ocorre no ambiente natural, entretanto necessita-se de maiores estudos para verificar a viabilidade dos gametas em produzir larvas aptas a gerar sementes.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e ao CT-HIDRO/CT-AGRO/MCT/SEAP-PR/FINEP pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSHER T.M. Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná- Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo, 1989,185p.
- BARBER.B.J., BLAKE, N.J.,1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 378–428.
- CHÁVEZ-VILLALBA, J.;MINGANT C.; COCHARD, J. C.; LE PENNEC, M. 2001. Gametogenese chez l’huitre *Crassostrea gigas* de l’Aber Benoît (Bretagne, France), a’ la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis*, 30,1–12.
- CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214, 115–130.
- CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 22, 721-731.
- 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. Curitiba, Tese (Doutorado em Zoologia) Universidade Federal do Paraná.
- CHRISTO,S., W.; ABSHER, T., M. Reproductive Period of *Crassostrea Rhizophorae*(GUILDING, 1828) and *Crassostrea Brasiliana*(LAMARK , 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná Brazil. *Journal of Coastal Research*, 2006, Special Issue 39, 1215 a 1218.
- CROSBY, M.P., GALE, L.D., 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res.* 9, 233–237.
- DINAMANI, P., 1974. Reproductive cycle and gonadial changes in the New Zealand rock oyster *Crassostrea glomerata*. *N.Z. J. Mar. Freshwater Res.* Vol. 8, pp. 39–65.

- DRIDI, S., SALAH ROMDHANE, M., ELCAFSI, M.H., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263, 238–248.
- FABIOUX, C.; HUVET, A.; SOUCHU, P. L.; PENNEC, M. L.; POUVREAL, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458-470.
- GALLAGER S.M., MANN R., 1986, Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56, 105-121
- GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica*. *Fish. Bull.*, v.64, p.1-480,1964.
- GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C. & HENRIQUE, M.B. 2000. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliana* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25°S; 48°W). *B. Inst. Pesca*, 26 (2):147-162.
- GOSLING, Elizabeth. 2003. Bivalve molluscs: Biology, ecology and culture. 1^a ed. Oxford: Fishing News Books, 443p.
- KENNEDY, A. V.; BATTLE, H. I. 1964. Cyclic changes in the gonad of the american oyster, *Crassostrea virginica* (GMELIN). *Canadian Journal of Zoology*. Vol.42
- LANGO-REYNOSO, F., CHAVEZ-VILLALBA, J., COCHARD, J.C., LE PENNEC, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190, 183– 199.
- LANNAN, J.E., ROBINSON, A.K., BREESE, W.P., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture*, 21, 337–345.
- LAWRENCE, D.R.; SCOTT, G.I., 1982. The Determination and Use of Condition Index of Oysters. *Estuaries* 5: 23-27.

- LAZOSKI, C. 2004. Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea* spp.) Rio de Janeiro, 2004. Tese (Doutorado em genética) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- LOOSANOF V.L. and DAVIS H.C. (1951) Delaying spawning of lamellibranchs by low temperature. *Journal of Marine Research* 10, 1–29.
- LANGO REYNOSO, F., CHAVEZ-VILLABA, J., COCHARD, J.C., LE PENNEC, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-199.
- LENZ, T. de 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). Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual de Santa Cruz. em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia. 45f.
- MANN, R., Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biology Assoc. U.K.*, vol 59, p. 95-110. 1979.
- MURANAKA, M. S. & LANNAN, J. E. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*. V.39, p. 217-228.
- NASCIMENTO, I. A.; LUNETTA, J. E. 1978. Ciclo sexual da ostra do mangue e sua importância para o cultivo. *Boletim Fisiologia Animal*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2: 63-98.
- NASCIMENTO, I. A. 1978. Reprodução da ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) Tese de doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; São Paulo, 200p.
- NASCIMENTO, I. A. 1983. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. *Ciência e Cultura* 35: 871-876.
- NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S. A. Changes on the condition index for mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from Todos os Santos Bay, Salvador, Brazil. *Aquaculture*, n. 20, p. 9-15, 1980.

- NORMAND, J.; LE PENNEC, M.; BOUDRY, P. 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*, 282, 124-129.
- PERDUE, J.A.; BEATTIE, J.H.; CHEW, K.K. 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research*, 1(1), 9-16.
- PEREIRA, O.M.; GALVÃO, M.S.N.; TANJI, S. 1991. Época e método de seleção de sementes de ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) no complexo estuarino-lagunar de Cananéia, Estado de São Paulo (25° S; 48° W). *Boletim do Instituto de Pesca*, 18 (único): 41-49.
- PEREIRA, O. M.; et al., 2001. Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (25° S, 48° W). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27(2) 163 – 174.
- PEREIRA, O.M. ; AKABOSHI, S.; CHAGAS SOARES, F. das 1988 Cultivo experimental de *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) no Canal da Bertioga, São Paulo (23°54'30"S; 44°13'42"W). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 15(1): 55-65.
- PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO I.C., 2003. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo 29(1) 19 – 28.
- QUAYLE, D.B. & NEWKIRK, G.F., 1989. Farming Bivalve Molluscs: methods for study and development. The World Aquaculture Society, Louisiana, 294pp.
- QI LI, OSADA, M.; MORI, K. 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science*, 66, 502-508.
- 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*, vol. 65 n°2.

- RUIZ, C. et al. 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 155, 249–262.
- SAS Institute Inc. 2003. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SHAW, B.L. & BATTLE H.I. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa, 35: 325-347.
- SHPIGEL, M. 1989. Gametogenesis of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in warm water in Israel. *Aquaculture*, Volume 80, Issues 3-4, 1, p. 343-349.
- STEELE, S.; MULCAHY, M. F. 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal Marine Biology Association United Kingdom*, 79, 673–686.
- UTTING, S. D. & MILLICAN, P.F. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. v.155, 1997. p.45-54.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABSHER, T.M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná- Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento.** 185f. Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo, 1989.

ALVAREZ, I.F. Reproduccion y acondicionamiento de bivalves em el criadero. ALVA, A. **Conselleria de pesca, marrisqueo e acuicultura.** Xunta de Galicia Coruña, Espana. v.16, p. 3-35, 1991.

CHÁVEZ-VILLALBA, J.; MINGANT C.; COCHARD, J. C.; LE PENNEC, M. Gametogenese chez l’huitre *Crassostrea gigas* de l’Aber Benoit (Bretagne, France), a’ la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis*, 30, 1–12. 2001.

CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214, 115–130. 2002.

CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. Influence of timing of broodstock collection on conditioning, oocyte production, and larval rearing of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), at six production sites in France. *Journal of Shellfish Research*, 22, 465-474. 2003a.

CHÁVEZ-VILLALBA, J. et al. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 22, 721-731. 2003b.

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

CHRISTO, S., W.; ABSHER, T., M. Reproductive Period of *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (LAMARK, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná Brazil. *Journal of Coastal Research*, Special Issue 39, 1215-1218. 2006.

COE, W. Sexual phases in the American oyster (*Ostrea virginica*). *Biol. Bull.*, 63: 419-441. 1932.

COSTA, L. C. de O.; de ALCÂNTARA NETO, C. P. Bio-ecologia da ostra *Crassostrea rhizophorae* no litoral Atlântico Paranaense. In: **AQUACIÊNCIA. Anais do I Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**. Vitória, Espírito Santo p. 131. 2004.

DINAMANI, P. Reproductive cycle and gonadial changes in the New Zealand rock oyster *Crassostrea glomerata*. *New Zealand Journal Marine Freshwater Research*. 8: 39–65. 1974.

DINAMANI, P. Gametogenic Patterns in populations of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, in Northland, New Zealand. *Aquaculture*, 64, 65-76. 1987.

EBLE, A. F.; SCRO, R. In: **The Eastern Oyster, *Crassostrea virginica***. V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, and A. F. Eble, eds. Maryland Sea Grant College Publication UM-SG-TS-96-01. Pp. 25–30. 1996.

FABIOUX, C. et al. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250, 458-470. 2005.

FAIRBRIDGE, R.W. The estuary: its definition and geochemical role. In: Olausson, E. e Cato, I., (Eds). **Chemistry and Geochemistry of Estuaries**. New York, pp 1-35, 1980.

FAO. THE STATE OF WORLD'S FISHERIES AND AQUACULTURE 2004. FAO Information Division. Rome Italy, 2008. Disponível em: http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm. Acessado em: 16 nov. 2009.

FERNANDES, L.M.B. Aspectos fisio-ecológicas do cultivo da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828). Influência da salinidade. São Paulo; USP, 1975. (Tese de Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 81p. 1975.

FREITAS, R. R. de; BARROSO, G. F. Conflitos de uso dos recursos costeiros: Desafios para sustentabilidade do cultivo de moluscos. *Caderno Virtual de Turismo*, Brasil, 20, 43-50. ,2006.

- GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica*. Fish. Bull., v.64, 480p.,1964.
- GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUE, M.B. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliiana* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25°S; 48°W). *Boletim Instituto de Pesca*, 26 (2):147-162. . 2000.
- GOSLING, E. **Bivalve molluscs: Biology, ecology and culture**. 1ª ed. Oxford: Fishing News Books, , 443p. 2003.
- GUIMARÃES, I.M.; ANTONIO, I.G.; PEIXOTO, S.; OLIVEIRA, A. Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae*. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 41(1): 118-122. 2008.
- GUZENSKI, J. **Comparação do efeito da salinidade e concentração de substâncias húmicas no crescimento de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)**. Dissertação de mestrado em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 101f.1996.
- IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros. Estatística da Pesca, 2007. 2007, 151 p.
- IGNACIO, B. L; ABSHER, T. M.; LAZOSKI, C.; SOLÈ-CAVA, A. M. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology* v136, p.987-991, 2000.
- IMAI, T.. Aquaculture in Shallow seas; Progress in Shallow Sea Culture. Balkema/ Rotterdam, part II, p 115-181, 1982.
- KENNEDY, A. V.; BATTLE, H. I. Cyclic changes in the gonad of the american oyster, *Crassostrea virginica* (GMELIN). *Canadian Journal of Zoology*, 42. 1964.
- 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. *Biol Bull* 202: 232-242, 2002.

- LAZOSKI, C. **Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea spp.*)** Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em genética) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- LE DANTEC, J. Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* LMK) dans le bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. *Rev. Trau. Inst. Pêches Mavit.*, 32 (3) : 241-361 (thèse Fac.Sci. Bordeaux, 5 juillet 1967, n° 51). 1968.
- LANGO REYNOSO, F. et al. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190, 183-199. 2000.
- LEMOS, M.B.N.; NASCIMENTO, I.A.; ARAUJO, M.M.S; PEREIRA, S.A; BAHIA, I.; SMITH, D.H. The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *Journal os Shellfish Research*, 13.(1), 187-192. 1994.
- LENZ, T. de M. Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA). Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual de Santa Cruz. em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia. 45f. 2008.
- LIMA, F. R.; VAZZOLER A. E. A. de M. Sobre o desenvolvimento das ostras e possibilidade da ostreicultura nos arredores de Santos. *Boletim do Instituto Oceanográfico USP* 13: 3-20, 1963.
- LITTLEWOOD, D. T. J.; GORDON, C. M. Sex ratio, condition and glycogen content of raft cultivated mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae*. *Journal of Shellfish Research*, 7 (3), 395-399. 1988.
- LOOSANOFF, V. L. Seasonal gonadal changes in the adult oysters, *Ostrea virginica*, of Long Island Sound. *Biol. Bull.* 83: 195-206. 1942.
- MACHADO, I. C.; MAIO, F. D. de; KIRA, C. S.; CARVALHO, M.de F. H. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliiana* do estuário de Cananéia-SP, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 61(1), 13-18, 2002.

MANN, R., Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal Marine Biology Association*. United.Kington, 59, 95-110. 1979.

MORALES, J. C. Acuicultura Marina Animal. Madrid: Mundi Prensa, 670p. 1991.

NASCIMENTO, I.A. **Reprodução da ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828)**. Tese de doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; São Paulo, 200p. 1978.

NASCIMENTO, I. A.; LUNETTA, J. E. Ciclo sexual da ostra do mangue e sua importância para o cultivo. *Boletim Fisiologia Animal*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2: 63-98. 1978.

NASCIMENTO, I.A. Desenvolvimento da gônada primária em ostras de mangue *Crassostrea rhizophorae*: Idade e tamanho mínimos de maturação sexual. *Ciência e Cultura*, 32(6), 736–742. 1980.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S. A. Changes on the condition index for mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from Todos os Santos Bay, Salvador, Brazil. *Aquaculture*, 20: 9-15, 1980.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: Problemas e perspectivas. *Ciência e Cultura*, 35(7) : 871-876. 1983.

NASCIMENTO, I.A.; MIRAGLIA, T. Dados histoquímicos sobre as gônadas de ostras do mangue *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1928. *Ciência e Cultura*, 35 (10), 1496–1501, 1983.

NASCIMENTO, I.A. Biological characteristics of mangrove oysters in Brazil as a basis for their cultivation: a review of reproductive cycles and growth. In: *Oyster culture in the Caribbean*, 17-33. 1990.

NORMAND, J.; LE PENNEC, M.; BOUDRY, P. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in na estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*, 282, 124-129. 2008.

OLIVERA, A.; GUIMARÃES, I. Shrimp farming effluent treatment using the “native oysters” *Crassostrea rhizophorae* (GUILDIN, 1828) in Rio Formoso Community – PE, Brail. In: World Aquaculture Society, Salvador, Bahia. Book of Abstract 2. p.538. 2003.

PERDUE, J.A.; BEATTIE, J.H.; CHEW, K.K. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research*, 1(1), 9-16. 1981.

PEREIRA, O. M.; et al. Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (25° S, 48° W). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 27(2) 163-174, 2001.

PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; FACUNDES, L. Viabilidade da criação de ostra *Crassostrea gigas* no litoral das regiões sudeste e sul do Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, 26(1) 7-21. 1998.

PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO I.C. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de cananéia, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo 29(1) 19 – 28. 2003.

PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B.; GALVÃO, M.S.N. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) em manguezal do estuário de Cananéia, SP (025°S; 048°W). *Boletim do Instituto de Pesca*, 26 (2):147-162. 2000.

PEREIRA, O. M.; SOARES, F. C. Análise da criação de ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), no sítio de Guarapari, na região lagunar-estuarina de Cananéia-SP. *Boletim do Instituto de Pesca*, n. 23, 135-142, 1996.

PEREIRA, O.M. Ostreicultura: situação atual e contribuição do Instituto de Pesca para o seu desenvolvimento. In: H.L.STEMPNIIEWSKI (ed.). *Retrospectiva dos Serviços de Pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento e O Jubileu de Prata do Instituto de Pesca*. São Paulo, Instituto de Pesca, Coordenadoria da

Pesquisa Agropecuária, Secretaria de Agricultura e Abastecimento.. 119-124, 1997.

PERILLO, G. M. E. Definition and geomorphologic classifications of estuaries. In: PERILLO, G. M. E. *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries, Development in Sedimentology* vol. 53, Amsterdam. p. 17–47, 1995.

PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*, Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. *Aquaculture Research*. 37, 1598-1600, 2006.

QI LI, OSADA, M.; MORI, K. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science*, 66, 502-508. 2000.

QUAYLE, D.B. Tropical oysters: Culture and Methods. Ottawa, IDRC, 80p, 1980.

QUAYLE, D.B. Pacific oyster culture in British Columbia. *Canadian Bulletin of Fisheries*. aquat. sci., 218: 1-124, 1988.

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

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

RIOS, E. **Compedium of brazilian seashells of Brazil**. Rio Grande: Fundação Cidade do Rio Grande, 2009.

ROBINSON, A. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg).I. Efects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *Journal of Shellfish Research* , 11, 437-441. 1992.

RUIZ, C. et al. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. ***Journal of Experimental Marine Biology and Ecology***, 155, 249–262. 1992.

SANTOS, A. E.; NASCIMENTO, I. A. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). **Elsevier Science Publishers**, 47, p. 335-352. 1985.

STEELE, S.; MULCAHY, M. F. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal Marine Biology Association United Kingdom*, 79, 673–686. 1999.

SAS Institute Inc. 2003. SAS OnlineDoc® 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

WALNE, P. F. *Culture of Bivalve Molluscs, 50 years Experience at Conwy*. Fishing News Books, 173p. 1972.