



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

LEONARDO SABIN HAUSEN

**RELAÇÃO ENTRE CICLO REPRODUTIVO, EFICIÊNCIA DA DESOVA E
PRODUÇÃO DE LARVAS DO MEXILHÃO *Perna perna*(L.)
EM LABORATÓRIO**

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

Orientador: Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira

Florianópolis

2006

Hausen, Leonardo Sabin

Relação entre ciclo reprodutivo, eficiência da desova e produção de larvas do mexilhão *Perna perna* (L.), em laboratório.. - - Florianópolis, 2005.

Dissertação (Mestrado) – Prof. Orientador: Dr. Jaime Fernando Ferreira- -Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

Bibliografia.

1. Reprodução em Laboratório 2. Estádios sexuais 3. Histologia 4. Índice de Condição 5. *Perna perna*.

Relação entre ciclo reprodutivo, eficiência da desova e produção de larvas do mexilhão *Perna perna* (L.), em laboratório

Por

LEONARDO SABIN HAUSEN

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Jaime Fernando Ferreira - *Orientador*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dr. Guilherme Sabino Rupp

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ANEXOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
APRESENTAÇÃO	1
ARTIGO	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
REULTADOS E DISCUSSÃO	12
CONCLUSÕES.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA APRESENTAÇÃO.....	29
ANEXOS (NORMAS DE PUBLICAÇÃO).....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quantidade relativa de mexilhões <i>Perna perna</i> , nos estádios IIIA, IIIB e IIIC do ciclo reprodutivo, provenientes de cultivo	21
Figura 2: Valores de Índice de Condição para <i>Perna perna</i> em Santa Catarina, referentes ao período de junho de 2003 a maio de 2004	22
Figura 3: Porcentagem de animais que responderam aos estímulos à desova com a eliminação de gametas (F= fêmeas; M= machos)	25
Figura 4: Média de ovócitos eliminados por fêmea que respondeu à indução ...	26
Figura 5: Quantidade relativa de larvas “D” formadas 24 horas após a fecundação, em relação ao número de ovócitos liberados	28
Figura 6: Aspecto do cortes histológicos do tecido gonádico de mexilhões (coloração HE) em diferentes estádios macroscópicos IIIA, IIIB e IIIC do ciclo sexual. Em A, B e C (Fêmeas) e D, E e F (Machos) – a barra representa 100 μ m	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Normas de Publicação	41
-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

IC	Índice de condição
Ton.	Tonelada
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos
U.V.	Ultravioleta
μ m	Micrômetro
L	litro
mL	mililitros
%	porcentagem
H	hora

RESUMO

Atualmente o estado de Santa Catarina é o maior produtor brasileiro de mexilhão *Perna perna* cultivado, com mais de 90 % da produção. A atividade, apesar de recente, demonstrou um crescimento exponencial de 1990 até o ano 2000 quando alcançou a produção com 12.000 ton., se mantendo neste patamar. A estabilização na produção está intimamente relacionada com questões ligadas à obtenção de sementes. A dificuldade de captação do ambiente natural e as restrições legais impostas para obtenção das mesmas, juntamente com a falta de planejamento e a falta de colocação de coletores artificiais não proporcionam a sustentabilidade e a garantia que o sistema produtivo requer. Com o objetivo de contribuir para a produção de sementes em laboratório e a sustentabilidade do cultivo, este trabalho avaliou a eficiência de indução à desova e produção de larvas D em *Perna perna*, relacionando-as a análises macroscópica e microscópica do ciclo sexual e ao índice de condição (peso seco das partes moles x 100 / peso total – peso seco da concha). No período de junho de 2003 a junho de 2004 foram realizadas 11 induções à desova, nas quais se observou resposta positiva superior a 50% dos animais induzidos nos meses de junho, julho e novembro de 2003 e maio de 2004. Os valores obtidos para o índice de condição variaram de 7,15 a 12,39 sendo que, nos meses citados acima, os valores foram superiores a 9. O número de ovócitos por fêmea variou de 3.750.000 a 17.771.810 e a formação de larvas “D” foi superior a 50%, exceto nos meses de setembro de 2003 e janeiro de 2004. A maior porcentagem foi de 86%, obtida no mês de maio de 2004. As análises histológicas do tecido gonádico indicaram repleção de gametas coincidente com a determinação macroscópica do ciclo e com as épocas de melhor indução à desova. Estes resultados demonstram que o mexilhão *Perna perna* possui um excelente potencial para reprodução em laboratório, durante praticamente o ano todo, sem necessidade de maturação em laboratório. Além disso, períodos de maior eficiência reprodutiva e de indução à desova que podem ser definidos por uma avaliação conjunta do aspecto macroscópico com o índice de condição, que trazem grande economia e eficiência para a produção em laboratório.

ABSTRACT

The State of Santa Catarina is actually the largest Brazilian producer of the cultivated mussel *Perna perna*, with more than 90% of the production. This activity, although it be recent, showed an exponential growth from 1990 to 2000, when it reached the productions of 12,000 metric tons. and kept in this level. The stabilizing in the production is closely related to questions linked to obtain seeds. The difficulty and the legal restrictions for natural seed capture, associated to the lack of planning and the use of artificial collectors do not give the sustenance and the guarantee that the productive system requires. With the objective to contribute to seeds production in laboratory and the sustenance of the cultivation, this work evaluated the efficiency of induction to the spawning and to the production of D larvae in *Perna perna*, relating them to macroscopic and microscopic analysis of the sexual cycles and to the condition index (dry weight of the soft parts x 100 / total weight-dry weight of the shell). In the period from June, 2003 to June, 2004 eleven spawning inductions were made, and it was observed a positive answer superior to 50% of the animals, in the months of June, July and November, 2003 and May, 2004. The values obtained for the condition index varied from 7,15 to 12,39 and in the months mentioned above, the values were superior to 9. The number of eggs per female varied from 3,750,000 to 17,771,810 and the formation of "D" larvae was higher than 50%, except in the months of September, 2003 and January, 2004. The higher percentage was 86% and it was obtained in May, 2004. The histology analysis of the gonad tissue indicated gametes repletion coincident with the macroscopic determination of the cycle and with the times of better induction to the spawning. These results shows that the mussel *Perna perna* has an excellent potential for reproduction in laboratory during almost the whole year, without laboratory maturation. In addition, periods of higher reproductive efficiency and spawning induction can be defined by a combined evaluation of the macroscopic aspect with the condition index that bring great economy and efficiency for the laboratory production.

APRESENTAÇÃO

Na Europa, o cultivo de mexilhões, também denominado Mitilicultura, começou como atividade comercial organizada na Espanha por volta de 1940 (ANDRÉU, 1976) e, segundo Ferreira & Magalhães (2004), expandiu-se pela Europa (França, Holanda e Itália), Ásia (China e Tailândia), Oceania (Nova Zelândia) e na América do Sul (Venezuela, Chile e Brasil).

Atualmente o cultivo de moluscos tem um papel importante na indústria aquícola, com uma contribuição de 22% da produção total mundial, sendo que o mexilhão corresponde a 40% do total de moluscos cultivados (FERREIRA & MAGALHÃES, 2004). Segundo Gosling (2002) a China figura como maior produtor mundial, com a produção de 608.115 ton./ano principalmente da espécie *Perna viridis*. Em segundo lugar está a Espanha produzindo cerca de 260 mil ton./ano de mexilhões principalmente da espécie *Mytilus galloprovincialis*. Na Itália, a produção gira em torno de 130.000 ton./ano e na França, são produzidas ao redor de 51.600 ton./ano de mexilhão da espécie *Mytilus edulis* e 10.600 ton./ano da espécie *Mytilus galloprovincialis*. A Tailândia produz 71.000 ton/ano do mexilhão verde, *Perna viridis*. O mexilhão *Perna canaliculus*, cultivado na Nova Zelândia, atinge a cifra de 71.000 ton./ano e, de acordo com Alfaro (2001), a obtenção de sementes é feita no ambiente natural. Nos Estados Unidos, a produção do mexilhão *Mytilus edulis* em 1987 foi de 21.000 ton., decrescendo para 9.400 ton. em 1997 (FAO, 1999). No Brasil, especificamente no estado Santa Catarina segundo Ferreira & Magalhães (2004) a produção do mexilhão *Perna perna* chegou à produção de 10.000 ton. na safra de 2000.

Os métodos empregados no cultivo de mexilhão diferem de uma região para outra e são definidos principalmente em função do ambiente e da espécie cultivada (FERREIRA & MAGALHÃES, 2004). De acordo com Spencer (2002), 15% dos cultivos são realizados diretamente em contato com o fundo do mar e 85% em sistemas suspensos que podem ser fixos (bouchots, mesa, tomateiro) ou flutuantes (balsas e longlines).

O cultivo de fundo é empregado principalmente na Holanda, mas também é realizado, embora em menor escala, na Alemanha, Normandia e Reino Unido. As sementes são obtidas durante a despesca dos adultos, são selecionadas e retornam ao fundo do mar para dar continuidade aos cultivos. O cultivo em estacas ou

“bouchots” é utilizado principalmente na França, devido às características peculiares de ambiente de fundo lodoso, com grande variação de maré. Nesse caso, as sementes são captadas no próprio local de cultivo, em cordas de fibra de coco, também em sistemas de estacas em forma de mesa, paralelas às linhas das estacas de engorda. Ainda na França, cerca de 10.000 toneladas são produzidas em “longlines”, utilizando a espécie *Mytilus galloprovincialis* cujas sementes são produzidas em laboratório, pois a espécie em questão é exótica e não forma estoques naturais naquela região.

A utilização de balsas como sistema de cultivo, segundo Spencer (2002), é comum em vários países como: Austrália, China, Chile, Canadá, Estados Unidos da América, Índia, Irlanda, Malásia, Nova Zelândia, Escócia, Singapura e Venezuela. O local onde esse método mais se desenvolveu foi na Espanha, implantado na região da Galícia, em 1946. Em 1956 a produção foi de 22.460 ton. Atualmente a produção é superior a 250.000 ton., realizada em mais de 3.000 estruturas (GOSLING, 2003). O Brasil chegou a utilizar balsas em cultivos experimentais, mas, gradativamente, foram substituídas pelos “longlines” que, atualmente, são o principal sistema de cultivo no país e no mundo.

O sistema de cultivo em “longlines”, é baseado em métodos japoneses de cultivo de ostra e vieiras (SPENCER 2002), atualmente é praticado em diversos países como Escócia Nova Zelândia, China, Canadá e França.

A mitilicultura catarinense, responsável por mais de 90% da produção nacional, recentemente vem apresentando quedas de produção em função da falta de colocação de coletores de sementes por parte dos produtores e do aumento da fiscalização sobre a retirada de sementes de estoques naturais. A obtenção de sementes de mexilhão *Perna perna* é proibida, e controlada mediante licença específica.

A instabilidade na oferta de sementes caracteriza um entrave para o desenvolvimento da atividade. A recuperação dos estoques naturais de mexilhões em costões rochosos é um processo lento que envolve a interação de diversos organismos e que pode levar de 8 a 10 anos (DYE et al., 1997). Portanto é imprudente a utilização destes estoques como forma exclusiva de obtenção de sementes. Além da extração dos estoques naturais, as sementes de mexilhão também podem ser obtidas através do uso de coletores artificiais ou produzidas em laboratório.

De acordo com Ferreira & Magalhães (2004), a forma mais econômica que menos agride o ambiente é através da utilização de coletores artificiais. Para isso, é fundamental conhecer o ciclo reprodutivo da espécie em questão, bem como as épocas de desova no ambiente natural em cada local e os períodos de fixação e desenvolvimento das larvas, além de seus mecanismos de reconhecimento de substrato e de metamorfose.

O uso de coletores artificiais contribui com mais de 70% do suprimento de sementes em países como França e Espanha e quase 100%, em países como Nova Zelândia. No Brasil, os estudos realizados até o momento demonstram que esta técnica tem sido pouco utilizada, mas sugerem que pode contribuir consideravelmente no aumento da oferta de sementes (ROSA, 1997; GARCIA, 2001). A obtenção de sementes por meio de coletores pode ser irregular para um mesmo local em diferentes anos, devido a variações macro e micro ambientais. Surge então, a necessidade de estudar novas alternativas de obtenção de sementes que proporcionem maiores garantias para a sustentabilidade da produção. Isto é importante em locais onde o controle de retirada de estoques naturais tem pouco controle e pode dificultar a manutenção de parte da produção, durante períodos de recuperação.

A produção de sementes de mexilhão em laboratório, realizada em países como China, França, Inglaterra, Nova Zelândia e Estados Unidos, é o método menos utilizado mundialmente e o mais oneroso pois, necessita de instalações adequadas e pessoal capacitado. Apesar disso, através desta técnica é possível obter sementes de forma sustentável e, a exemplo dos países onde é utilizada, pode diminuir a extração dos estoques naturais e dar sustentabilidade ao sistema produtivo.

Tanto para a produção de sementes em laboratório, assim como para utilização de coletores, informações referentes ao ciclo sexual são extremamente importantes. Para obtenção de gametas em ambiente controlado, a desova induzida e a eficiência do processo podem ser determinadas através da quantificação dos animais que eliminam gametas e do material reprodutivo liberado. Segundo Gosling (1992), o ciclo reprodutivo de moluscos pode ser identificado principalmente através observações de desovas no ambiente natural ou em laboratório, acompanhamento do desenvolvimento do tecido gonádico (macro e microscópico), fixação de larvas no ambiente natural e presença de larvas na coluna d'água.

A escala macroscópica para identificação dos estádios do ciclo sexual de

Perna perna foi inicialmente proposta (LUNETTA, 1969). Diversos trabalhos com diferentes espécies de mexilhão têm sido realizados para relacionar o ciclo sexual a características macroscópicas, microscópicas e índice de condição. Buchanan & Babcock (1997) e Ramirez & Martinez (1999), avaliaram a desova no ambiente natural, através da fixação das larvas em coletores artificiais. Vélez (1971), Seed & Brown (1977), Hickman & Illingworth (1980), Aguirre & Ramirez (1989), Schurink & Griffiths (1991), identificaram variações no tecido gonádico através do acompanhamento do índice de condição (CROSBY & GALE, 1991). A Identificação do ciclo reprodutivo através da análise histológica dos gametas foi realizada por Bayne et al. (1978), Lowe et al. (1982), Newel (1982), Rodhouse et al. (1984), Aguirre & Ramirez (1989), Alfaro et al. (2001) e, especificamente com *Perna perna* no Brasil, destacam-se os resultados (MAGALHÃES, 1985 e 1998).

No Brasil, Casas (1986), Garcia (1990) estudaram o ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* obtendo resultados que contribuíram para os trabalhos de (ARAÚJO, 1995; FERNANDES, 1988). Routledge (1999) e De la Verne (2003), trabalharam com indução à desova em laboratório em bioensaios. Estes trabalhos geraram informações importantes no que diz respeito à identificação dos estágios larvais do mexilhão *Perna perna*, capacidade reprodutiva, métodos de indução e alimentação de larvas em ambiente controlado.

Segundo dados da EPAGRI (COSTA, 2003) o cultivo de moluscos em Santa Catarina proporciona emprego direto para mais de 1000 produtores e indireto para mais de 5000 pessoas. Segundo SILVA et al. (2002), o desenvolvimento dos cultivos trouxe benefícios sociais e econômicos para a região. A maioria dos pescadores artesanais que iniciaram seus cultivos como uma atividade complementar de renda, gradualmente tornaram-se aqüicultores por tempo integral, o que leva a um aumento considerável de seu poder aquisitivo e uma melhora em sua condição social (ROSA, 1997).

Tendo em vista a importância social que a atividade representa para o estado de Santa Catarina, o potencial de crescimento e desenvolvimento da mesma, capaz de gerar e produzir alimento de qualidade, torna-se relevante o desenvolvimento de pesquisas a fim de investigar o potencial da produção comercial (grande escala) de sementes de mexilhão em laboratório. Essa tecnologia, além disso, é facilitada em Santa Catarina dada a existência, no Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC, de toda a estrutura laboratorial necessária, além da experiência

acumulada com a produção e comercialização de sementes da ostra japonesa *Crassostrea gigas*. Esses estudos contribuirão de forma positiva para que, sementes de mexilhão possam estar disponíveis aos produtores, diminuindo os riscos potenciais de dificuldade de abastecimento de sementes para os cultivos e

Relationship between the reproductive cycle, the effectiveness of spawning induction and hatchery production of *Perna perna* (L.) mussel larvae

Leonardo Sabin Hausen¹, Jaime Fernando Ferreira²

1 aluno de Pós Graduação em Aqüicultura – UFSC

2- Laboratório de Moluscos Marinhos – UFSC - Rua dos Coroas s/n, Barra da Lagoa

CEP 88061-600, Florianópolis, SC-Brasil, jff@cca.ufsc.br

ABSTRACT

The State of Santa Catarina is actually the largest Brazilian producer of the cultivated mussel *Perna perna*, with more than 90% of the production. This activity, although it be recent, showed an exponential growth from 1990 to 2000, when it reached the productions of 12,000 metric tons. and kept in this level. The stabilizing in the production is closely related to questions linked to obtain seeds. The difficulty and the legal restrictions for natural seed capture, associated to the lack of planning and the use of artificial collectors do not give the sustenance and the guarantee that the productive system requires. With the objective to contribute to seeds production in laboratory and the sustenance of the cultivation, this work evaluated the efficiency of induction to the spawning and to the production of D larvae in *Perna perna*, relating them to macroscopic and microscopic analysis of the sexual cycles and to the condition index (dry weight of the soft parts x 100 / total weight-dry weight of the shell). In the period from June, 2003 to June, 2004 eleven spawning inductions were made, and it was observed a positive answer superior to 50% of the animals, in the months of June, July and November, 2003 and May, 2004. The values obtained for the condition index varied from 7,15 to 12,39 and in the months mentioned above, the values were superior to 9. The number of eggs per female varied from 3,750,000 to 17,771,810 and the formation of "D" larvae was higher than 50%, except in the months of September, 2003 and January, 2004. The higher percentage was 86% and it was obtained in May, 2004. The histology analysis of the gonad tissue indicated gametes repletion coincident with the macroscopic determination of the cycle and with the times of better induction to the spawning. These results shows that the mussel *Perna perna* has an excellent potential for reproduction in laboratory during almost the whole year, without laboratory maturation. In addition, periods of higher reproductive efficiency and spawning induction can be defined by a combined evaluation of the macroscopic aspect with the condition index that bring great economy and efficiency for the laboratory production.

Key-words: *Perna perna*, larvae, hatchery, spawning, reproductive cycle

Introdução

Aspectos relacionados à reprodução e produção de larvas de moluscos em laboratório têm sido estudados desde a década de 50 no Japão (Ito, 1991). Segundo Uriarti et al. (2001) e Spencer (2002) na Europa, a produção de sementes de bivalves teve início na década de 60, que segundo Gosling (2002) ocorreu em função do declínio dos estoques naturais e da escassez de sementes. Apesar da produção em laboratório ser essencial em locais onde a captação de sementes de espécies nativas é ineficiente e as espécies nativas não formem estoques, também se mostra importante comercialmente em países onde os estoques naturais suprem a demanda do setor produtivo (Gosling, 2002). Estudos sobre o ciclo reprodutivo são importantes para manter os estoques naturais, propiciar o povoamento de regiões onde os animais não ocorram e repovoar áreas onde não mais se encontram (NARCHI, 1976). Atualmente, tem se tornado importantes para aumentar, de forma induzida, a produção de determinados organismos de interesse econômico.

Segundo Figueras (1989), com o crescimento do número de produtores e o aumento da produção, aumenta a importância e a necessidade da obtenção de sementes, que são matéria prima para o desenvolvimento dos cultivos. Atualmente a China, Nova Zelândia e Estados Unidos, são os maiores produtores de sementes de mexilhão em laboratório (Fao, 2002). Destes apenas os Estados Unidos trabalha com espécie exótica. Segundo Gosling (2002), as técnicas utilizadas na produção de juvenis de bivalves em ambiente controlado são muito semelhantes, com algumas modificações em função das condições locais e da espécie utilizada. Para obtenção de gametas da grande maioria dos bivalves, a variação de temperatura é a mais utilizada (Utting & Spencer, 1991).

A resposta dos animais ao processo de indução, está intimamente relacionada com a condição fisiológica dos mesmos, que depende de uma complexa interação de fatores externos (temperatura, salinidade, alimento) e internos (reserva de glicogênio, crescimento somático, vitelogênese). Para o mexilhão *Perna perna*, Lunetta (1969) propôs uma classificação macroscópica de estágio sexual como forma de avaliação de condição reprodutiva. Além da análise morfológica do tecido gonádico, outras formas de avaliar condição reprodutiva em moluscos tem sido estudadas, como Índice de Condição (Crosby & Gale, 1991), acúmulo de glicogênio e histologia. O IC que primeiramente tinha a finalidade de indicar padrões comerciais, passou a ser utilizado na identificação de ciclo reprodutivo como nos trabalhos de Vélez (1971) Seed & Brown (1977), Hickman & Illingworth (1980), Aguirre & Ramirez (1989), Schurink & Griffiths (1991).

As análises histológicas fornecem informações precisas do desenvolvimento do tecido gonádico. Os resultados obtidos são classificados de acordo com escalas arbitrárias como nos trabalhos de Seed & Brown (1977), Snodden & Roberts (1997) com *Mytilus edulis* e Alfaro et al. (2001) com *Perna canaliculus*, ou geram dados quantitativos (estereologia), como nos trabalhos de Bayne, et al. (1978), Lowe et al. (1982), Newel (1982), Rodhouse et al. (1984), Hawkins et al. (1985), todos com *Mytilus edulis*.

Segundo Rockanski et al. (2000), em 1999 a produção do mexilhão *Perna perna* em Santa Catarina foi de 10.000 ton e, de acordo com (Ferreira & Magalhães, 2004), este valor se repetiu nos anos seguintes. A produção se manteve neste patamar, fato este intimamente relacionado à diminuição de oferta de sementes nos estoques naturais e aumento da fiscalização e regulamentação na obtenção das mesmas. Garcia (2001) conclui que o cultivo de mexilhões em

Florianópolis pode se tornar uma atividade insustentável em relação à captação de sementes, em função do rápido crescimento da atividade e da superexploração dos estoques naturais da ilha de Santa Catarina. É importante que os estoques naturais sejam mantidos e que as áreas de cultivo permaneçam com qualidade ambiental, capaz de suportar as atuais e futuras alterações causadas gradativamente com a introdução de novos cultivos, para assegurar à atividade uma estabilidade futura. Também é importante que a produção possa retomar o crescimento de forma segura, sustentável e ecologicamente correta.

Tendo em vista que a dificuldade de captação do ambiente natural e as restrições legais impostas para a obtenção das mesmas, juntamente com a falta de planejamento e a falta de colocação de coletores artificiais não proporcionam a sustentabilidade e a garantia que o sistema produtivo requer, a produção em laboratório surge como alternativa. Com objetivo de contribuir com a produção de sementes em laboratório e com o conhecimento biológico da espécie, este trabalho avaliou a eficiência de indução à desova em mexilhões *Perna perna*, relacionando-a a análises de reconhecimento macroscópico do ciclo sexual, índice de condição e análises histológicas do tecido gonádico.

Material e Métodos

No período de junho de 2003 a maio de 2004 foram realizadas treze coletas de exemplares do mexilhão *Perna perna* (L.) de um mesmo lote de crescimento, oriundos de cordas de cultivo do tipo espinhel ("long lines") pertencentes ao Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM- UFSC), na praia de Sambaqui (27° 25' S e 27° 35' S, 48° 35' W e 48° 40' W), no município de Florianópolis/SC, Brasil.

O número de animais coletados para indução à desova variou entre 100 e 200. Para análise macroscópica, índice de condição e histologia foram utilizados respectivamente 20, 20 e 10 animais por coleta. Os mexilhões utilizados no presente trabalho encontravam-se no Estádio III do ciclo sexual (LUNETTA, 1969), ou seja, animais maduros sexualmente e com máximo desenvolvimento dos folículos das gônadas. O comprimento dos animais variou de 70 a 110 mm do começo ao final do experimento. As coletas aconteceram 24 horas antes das induções, período este que os mexilhões permaneceram expostos ao ar à temperatura ambiente ($21 \pm 5^\circ \text{C}$) sem receber nenhum tipo de manejo.

As induções foram realizadas no LMM/UFSC. Cerca de 3 horas antes das induções, os animais foram transportados em recipientes plásticos de Sambaqui para o LMM, onde foram submetidos à remoção mecânica de organismos incrustantes existentes na parte externa das conchas. As técnicas utilizadas para a indução foram as descritas por Loosanoff & Davis, (1963) e Utting & Spencer, (1991), segundo modificações propostas por Araújo (1992); Araújo et al. (1993a); Rupp (1994); Routledge (1998) e De la Verne (2003), que consistem numa alternância de estímulos térmicos (aumento da temperatura e dessecação), químicos (presença de gametas na água, U.V.), e mecânicos (batidas na calha de desova).

Os animais que liberavam gametas foram imediatamente separados por sexo e alojados em recipientes plásticos de menor volume (2 L) onde completavam o processo de eliminação. Os ovócitos obtidos ao final da indução foram homogeneizados e peneirados em malhas de 65 micrômetros para eliminar as impurezas. Posteriormente foram contados com a finalidade de se obter o número total de ovócitos da desova e determinar o volume de solução de esperma a ser utilizado. Os espermatozóides liberados pelos machos foram misturados em um

recipiente (2 L) e posteriormente peneirados em malha de 22 micrômetros e concentrados em um copo de Becker (1 L).

A fecundação ocorreu em recipientes com capacidade de 20 litros. Os gametas foram homogeneizados respeitando a proporção de 10 mL de solução de esperma para cada 100 milhões de ovócitos. Passadas 24h da fecundação, as larvas, mantidas em tanques de 6.000 L foram contadas com a finalidade de se obter a porcentagem de larvas formadas, em relação ao número total de ovócitos eliminados pelas fêmeas.

Do total de animais coletados para desova, foram separadas amostras de vinte animais para determinação do Índice de Condição (IC) e análise morfológica. O IC foi determinado segundo a fórmula de Crosby & Gale (1990), alterando o multiplicador do peso das partes moles secas de 1.000 para 100, como proposto por Lawrence & Scott (1982).

$$\text{IC} = \frac{\text{peso das partes moles (g)}}{\text{peso total vivo (g) - peso seco das conchas(g)}} \times 100$$

Na análise macroscópica, os mexilhões foram abertos e a carne retirada da concha para identificação do sexo e avaliação do estágio sexual, segundo as descrições de Lunetta (1969) e Magalhães (1986). Para realização da análise histológica foram coletadas amostras da porção mediana do tecido gonádico, seguindo as recomendações de Howard & Smith (1983). Após a coleta os tecidos foram imediatamente fixados em solução de Davidson, sem ácido acético e com água marinha, por 48 h em temperatura ambiente e, posteriormente, transferidos

para álcool 70%.

O material fixado foi submetido a técnicas histológicas clássicas baseadas em Beçak e Paulette (1976) e Howard e Smith (1983), que incluem desidratação, diafanização, inclusão em parafina, corte (5 -7 μm) e coloração por Eosina aquosa e Hematoxilina de Harris (HE).

Resultados e Discussão

Análise Morfológica

Nesta etapa do trabalho, os animais analisados foram classificados em três estádios sexuais (IIIA, IIIB, e IIIC), que representam fases distintas de desenvolvimento do tecido gonádico (Lunetta, 1969). Como pode ser visto na Figura 1, as maiores percentagens de animais no estágio sexual IIIA, ocorreram nos meses de junho, julho, agosto (2003), janeiro e maio de 2004. A ocorrência de animais no estágio IIIC, foi verificada nos meses de setembro (2003) e Fevereiro (2004), com 85 e 80% respectivamente. Animais no estágio sexual IIIB, foram observados somente nos meses de março, abril e maio (2004), não ultrapassando o valor de 15 % dos animais amostrados (n=20).

Magalhães (1998), concluiu que o cultivo apresenta a maior quantidade de mexilhões repletos de gametas (fase IIIA) ao longo do ano, quando comparado com ambiente natural. Sistemas de cultivo como o “Long Line” (submerso), propiciam que os animais fiquem constantemente submersos, portanto em maior contato com alimento e sujeitos a menor variação de temperatura que os animais dos bancos naturais, fato este que propicia um maior e mais rápido acúmulo de glicogênio, que segundo Bayne (1886) é responsável pela maturação dos gametas. Em mexilhões e outros bivalves, o glicogênio é estocado em vários tecidos do corpo, quando ocorre

excesso de alimento (Bayne et al., 1982).



Figura 1. Quantidade relativa de mexilhões *Perna perna*, nos estádios IIIIA, IIIB e IIIC do ciclo reprodutivo, provenientes de cultivo.

O ciclo reprodutivo, principalmente a fase de gametogênese, é um processo que requer muita energia e a mobilização dos nutrientes ingeridos até a gônada é essencial para o desenvolvimento e maturação da gônada (Alvarez, 1991). Na maioria dos bivalves este desenvolvimento não depende diretamente do alimento, mas sim das reservas de glicogênio armazenadas (Nascimento et al., 1982). Isto resulta na necessidade de estocar grandes quantidades de reservas e subsequentemente mobilizar a energia e metabólicos para a produção de gametas (Mathieu & Lubet, 1993). No cultivo também se observa, segundo Magalhães (1985) uma maior sincronia na maturação e menor período de recuperação.

Magalhães (1985) citou que indivíduos de comprimentos inferiores a 4 cm não mostraram diferenças significativas quanto ao conteúdo protéico, em relação ao sexo ou aos diferentes estádios do ciclo reprodutivo, o que ocorreu em animais de maior tamanho. Roadhouse, (1984) verificou estreita relação entre análise visual e

dados histológicos. Além das informações referentes à condição reprodutiva, a análise morfológica do tecido gonádico é importante comercialmente devido a relação existente entre aspecto reprodutivo e o rendimento de peso na comercialização (Buchanam, 2001).

Índice de condição

Os valores de Índice de Condição obtidos no presente estudo podem ser vistos na Figura 2.

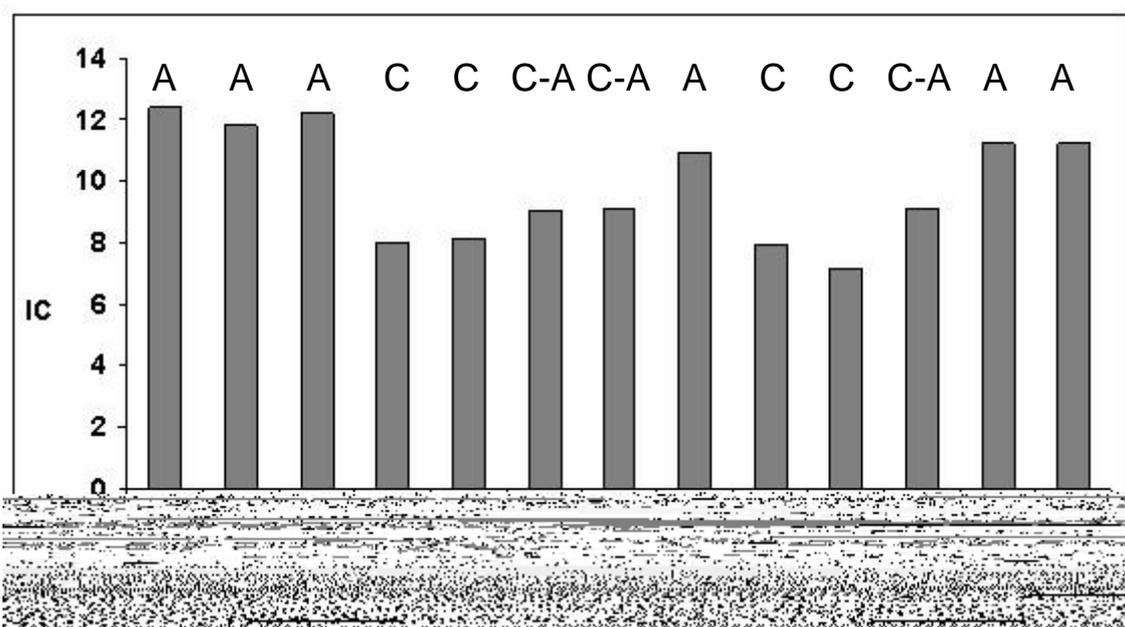


Figura 2. Valores de Índice de Condição para *Perna perna* em Santa Catarina, referentes ao período de junho de 2003 a maio de 2004. As letras na parte superior indicam a fase principal do ciclo no estágio III, para cada mês.

Estes valores demonstram que o mexilhão *Perna perna* realiza o processo de maturação gonádica no ambiente natural durante todo o ano, e evidenciam duas épocas preferenciais de desova. Também é possível observar certa variação na intensidade, provavelmente relacionada à disponibilidade de alimento, que por sua

vez está intimamente ligada a fatores ambientais como temperatura, luminosidade e correntes marítimas. Fisiologicamente, a relação entre fenômenos biológicos e a reprodução é governada por mecanismos citoquímicos e hormonais, os quais são influenciados por mecanismos ambientais (Nascimento & Miraglia, 1983).

Os fatores exógenos que mais influenciam no desenvolvimento gonádico e no tempo de reprodução são as variações de temperatura, salinidade e quantidade e qualidade de alimento (Giese & Pearse, 1974; Braley, 1982). Alvarez (1991) afirma que o ciclo reprodutivo está relacionado com as trocas sazonais de temperatura, iniciando-se quando estas declinam ou aumentam e pode ser alterado por variações anuais, adiantando ou retardando o ciclo. Velez et al. (1993) afirma que a temperatura da água tem uma função preponderante nos processos de maturação estrutural e fisiológica dos gametas.

A variação observada nos valores de índice de condição demonstra a variação da quantidade de material reprodutivo em relação ao volume interno da concha, ou seja, nos meses de junho, julho e agosto os animais estavam repletos de material reprodutivo. De agosto para setembro o IC caiu bruscamente de 12 para 8 em função da desova no ambiente natural. De setembro a janeiro ocorreu maturação do tecido gonádico com acúmulo de material reprodutivo, o que faz com que o IC suba novamente até valores próximos a 12. Em fevereiro, nova queda no índice para 8, chegando a 7 em março, demonstrando novamente ocorrência de desova no ambiente natural, esta com mais intensidade que a primeira. Abril, maio, junho, julho e agosto (metade do outono e todo o inverno) são meses de maturação e acúmulo de material reprodutivo, fechando o ciclo. No período de temperatura mais baixa a maturação parece ocorrer com mais intensidade que no período de setembro a janeiro (primavera e metade do verão).

Vélez & Epifanio, (1981) estudando a maturação em ambiente controlado, concluíram que a gametogênese em *Perna perna* pode ser inibida por altas temperaturas (28 °C). Resultados semelhantes foram observados por Lunetta (1969), Vélez (1971), Motta & Machado, (1974) e Berry, (1978) que concluíram que os picos de desova do *Perna perna* coincidem com períodos de baixa temperatura. FERNANDES, (1988) concluiu que os meses de maio, junho, julho e outubro são os meses de maior intensidade reprodutiva do mexilhão *Perna perna*.

Tanto a análise morfológica quanto o índice de condição foram utilizados no presente trabalho com a finalidade de identificar o nível de maturação gonádica dos mexilhões progenitores. As avaliações das desovas demonstraram como animais em diferentes estádios de maturação se comportam quando induzidos.

As duas metodologias (análise morfológica e IC) utilizadas com a finalidade de identificar o desenvolvimento do tecido gonádico dos mexilhões no ambiente natural demonstraram resultados semelhantes. Nos meses em que a maioria dos animais se encontravam no estágio sexual IIIA, os valores de Índice de Condição foram superiores a 10. Animais com estas características, quando induzidos a desova em laboratório demonstraram uma resposta positiva acima de 50%. No entanto, nos meses onde a maioria dos animais encontravam-se no estágio IIIC, os valores de índice de condição foram médios, entre 7 e 10, nestes meses a eficiência da desova ficou abaixo dos 50%. Nos meses onde se verificou a ocorrência de animais no estágio sexual IIIB, os valores de índice de condição foram baixos menores de 7, e as induções em laboratório não tiveram uma resposta satisfatória.

Quando se procura mexilhões progenitores para indução em laboratório, é importante que se determine o grau de maturação gonádico dos mesmos, porém em ambos os métodos utilizados, os animais analisados não participam da desova, pois

são sacrificados. Porém foi possível verificar que com uma amostra de 10 a 20 % dos animais necessários é possível ter uma boa informação de como o grupo irá se comportar na indução.

Avaliação das desovas

Com exceção do mês de fevereiro de 2003, em todos os outros meses foi possível obter gametas viáveis, embora no mês de dezembro de 2003 apenas 6 animais (n=100) responderam ao processo de indução, dos quais apenas 1 era macho. Para os meses de junho, julho, novembro de 2003 e maio de 2004 a porcentagem de animais desovados foi superior a 50%, com valores de 63,5%, 86,0%, 62,0% e 53,5% respectivamente (Figura 3).

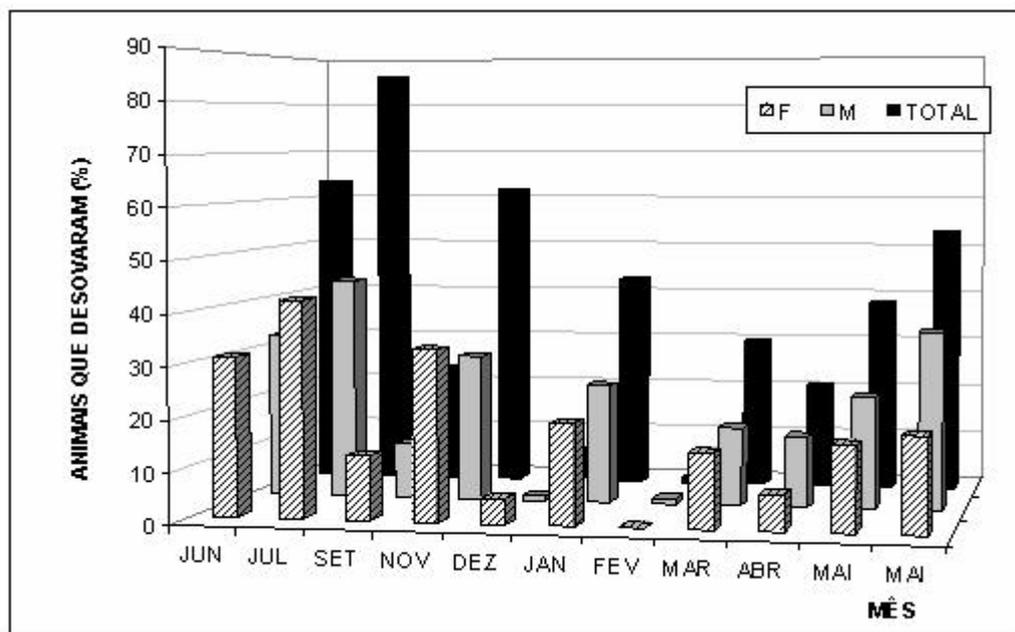


Figura 3. Porcentagem de animais que responderam aos estímulos à desova com a eliminação de gametas (F= fêmeas; M= machos).

Valores inferiores a 50% foram obtidos nos meses de setembro de 2003,

janeiro, março, abril e maio de 2004, em que os valores encontrados foram de 23,5, 30, 21 e 38,5%, respectivamente. (ARAÚJO, 1985) 20% ao longo do ano, (Routledge, 1999) (De la Verne, 2002) obteve 21,22% e 36,71% de resposta a indução, sendo os meses de janeiro, fevereiro, setembro, outubro, novembro e dezembro os de maior resposta. No presente trabalho, os melhores resultados combinam com os meses de maior índice de condição, exceto nos meses de dezembro de 2003 e fevereiro de 2004, que apesar de um valor médio de IC a resposta à indução foi muito baixa.

Eliminação de gametas

O número de ovócitos liberados pelas fêmeas durante o processo de indução (Figura 4) variou de 3.750.000 a 17.771.810. Routledge (1999), estudando a desova do *Perna perna* em laboratório, obteve médias de 1.222.000 a 4.604.000 ovócitos liberados por fêmea.

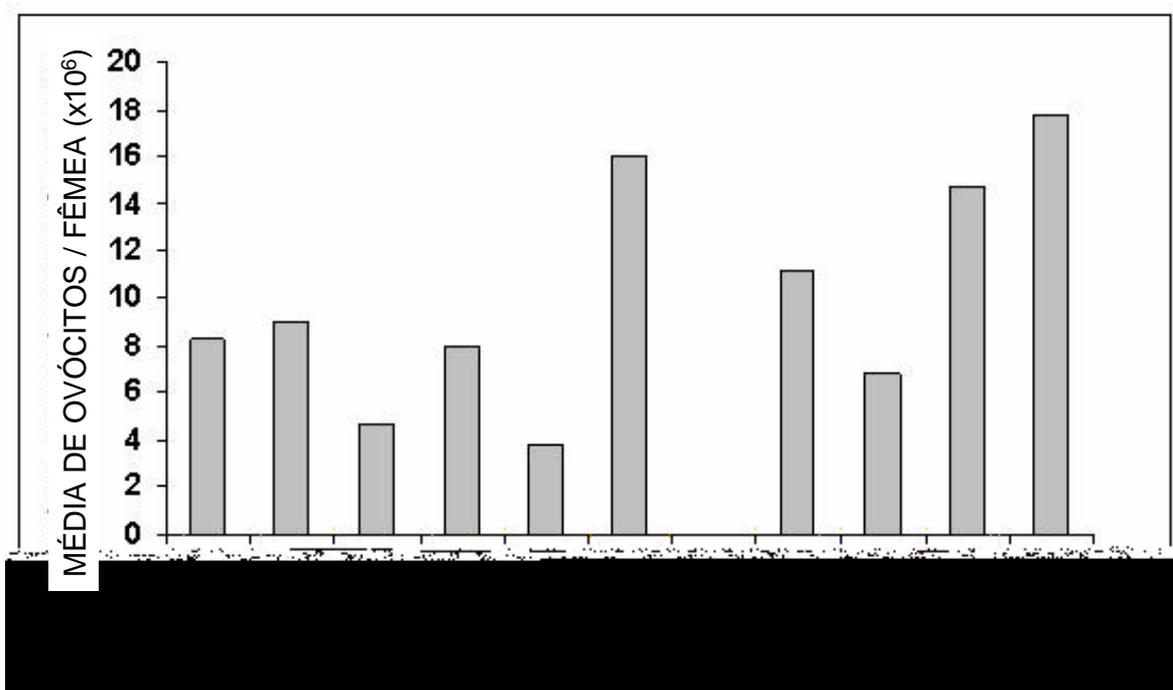


Figura 4. Média de ovócitos eliminados por fêmea que respondeu à indução.

Segundo Vélez & Martinez (1967), o mexilhão *Perna perna* possui um grande potencial biológico, podendo eliminar até 80 milhões de ovócitos numa desova completa. No laboratório, é mais comum a ocorrência de desovas parciais.

O tamanho, a idade e o peso corporal dos animais parecem influenciar no número de gametas liberados. No presente estudo, a diferença de idade dos animais foi de aproximadamente 1 ano entre o começo e o final do experimento. Quanto maior a idade do animal, menor sua taxa de crescimento somático e maior energia disponível para os processos reprodutivos, e menor o tempo necessário para recuperação do tecido gonádico.

Magalhães et al. (1983) observaram mexilhões *Perna perna* de apenas 3 cm de comprimento apresentarem gônadas desenvolvidas e já eliminando gametas, Magalhães (1998) citou que indivíduos de comprimentos inferiores a 4 cm não mostraram diferenças significativas quanto ao conteúdo protéico, em relação ao sexo ou aos diferentes estádios do ciclo reprodutivo, o que ocorreu em animais de maior tamanho. Isto é uma evidência de que indivíduos jovens, dessa espécie, do ponto de vista bioquímico e fisiológico, investem menos energia na atividade reprodutiva do que animais mais velhos ou de maior tamanho.

Este aspecto importante da fisiologia reprodutiva dos mexilhões é corroborada por Bayne (1975), que em suas pesquisas observou que indivíduos jovens de *Mytilus edulis* produzem uma quantidade de gametas muito inferior àquela produzida por indivíduos menos jovens.

Portanto, parece ser mais eficiente a utilização de indivíduos adultos (mais de 1 ano) no processo de indução, embora indivíduos de 1 ano, e comprimento de 70 mm também respondam bem ao processo.

Com a finalidade de se obter a taxa de fecundação, 24 horas após a contagem e fertilização dos ovócitos, eram também contadas as larvas D formadas, cujos resultados se encontram na Figura 5.

Foi possível observar no presente trabalho, que o mexilhão *perna perna* além de possuir um alto potencial biológico como citado anteriormente, as taxas de formação de larvas “D” sobre condições controladas também são bastante satisfatórias.

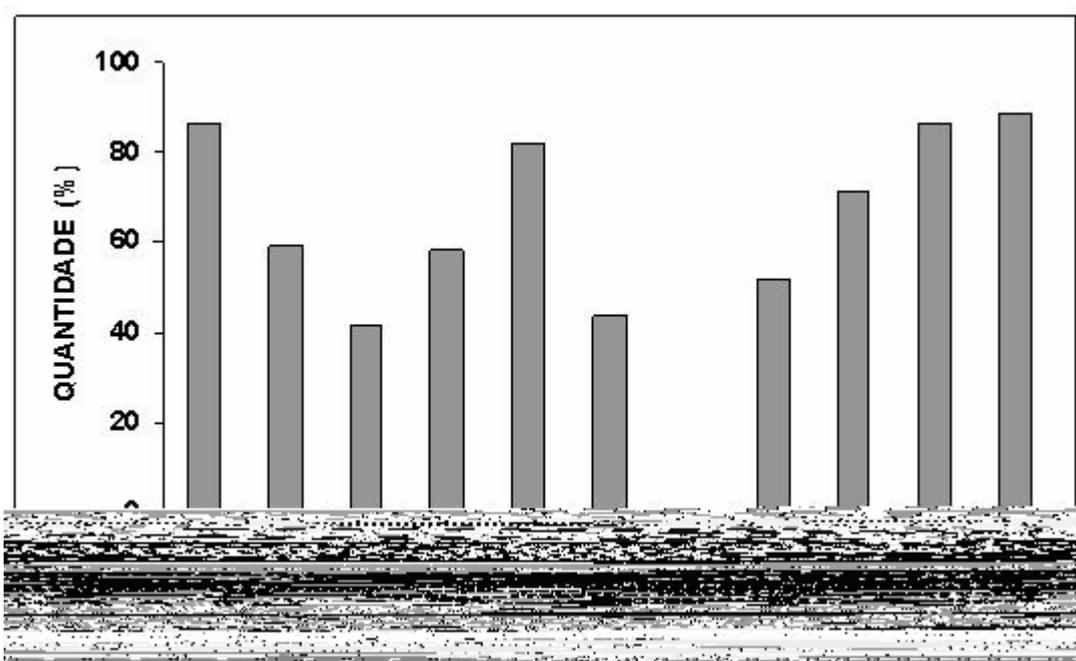


Figura 5. Quantidade relativa de larvas “D” formadas 24 horas após a fecundação, em relação ao número de ovócitos liberados.

Segundo Fernandes (1988), os fatores que influenciam na sobrevivência e crescimento de larvas do *Perna perna* em laboratório são as condições dos reprodutores, a densidade larval, temperatura, salinidade, os processos envolvidos na metamorfose e a concentração e proporção dos gametas utilizados na fecundação. No mesmo trabalho, Fernandes obteve resultados que variaram de 31%

a 50% de formação de larvas “D”, testando diferentes concentrações de espermatozoides na fecundação. ROUTLEDGE (1989), também estudando *Perna perna* obteve 89, 97, 79 e 22% de formação de larvas “D” 24 h após a fecundação, chegando a uma sobrevivência inferior a 1% no vigésimo dia de larvicultura.

No presente estudo, em junho de 2003, do total de ovócitos liberados, 86% evoluíram até o estágio de larva “D”. Nos meses de dezembro 2003, e nas duas amostras feitas no mês de maio de 2004, a formação de larvas foi superior a 80% (81 e 84 respectivamente). Nos meses de julho, setembro e novembro de 2003 a formação foi de 59, 50 e 58%. Em janeiro, março e abril de 2004, foi de 40, 50 e 70%. Em fevereiro de 2004, não foi realizada fecundação pois não foi possível obter gametas femininos no processo de indução. Em ambiente controlado, onde praticamente todas as variáveis que englobam o processo reprodutivo dos mexilhões pode ser manipulado e mantido constante, o que parece influenciar a formação de larvas “D” é a qualidade dos gametas liberados que é um reflexo da condição dos progenitores. Para uma boa maturação em bivalves, deve-se ter grande quantidade de glicogênio armazenado (Loosanoff & Davis, 1952). Este é utilizado principalmente na síntese de lipídeos durante a vitelogênese (Utting & Millican, 1997) e disso depende todo o processo de maturação final de gametas, na formação em quantidade e qualidade, o que por sua vez garantirá uma boa taxa de fecundação e formação de larvas (Breese & Malouf, 1975). De acordo com Lannan (1980) e Muranaka & Lannan (1984), o máximo de sobrevivência larval de bivalves é conseguido quando o estoque de reprodutores se encontra em estágio ótimo de desenvolvimento gonádico.

No decorrer do cultivo larval, surgem outros fatores que podem afetar a sobrevivência, como alimentação e enfermidades, fatores estes mais ligados ao

ambiente ao qual as larvas são submetidas, do que a qualidade reprodutiva dos progenitores.

Análises histológicas do tecido gonádico

A realização das análises histológicas possibilitaram a obtenção de dados seguros referentes à reprodução do *Perna perna* que contribuíram para dar suporte à análise macroscópica (identificação do estágio do ciclo reprodutivo) e cálculo do IC. De acordo com Magalhães (1998), o início da maturidade sexual nos mexilhões *Perna perna*, é caracterizado pela perda do aspecto homogêneo do manto, devido à formação e ramificação dos canais genitais e esboços foliculares das gônadas, estas se formam a partir da intensa ramificação dos canais genitais, cuja extremidade distal alargada foi denominada pelos especialistas de folículo. Os valores obtidos indicaram que, nos meses que prevaleceram animais no estágio sexual IIIA, com IC alto 7 a 12, as respostas à indução foram superiores a 60%. Esses dados são compatíveis com as análises histológicas do tecido gonádico (Figura 6) para esses animais, que mostram repleção total ou quase completa dos folículos gonádicos, com pouco tecido conjuntivo e gametas tanto femininos quanto masculinos já presentes na luz dos gonodutos. Nesses animais, fica nítido o desprendimento dos gametas femininos da parede dos folículos e sua forma redonda, indicando que estão maduros e prontos para a eliminação.

Nos meses de setembro, fevereiro e março, foi verificada a menor ocorrência de animais no estágio sexual IIIA (prevalecendo os IIIB e IIIC) e também, os menores valores de índice de condição, indicando um período pós desova no ambiente natural, coincidente com o aspecto do tecido gonádico

revelado pela análise histológica. Nesses animais fica evidente a grande quantidade de tecido conjuntivo, os folículos total ou quase completamente vazios. Além disso, pode-se notar também que os poucos gametas que restam apresentam morfologia alterada e indicação de degradação ou reabsorção, compatíveis com situações pós-desova.

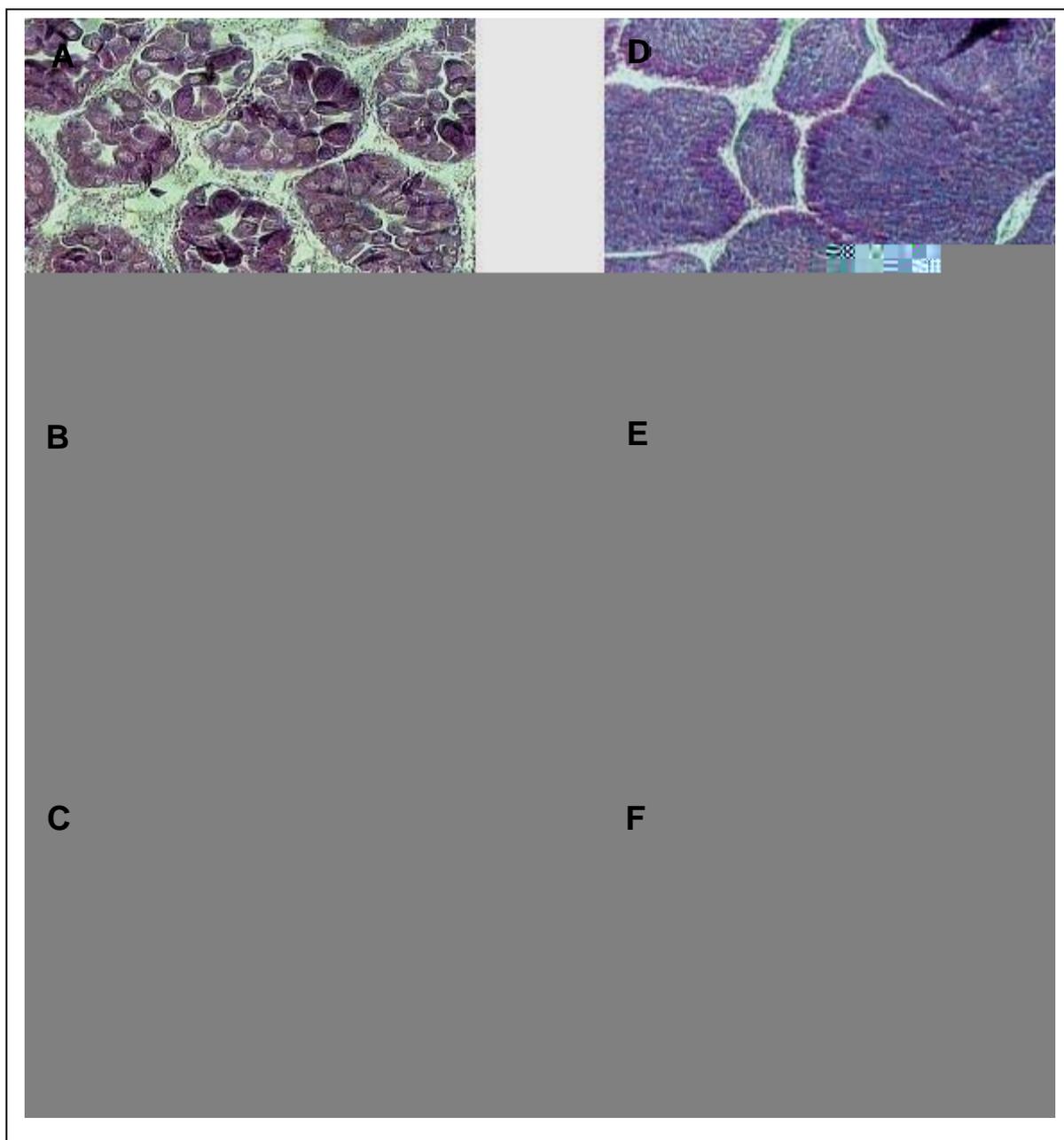


Figura 6. Aspecto do cortes histológicos do tecido gonádico de mexilhões (coloração HE) em diferentes estádios macroscópicos IIIA, IIIB e IIIC do ciclo sexual. Em A, B e C (Fêmeas) e D, E e F (Machos) – a barra representa 100 μ m.

Embora seja possível a obtenção de gametas quando animais se encontram no período pós-desova, os resultados das induções não são muito eficientes, além de um menor número de animais responder positivamente ao processo, o número de gametas obtidos e a fecundação ficam aquém do desejado.

Como o processo de reprodução em ambiente controlado tem um custo relativamente elevado, a busca pela maior eficiência é imprescindível para a viabilização do mesmo. Isso pôde ser alcançado com os resultados deste trabalho, a partir dos quais podemos calcular a quantidade de animais necessária para a indução, em função da necessidade de larvas a serem produzidas, com base no estágio macroscópico e no índice de condição.

Quanto à caracterização das diferentes fases do ciclo sexual, tanto no aspecto macroscópico como microscópico, verificou-se que o presente estudo corrobora os resultados já obtidos sobre a reprodução do mexilhão *Perna perna* para o litoral catarinense: o maior período de emissão de gametas é a primavera e verão.

Estes resultados, além de acrescentar informações às obtidas anteriormente em estudos da reprodução do *Perna perna*, podem vir a colaborar com trabalhos futuros, principalmente de larvicultura e assentamento. Aliando estes resultados com as taxas de sobrevivência na larvicultura e posteriores taxas de assentamento, provavelmente será possível determinar a eficiência da produção de sementes para o cultivo comercial, o custo total de produção e o volume de sementes que pode ser produzido, possibilitando assim uma alternativa sustentável de obtenção de sementes para os produtores, propiciando uma menor pressão sobre os estoques naturais.

Conclusões

- É viável obter mexilhões de cultivo prontos para a indução à eliminação de gametas durante todo o ano;
- O processo de indução é mais eficiente em animais no estágio sexual IIIA mas pode ocorrer em períodos em que existe predominância de indivíduos IIIC;
- Os dados da análise morfológica coincidem com os de Índice de Condição e com as análises histológicas, demonstrando ser esse um método prático mas eficiente para determinar o período reprodutivo do mexilhão *Perna perna*;
- A maturação dos mexilhões de cultivo no ambiente natural é permitida bons resultados de indução à desova e produção de larvas, não necessitando a realização de maturação adicional em laboratório.

Bibliografía

- Aguirre, M. C. G. e Ramirez, L. F. B. 1989. Ciclo reproductivo del mejillon *Modiolus capax* (C., 1837) em Baia de Los Angeles. Baja Califórnia, México. Na. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México 15 (1): 157-170.
- Alfaro, A. C. 2001. Reproductive behavior of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, in northern new zealand. Bulletin of marine science. 69(3): 1095-1108.
- Beçak, W. e Paulete, J. 1976. Técnicas de citologia e histologia. Livros técnicos e científicos. Rio de Janeiro.
- Berry, B. L. 1978. Reproduction, growth and production in the mussel *Perna perna* (Linnaeus) on the east coast of South Africa. Oceanogr. Res. Inst., Invest. Rep. 48: 28.
- Carmo, T. M. S. e Lunetta, J. E. 1978. Changes in the lipid level of *Perna perna*

- Hawkins, A. R. et al. 1985. Novel observations underlying the fast growth of suspension-feeding shellfish in turbid environments: *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131: 179-190.
- Hickman, R. W. e Illingworth, J. 1980. Condition Cycle of the Green-Lipped Mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. Marine Biology 60: 27-38.
- Howard, D. W. e Smith, C. S. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. Woods Hole, Massachusetts, NOAA Technical Memorandum.
- Lawrence, D. R. e Scott, G. I. 1982. The determination and use of Condition Index of oysters. Estuaries 5: 23-27.
- Loosanoff, V. L. e Davis, H. C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. In: RUSSEL, F. S.. Advances in marine biology 1. London: Academic Press.
- Lunetta, J. E. 1969. Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus perna* L. Mollusca Lamellibranchia). Bol. Zool. Biol. Mar. São Paulo. 26, 33-111.
- Magalhães, A. R. M. Efeito da parasitose por trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna* (L.). São Paulo: USP, 1998. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Bociências, Universidade de São Paulo, 1998, Brasil.
- Newell, R. I. E. 1982. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia mytilidae) from localities on the east coast of the United States. Biol. Bull. 162: 299-310.
- Pazos, A. J. et al. 1996. Stereological studies on the gametogenic cycle of the scallop, *Pecten maximus*, in suspended culture in Ria de Arousa (Galícia, NW Spain). Aquaculture, 142. 119-135.
- Rockzanski, M., Costa, S. W., Boll, M. G. e Oliveira Neto, F. M. 2000. A evolução da aqüicultura em Santa Catarina - Brasil. In: AQUICULTURA BRASIL 2000, Florianópolis, 2000. Anais... CD-ROM.
- Rosa, R. C. C. 1997. Impacto do cultivo de mexilhões nas comunidades pesqueiras de Santa Catarina. Dissertação de mestrado, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, UFSC, 188 pp.
- Routledge, E. A. B. 1998. Larvicultura do mexilhão *Perna perna* (L.) alimentados com diferentes composições de microalgas. Florianópolis, 1998. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Rupp, G. S. 1994. Obtenção de reprodutores, indução á desova, cultivo larval e pós larval de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus,1758)(Bivalvia - Pectinidae). Florianópolis: UFSC, 1994,125p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

- Schurink, C. E. e Griffiths, C. L. 1991. A comparison of reproductive cycles and reproductive output in four southern African mussel species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 76: 123-134.
- Seed, R. e Brown, R. A. 1977. A Comparison Of The Reproductive Cicles Of *Modiolus modiolus*, *Cerastoderma edule*, *Mytilus edulis* In Strangford Lough, Northern Ireland. *Oecologia (Berl.)* 30, 173-188.
- Snodden, L. M. e Roberts, D. 1997. Reproductive patterns and tidal effects on spot settlement of *Mytilus edulis* populations in dundrum bay, northern ireland. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, 77, 229-243.
- Spencer, B. E. 2002. *Moluscan shellfish farming.*
- Uriarte, I. et al. 2001. Producción de juveniles de Pectinídeos iberoamericanos bajo condiciones controladas. In: *Los moluscos Pectinídeos de iberoamérica: Ciencia e Acuicultura* A. N. Maeda Martinez (ed.) Cap. 8: 147-171.
- Utting, S. e Spencer, B. E. 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. MAFF Lab. Leaflet, Fish. Res. n. 68, Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, UK.
- Vélez, R. A. 1971. Flutuacion mensual del indece de engorde del mejillon *Perna perna* natural e cultivado. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente* 10 (2): 3-8.
- Vélez, R. A. e Epifanio, C. E. 1981. Effects of temperature and gametogenesis and growth in the tropical mussel *Perna perna* (L.) *Aquaculture* 22, p. 21-26.
- Vélez, R. A. e Martinez, E. R. 1967. Reproducción y desarrollo larval experimental del mejillón comestible em Venezuela *Perna Perna* (Linnaeus, 1758). – *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente* 6 (2): 266-285.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA APRESENTAÇÃO

- AGUIRRE, M. C. G.; RAMIREZ, L. F. B. **Ciclo reprodutivo del mejillon *Modiolus capax* (C., 1837) em Baía de Los Angeles**. Baja Califórnia, México: Na. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 15 (1): 157-170, 1989.
- ALFARO, A. C.; JEFFS, A. G.; HOOKER, H. S. Reproductive behavior of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, in northern new zealand. **Bulletin of Marine Science**. 69(3): 1095-1108, 2001.
- ANDREU, B. El mejillón en Europa. II - **Aspectos biológicos y ecológicos; enemigos y parasitos**. Anais Acad. Bras. Ciênc. 47 (supl.): 23-36, 1976.
- ARAÚJO, C. M. M. y. **Desenvolvimento embrionário do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia): análises em microscopia de luz e microscopia de varredura**. São Paulo: USP, 1995. 109 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biociências Universidade de São Paulo.
- BUCHANAN, S.; BABCOCK, R. Primary and secondary settlement by the greenshell mussel *Perna canaliculus*. **Journal of Shellfish Research**. v. 16. n.1. p. 71-76, 1997.
- CASAS, M. G. **Ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (Liné, 1758) (Mollusca: Bivalvia) na Ilha de Santa Catarina**. Monografia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 41 p. 1986.
- CROSBY, M. P.; GALE, L. D. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. **J. Shellfish Res.** 9: 233-237, 1990.
- DYE, A. H. et al. Recovery and recruitment of the brown mussel, *Perna perna* (L.), in Transkei: implications for management. **S. Afr. J. Zool.** 32(4): 118-123, 1997.
- FERNANDES, A. C. B. **Larvicultura do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758)**. Rio de Janeiro, 85 p. 1988.
- FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. Capítulo IX. Cultivo de Mexilhões. p. 221-251. In.: POLI, C. R. (org.). **Aqüicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 456 p. 2003.

GARCIA, P. **Estudo do ciclo gonadal do mexilhão *Perna perna* (Linne, 1758) (Mollusca, Bivalvia) na região do Pântano do sul na Ilha de Santa Catarina.** Florianópolis, 1990. Monografia, Universidade Federal de Santa Catarina.

GARCIA, P. **Obtenção de sementes de mexilhão em Florianópolis – SC e a sustentabilidade do cultivo.** Florianópolis, 2001, 72 p. Monografia de especialização, Universidade Federal de Santa Catarina.

GOSLING, E. **Bivalve molluscs: Biology, Ecology and Culture.** Oxford: Fishing News Books, 2003, 443 p.

GOSLING, E. **The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture.** Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 25. Amsterdam: ELSEVIER, 1992, 589 p.

HICKMAN, R. W.; ILLINGWORTH, J. Condition Cycle of the Green-Lipped Mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. **Marine Biology.** 60, p. 27-38, 1980.

LUNETTA, J. E. Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus perna* L. Mollusca Lamellibranchia). **Bol. Zool. Biol. Mar.** São Paulo. 26, p. 33-111, 1969.

MAGALHÃES, A. R. M. **Efeito da parasitose por trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna* (L.).** São Paulo: USP, 1998, 185 p. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

MAGALHÃES, A. R. M. **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné,1758) em função do ciclo sexual.** São Paulo: USP, 1985. 177p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

NEWELL, R. I. E. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (*Bivalvia mytilidae*) from localities on the east coast of the United States. **Biol. Bull.** 162: 299-310, 1982.

RAMIREZ, S. C.; MARTINEZ, J. C. Settlement of the blue mussel *Mytilus Galloprovincialis* Lamark on artificial substrates in Bahia de Todos Santos B.C., México. **Journal of Shellfish Research.** v. 18, n. 1, p. 33-39, 1999.

ROSA, R. C. C. **Impacto do cultivo de mexilhões nas comunidades pesqueiras de Santa Catarina.** Dissertação de mestrado, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, UFSC, 188 pp, 1997.

ROUTLEDGE, E. A. B. **Larvicultura do mexilhão *Perna perna* (L.) alimentados com diferentes composições de microalgas.** Florianópolis, 1998, 106 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.

SCHURINK, C. E.; GRIFFITHS. Physiological energetics of four south african mussel species in relation to body size, ration and temperature. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 101 (4): 779 -789, 1992.

SEED, R.; BROWN R. A. **A comparison of the reproductive cycles of modiolus modiolus, cerastoderma edule, and Mytilus edulis.** In: Strangford Lough, Northern Ireland. *Oecologia (Berl.)* 30, p. 173-188, 1977.

SILVA, P. M.; MAGALHÃES, A. R. M.; BARRACCO, M. A. Effects of bucephalus sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology.** 79: 154–162, 2002.

SPENCER, B. E. **Moluscan shellfish farming.** 2002.

UTTING, S.; SPENCER, B. E. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. MAFF Lab. Leaflet, Fish. Res. n. 68, Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, UK. 31 p. 1991.

VÉLEZ, A. R. Flutuacion mensual del indice de engorde del mejillon *Perna perna* natural e cultivado. **Bol. Inst. Oceanogr.** Univ. Oriente, 10 (2): 3-8, 1971.

WINCKLER DA COSTA, S. **Aqüicultura e pesca em santa catarina.** EPAGRI Janeiro de 2003. Florianópolis Santa Catarina. 10 p.

ANEXO A
NORMAS DE PUBLICAÇÃO

JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY

Checklist for Manuscript Preparation

I. General Instructions

- ___ Type or print manuscripts on 22 x 28 cm (8½ x 11 inch) or A4 (21 x 30 cm) paper.
- ___ Use any standard 10 or 12 pt typeface. Do not use italic, bold, or other non-standard type. Underline words to be italicized. Do not justify right margins. Indent the first sentence of all paragraphs.
- ___ Double-space throughout, including title page, abstract, literature cited, tables, and figure legends.
- ___ Leave at least a 2.5-cm (1-inch) margin on all sides.
- ___ Do not hyphenate a word at the end of a sentence.
- ___ Number *all* pages sequentially.
- ___ Use metric units of measurement. When needed, English equivalents may be given in parentheses.
- ___ Abbreviations accepted without definition are listed on the inside back cover of the *Journal*. Designate temperature as 20 C. Define all other abbreviations the first time they are used.
- ___ Express ratios by using a slant line (e.g., mg/L).
- ___ Scientific names should accompany common names in the title and when they are first mentioned in the abstract and in the text. Authority for scientific names need not accompany the genus and species unless needed for clarity.
- ___ Spell out one to ten unless followed by a unit of measurement (e.g., four fish, 4 kg, 14 fish). Do not begin a sentence with a numeral. Use 1,000 instead of 1000; 0.13 instead of .13; and % instead of percent.
- ___ Use the 24-hour clock for dial time: 0830, not 8:30 a.m. Calendar date should be day month year (7 August 1990).
- ___ Each reference cited in the text must be listed in the Literature Cited section, and vice versa.
- ___ Literature citations in the text follow the name-and-year system.
 1. One author: Jones (1994) or (Jones 1994)
 2. Two authors: Smith and Jones (1994) or (Smith and Jones 1994)
 3. Three or more authors: Smith et al. (1994) or (Smith et al. 1994)
 4. Manuscripts accepted for publication: Jones (in press) or (Jones, in press)
 5. Reference to unpublished data or personal communications is strongly

discouraged. If necessary, cite as R.Ishihara (Humboldt State University, unpublished data) or R. Ishihara (Humboldt State University, personal communication).

6. Within parentheses, use a semicolon to separate multiple citations of literature and figures and tables (Smith1991; Jones 1994) (Table 1; Fig. 2). Cite multiple references within parentheses by year, with the oldest first. Use "Figure" only to start a sentence; otherwise use "Fig." or "Figs." (e.g., Fig. 5; Figs. 5, 6). Spell out "Table" in all usages.

Assemble the manuscript in this order: title page, abstract page, text, literature cited, tables, figure legends, figures.

II. Title Page (Page 1)

Near the middle of the page, type the title of the paper, centered, in capital and lower case letters (e.g., Acute Toxicity of Copper Sulfate to Channel Catfish *Ictalurus punctatus*).

Below the title, type the author(s) names, affiliation(s), and unabbreviated complete address(es). If the author is currently at another location, include a superscript number after the name and provide the full present address as a footnote.

In papers written by authors at different addresses, type the name and address of the first author, the name and address of the second author, and so on.

In multiauthored papers, type "Corresponding author:" and follow with the full mailing address of the author responsible for correspondence. Type this near the bottom of the page, but above any footnotes.

III. Abstract page (Page 2)

Type the heading "Abstract," centered, at the top of the page.

Abstract must be one paragraph. Do not cite references or use abbreviations other than those listed on the backcover of the *Journal*.

Be concise (normally not more than 3% of the text length) but include why you did the study, how you did it, the results of the study, and what the results mean.

"Communications" do not have an abstract.

IV. Text (Beginning on page 3 for full papers; on page 2 for Communications)

Follow general instructions in Section I.

Begin with an introduction that concisely establishes the purpose and importance of the work. Do not use a heading for this section.

Subsequent sections in the text should include centered headings in capital and lower case letters. Typical main headings are Materials and Methods, Results,

Discussion, and Acknowledgments. Do not start these sections with a new page.

___ Second level headings (if required) are centered, in capital and lower case letters, and underlined. Do not use third level headings.

___ Acknowledgments should contain grant and contribution numbers. Acknowledge only those people and institutions that contributed directly to the research or manuscript quality.

V. Literature Cited

___ Start this section at the top of a new page.

___ Verify all entries against citations in the text.

___ Verify the accuracy of all entries against the original sources, especially journal titles, authors, pages, and spelling.

___ Start the first line of each entry at the left margin and indent other lines.

___ Alphabetize entries first by the surnames of the senior authors and first word or acronym of corporate authors; second by the initials of senior authors with the same surname (e.g., Smith, B. F. precedes Smith, J. W.); and third, by the surnames of the junior authors. Single authored citations precede multi-authored works by the same senior author regardless of date.

___ List multiple works by the same authors by date.

___ Distinguish papers by the same author in the same year by putting lower case letters after the date (e.g. 1994a, 1994b). Be sure that such date citations within the text correspond to the dates in the Literature Cited.

___ Spell out journal names in full. The following illustrates some common citation formats.

Journal Article:

Xu, D. and W. A. Rogers. 1993. Oxytetracycline residues in hybrid striped bass muscle. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:466-472.

Book:

Boyd, C. E. 1982. *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.

Stickney, R. R., editor. 1986. *Culture of nonsalmonid freshwater fishes*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA. **Article or chapter in a book:**

Ward, P. D. 1982. The development of bacterial vaccines for fish. Pages 47-58 in R. J. Roberts, editor. *Microbial diseases of fish*. Academic Press, New York, New York, USA.

Dissertation or Thesis:

Hymel, T. M. 1985. *Water quality dynamics in commercial crawfish ponds and toxicity of selected water quality variables to *Procambarus clarkii**. Master's thesis.

Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

VI. Tables (Continue page numbering)

- ___ Start each table on a new sheet.
- ___ Double space everything, including title, column headings, and all entries. Do not reduce type size in an effort to fit the table on one page. Use the same size type as the text. Print tables broadside, if necessary, to allow adequate margins. In extreme instances, continue the table on a second page.
- ___ Type the table caption at the top of the page. Start at the left margin with the table number, which should be in arabic followed by a period (e.g., Table 4.). Follow with the table title using sentence-style capitalization (not title-style).
- ___ Place a single horizontal line beneath the table title.
- ___ Use single horizontal lines to separate column heads.
- ___ Use a single horizontal line to indicate the end of the table.
- ___ Do not use vertical lines in the table.
- ___ Indicate footnotes by lowercase superscript letters (a, b, c, etc.).

VII. Figure Legend (Continue page numbering)

- ___ List all figure captions sequentially on one or more pages, double spaced. Do not use a separate page for each caption and do not put captions on the same page as the figure.
- ___ Type the first line at the margin for each entry. Indent other lines. Spell out "Figure" followed by an Arabic number. Use sentence-style capitalization of the caption:
Figure 1. Growth of *Peneaus setiferus* over time at various combinations of water exchange and stocking density. ___ Do not include symbols (dots, circles, triangles, etc.) in the figure captions. Label them in the figure or refer to them by name in the caption.
- ___ Do not refer to magnification of photomicrographs in the caption: figures will be reduced when printed so they will be wrong if given in the caption. Place a bar scale directly on each photo and give its equivalent length in the caption (e.g., bar = 25 μm).

VIII. Illustrations

Line Drawings

- ___ Submit xerographic copies of line drawings with the initial manuscript submission. Original artwork should be submitted with the final accepted manuscript copy. Original line drawings give best printing fidelity and should be drawn in black ink with mechanical drafting equipment or output through a laser printer. Photographs of line drawings are often slightly out of focus and are not

encouraged.

- Lettering should be clear and large enough to withstand at least 50% reduction without becoming illegible. A clean sans serif typeface (such as Helvetica or Univers) is preferred. Lettering on a figure 20 cm wide should be at least 4.5 mm high (18-point type) to withstand reduction.
- Typed or handwritten letters or symbols are unacceptable.
- Write a small number near the top, right-hand corner of each illustration for cross reference with the figure caption.

Photographs

- Submit four sets of photographs with the initial manuscript submission.
- Lightly write the figure number and author's name on the back of each photograph. Indicate the top of each photo.
- Print photographs on glossy paper with good contrast.
- Color illustrations will not be accepted without approval of the editor. The cost of color reproduction must be paid for by the author.

IX. What and Where to Submit

- Submit four high-quality copies of the manuscript, tables, and line drawings. Submit four sets of photographs.
- Submit a cover letter that includes (1) a statement that no substantial part of the manuscript has been published or submitted for publication elsewhere; (2) a list of colleagues who have seen or reviewed the manuscript in draft; (3) complete mailing address and any address change during the next several months for the corresponding author; and (4) telephone, FAX, and e-mail address for the corresponding author.
- Submit this checklist with completed items marked.
- Make sure that everything is adequately packaged for mailing.
- Submit to:

Dr. Harry Daniels
North Carolina State University
Department of Zoology
Campus Box 7617
Raleigh NC 27695
USA

Questions?

Phone +1 919 515 4589 - FAX: +1 919 515 5327 - e-mail: harry_daniels@ncsu.edu