

SOBREVIVÊNCIA APÓS INDUÇÃO À TRIPLOIDIA EM LARVAS *Anomalocardia brasiliana* (VENERIDAE) POR TRATAMENTO QUÍMICO, HIPOTÔNICO E TÉRMICO

Henrique David LAVANDER²; Priscilla Celes Maciel de LIMA¹; Leônidas de Oliveira CARDOSO JUNIOR¹; Lucas Areias BASSUL²; Sérgio de Almeida PICONI²; Paulo Henrique Rocha ARIDE²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Laboratório de Maricultura Sustentável, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Ifes, Rua Augusto Costa de Oliveira, nº 660, Praia Doce, CEP 29285-000, Piúma, ES, Brasil.

henrique.lavander@ifes.edu.br

Recebido em 20/04/2018

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

Palavras-chave: Molusco bentônico; manipulação cromossômica; tratamentos físicos.

SURVIVAL AFTER INDUCTION TO TRIPLOIDIA IN *ANOMALOCARDIA BRASILIANA* (VENERIDAE) THROUGH CHEMICAL, HYPOTONIC AND THERMAL TREATMENT

Abstract - Polyploidy is an alternative to improve zootechnical performance and is widely used in aquaculture worldwide. In Brazil, the use of polyploidy techniques in molluscs, in commercial scale is limited to exotic specie of *Crassostrea gigas*. The objective of this study was to evaluate survival after application of triploidy induction protocols in Brazilian anomaly by means of chemical agents, such as Cytochalasin B (CB) and 6 - Dimethylaminopurine (6-DMAP), and physical methods by cold thermal shock and shock hyposmotic Induction to triploidia by CB was performed at 1 mg. L⁻¹, whereas 6-Dimethylaminopurine at 450 µmol.L⁻¹. Induction by cold thermal shock was performed at 2, 5 and 7 °C, and the inductions by hyposmotic shock at 12 ‰ of salinity. The chemical inductions to triploidia showed low larval survival after the first 24 hours, unlike the physical treatments, who obtained more than 90% of survival, as well as the control treatment. These results demonstrate that the physical treatments in this period are less aggressive to eggs and larvae. However, new studies should be carried out in order to improve the protocols for polyploid species.

Keywords: Benthic mollusc; chromosome manipulation; physical treatments.

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

O objetivo dos métodos de indução à triploidia em moluscos é promover a interrupção da meiose, quer seja pela retenção do primeiro corpo polar (Meiose I) ou do segundo corpo polar (Meiose II) (Colas e Dubê 1998; Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009). Estes métodos não garantem

que 100% dos indivíduos sejam triploides, devido ao desenvolvimento assincronico dos ovos durante a meiose (Li et al. 2000). Outra forma de se obter triploides é através do cruzamento de tetraploides e diploides (Guo et al. 2009; Piferrer et al. 2009). Atualmente, este segundo método é o mais usado na produção comercial de bivalves, pois este produz 100% triploides, e também diminui o risco para o manipulador (Piferrer et al. 2009; Peachey e Allen 2016).

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

(Mccombie et al., 2005; Melo et al., 2015). As soluções foram manipuladas no Laboratório de Genética Aplicada, no Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Após a fertilização dos gametas, os ovos foram submetidos aos tratamentos separadamente, aos nove minutos após fertilização de acordo com Lavander et al. (2017) (momento próximo à liberação do primeiro corpo polar). Assim os ovos foram expostos durante 15 minutos a indução por CB e por 6-DMAP, após este período, os ovos provenientes do tratamento com CB, foram imersos em solução de Dimetil Sulfoxido (DMSO) a 1% por mais 15 minutos, lavados em água marinha e filtrados em malhas de 35µm. Já na indução por 6-DMAP, os ovos foram apenas lavados em água marinha e filtrados em malhas de 35µm.

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

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

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

A taxa de sobrevivência foi calculada para cada tratamento, pela relação do número de larvas vivas após 24 horas. Tais procedimentos foram realizados com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter e microscópio óptico, assim como fotografadas. Os resultados foram descritos através do valor percentual médio e desvio padrão entre as repetições de cada tratamento. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para a comparações de médias ($p > 0,05$), com auxílio do programa Statistica 7.

Para o acompanhamento da meiose e constatação da fecundação dos ovos, amostras dos gametas (ovócitos e espermatozoides) foram realizadas durante a fertilização e liberação do corpo polar. Estas foram enxaguadas com água destilada e coradas em 8 μL de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) a uma concentração de 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Lavander et al. 2017). As imagens foram capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio de fluorescência usando o programa de software Leica QFISH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

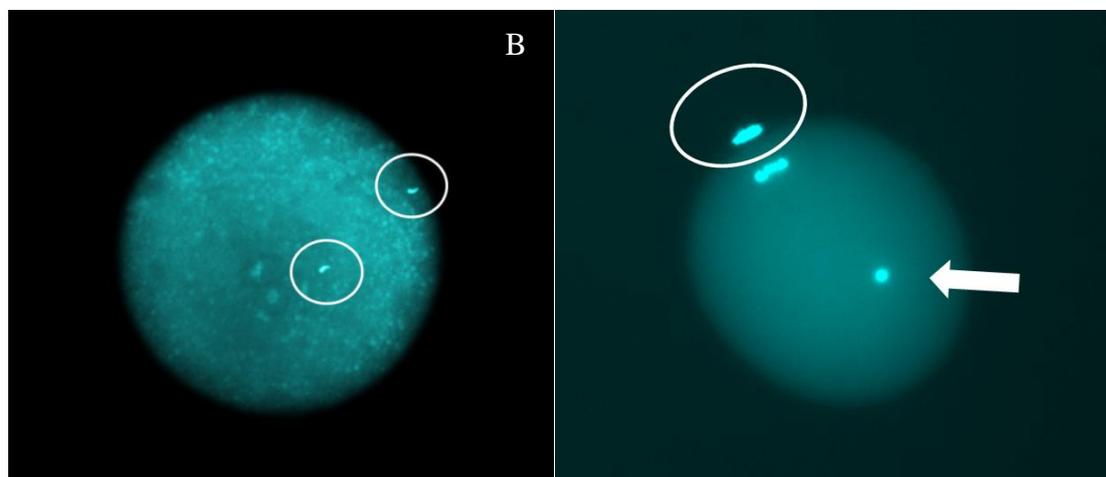


Figura 1. Gametas de *Anomalocardia brasiliiana*. (A) Ovócito com espermatozoides na parte externa em destaque nos círculos, momento antes da fertilização. (B) Em destaque no círculo, a liberação do primeiro corpo polar dez minutos pós-fertilização do ovócito e seta indicando material genético masculino.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

A indução química à triploidia por CB demonstrou baixa sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, com $29,35 \pm 0,49\%$. Neste tratamento, apenas $587 \pm 9,84$ larvas D véliger sobreviveram por réplica. Na indução por 6-DMAP, a sobrevivência larval foi de $42,50 \pm 1,39\%$ e

apenas $845 \pm 27,83$ larvas D véliger por réplica, sobreviveram as primeiras 24 horas. As larvas provenientes do tratamento controle químico (CQ) apresentaram maior sobrevivência $95,21 \pm 0,20\%$ e $1905 \pm 4,04$ larvas por réplica para o mesmo período (Figura 2).

O experimento por choque frio a 2°C apresentou mortalidade total após as primeiras 24 horas. Entretanto, a indução à triploidia por temperatura (choque frio a 5°C) demonstrou elevada sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, com $91,84 \pm 2,57\%$, e 96.435 ± 2.707 larvas D véliger por réplica. A indução à triploidia por choque frio a 7°C também demonstrou elevada sobrevivência larval após as primeiras 24 horas, com $95,45 \pm 0,81\%$, e $2.863 \pm 24,44$ larvas D véliger sobreviveram em cada réplica (Figura 2).

Nos tratamentos hipotônicos (salinidade 12‰), a sobrevivência larval também foi elevada, alcançando $93,71 \pm 0,25\%$ e 70.285 ± 187 larvas D véliger por réplica no primeiro experimento. E $94,98 \pm 2,06\%$ de sobrevivência larval, destes um total de $2.089 \pm 45,39$ larvas D véliger sobreviveram as primeiras 24 horas por cada réplica no segundo experimento. Nos tratamentos controle físico (CF1), as larvas apresentaram maior sobrevivência $96,03 \pm 3,00\%$, sendo 86.435 ± 2.710 larvas atingiram a fase D véliger neste período, em cada réplica e $96,77 \pm 1,37\%$ com $2129 \pm 85,45$ de sobrevivência no (CF2) (Figura 2).

As sobrevivências das larvas de *A. brasiliiana* foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) nos tratamentos por indução térmica, hipotônico e controle, diferindo estatisticamente dos tratamentos por indução química e física a 2°C (apresentou mortalidade total das larvas). O tratamento por CB e 6Dmap apresentaram diferença significativa entre si, e em relação a todos os outros tratamentos. O tratamento térmico a 5°C diferiu do controle físico. Já os tratamentos controle, 7°C e hipotônico 12‰ não apresentaram diferença estatística entre si de acordo com ANOVA.

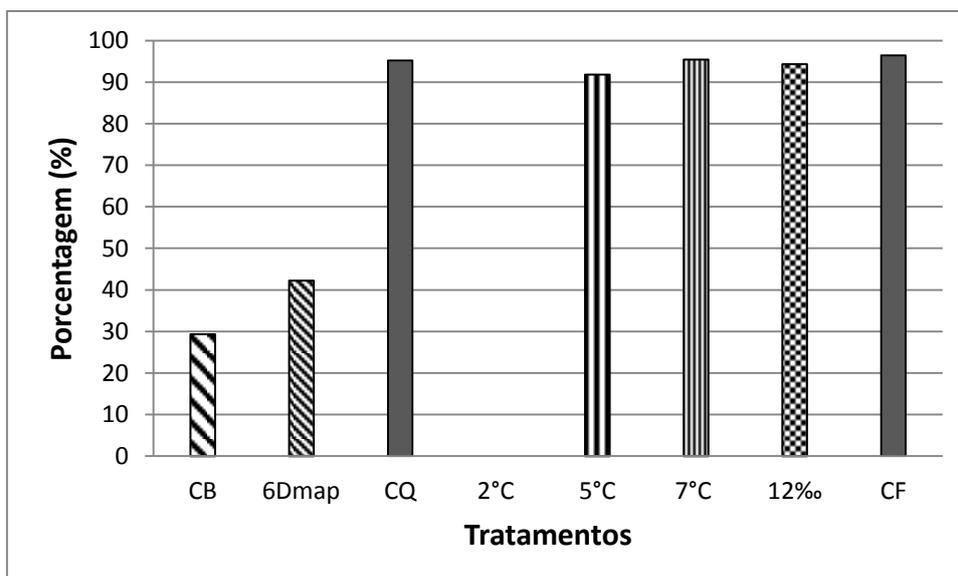


Figura 2. Sobrevivência larval após 24 horas de indução à triploidia. Tratamento (CB) Citocalasina B; (6-Dmap) 6 Dimetilaminopurina; (CQ) Controle químico; Choque térmico frio (2°C, 5°C, 7°C); (12‰) Hipotônico; (CF) Controle físico.

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

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

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

De acordo com a revisão feita por Maldonado-Amparo et al. (2016), seis estudos diferentes realizados entre 1989 e 1995 com *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* (Veneridae), utilizando citocalasina B (CB) para induzir à triploidia através de 0,5 a 1 mg/L em protocolos semelhantes ao nosso alcançaram entre 40 e 95% de êxito, mas a sobrevivência larval na fase inicial D véliger variou de 19 a 68%. Gerard et al. (1994) encontraram os maiores valores de sobrevivência larval (68%) na menor concentração de 0,5 mg/L CB utilizada, alcançando 63% de êxito na

obtenção de triploides. Já em concentração de 1,0 mg/L, apenas 31% de sobrevivência larval foi obtida com 95% de êxito na obtenção de triploides. Tais estudos demonstram uma grande variação na sobrevivência larval por esse método, a despeito dos registros de alta porcentagem de êxito. No presente estudo a indução química por CB também demonstrou baixa sobrevivência larval. Alguns fatores abaixo podem ajudar a explicar esses valores obtidos, que foi descrito por Guo et al. (2009), relataram resultados semelhantes em uma revisão envolvendo diversos artigos produzidos entre 1988 e 1996, para espécies de bivalves de sedimento. Downing e Allen (1987) descreveram alguns dos principais fatores que influenciam a eficácia da CB para induzir a triploidia, sendo eles a dosagem, a duração do tratamento, e a temperatura em que o tratamento é realizado, pois a variação da temperatura afeta a velocidade dos eventos meióticos.

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

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

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

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

Diversos pesquisadores obtiveram êxitos na triploidia por manipulação da temperatura, como Quillet e Panelay (1986), Yamamoto e Sugawara (1988) e Toro e Sastre (1995). Gosling e Nolan (1989) observaram 56% de triploides através da indução por choque térmico à 32°C em *Ruditapes*

philippinarum (Veneridae), ressaltando a facilidade para aplicação da técnica e ausência de riscos por manipulação.

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

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

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

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

Nossos resultados comprovaram que tanto os choques térmicos (5 e 7°C), como o choque hipotônico a 12‰ em ovos de *A.brasiliana* geraram as maiores taxas de sobrevivência larval, compatíveis com os controles. No entanto, a falta de informação sobre o percentual de êxito em todos os métodos empregados, nos impede de indicar a metodologia mais promissora para a obtenção de triploides.

Podemos especular que se o objetivo da técnica venha a ser produzir triploides em larga escala, que os métodos químicos não serão eficientes em produzi-los em quantidade. Se a obtenção de tetraploides para a geração de triploides vier a ser objetivo dessa atividade, então os métodos químicos poderão ser considerados, se comprovada sua eficiência quanto à taxa de sucesso, independente da sobrevivência, uma vez que o quantitativo (sobrevivência) teria menor importância.

CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- COLAS, P. & DUBÉ, F. (1998). Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Sem. Cell & Develop. J. Biol.*, 9: 539-548.
- DESROSIERS, R.R., QARD, A.G., PEIGNON, J.M., NACIRIB, Y., DUFRESNE, L., MORASSE, J., LEDU, C., PHELIPOTB, P., GUERRIER, P. & DUB, F. (1993). A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6 dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170: 29-43.
- DONG, Y., YAO, H., LIN, Z. & ZHU, D. (2012). The effects of sperm- egg ratios on polyspermy in the blood clam, *Tegillarca granosa*. *J. Aqua. Res.*, 43:44-52.
- DOWNING, S.L. & ALLEN, S.K. (1987). Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61: 1-15.
- EUDELIN, B., ALLEN, S.K., & GUO, X. (2000). Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid Production. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247: 151-161.
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. In: *The State of World Fisheries and Aquaculture*. (220 pp);

- ROME.FJELLDAL, P.G., WENNEVIK, V., FLEMING, I.A., HANSEN, T. & GLOVER, K.A. (2014). Triploid (sterile) farmed Atlantic salmon males attempt to spawn with wild females. *J. Aqua. Environ. Interac.* 5: 155-162. doi: 10.3354/aei00102.
- GERARD, Y.A., NACRI, C., NOIRET, C., LEDU, J., PEIGNON, M. & PHELIPOT, P. (1994). Induced triploidy in the European clam, *Ruditapes decussatus* (L.), and performance of triploid larvae. *Aquaculture and Fisheries Management.* 25: 769-779.
- GROTTA, M. & LUNETTA, J.E. (1980). Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) do litoral do Estado da Paraíba. *Revista Nordestina de Biologia.* v.3(1), p.5-55.
- GOSLING, E.M. & NOLAN, A. (1989). Triploidy Induction by Thermal shock in the manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture.* 78: 223-228.
- GOSLING, E.M. (2003). Bivalve molluscs. *Oxford: Fishing News Books.* 443 p.
- GUO, X., HERSHBERGK, W.K., COOPER, K. & CHEW, K. (1992). Genetic consequences of blocking polar body I with Cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. II. Segregation of chromosomes. *Bulletin Biology.* v.183, p.387-393.
- GUO, X., WANG, Y., XU, Z. & YANG, H. (2009). Chromosome set manipulation in shellfish. in: *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental management*, G. Burnell and G. Allan (eds). *Woodhead Publishing.* p.165-195.
- HAWKINS, A.J.S., DAY, A.J., GERARD, A., NACIRI, Y., LEDU, C., BAYNE, B.L. & HERAL, M. (1994). A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* v.184, p.21-40.
- KONG, J., WANG, Z., YU, R., LIU, J. & ZHANG, Y. (2011). Triploid induction in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by hypotonic treatment and comparison with other induction methods. *Journal of Fishery Sciences of China.* 18(3):581-587. doi: 10.3724/SP.J.1118.2011.00581
- LAGREZE, F.J.S., ALBUQUERQUE, M.C.P., ARAUJO, J., SÜHNEL, S. & MELO, C.M.R. (2015). Survival and growth of the native clam *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) larvae in laboratory. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo,* 41(1): 133-143.
- LAVANDER, H.D., SILVA NETO, S.R., SOBRAL, S.C., LIMA, P.C.M., RÊGO, M.G. & GÁLVEZ, A.O. (2014). Manutenção e reprodução de *Anomalocardia brasiliiana* em condições laboratoriais. *Rev. Bras. Ciên. Agr.* 9(2): 269-276.

- LAVANDER, H., DOS SANTOS, G., OLIVERA, A., CARVALHO, R., GUERRA, M. & COIMBRA, M.R.M. (2017). Meiosis Maturation in the Marine Clam *Anomalocardia brasiliiana* (Veneridae). *Journal of Shellfish Research*. 36(3):601-605. doi: 10.2983/035.036.0308.
- LI, Q., OSADA, M., KASHIHARA, M., HIROHASHI, K. & KIJIMA, A. (2000). Meiotic maturation, fertilization and effect of ultravioleta irradiation on the fertilizing sperm in the Japanese scallop Fish. *Scien.* 66:403-405.
- LIMA, M.A., SOARES, M.O., PAIVA, A.C.C., OSÓRIO, F.M., PORFÍRIO, A.F. & MATTEWS-CASCON, H. (2009). Osmorregulação em moluscos: o caso do bivalve estuarino tropical *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia). *Conexões: Ciência e Tecnologia*. v. 3, p.79-84.
- MCCOMBIE, H., LEDU, C., PHELIPOT, P., LAPEGUE, S., BOUDRY, P. & GERARD, A. (2005). A Complementary Method for Production of Tetraploid *Crassostrea gigas* Using Crosses Between Diploids and Tetraploids with Cytochalasin B Treatments. *Marine Biotechnology*. 7: 318–330.
- MALDONADO-AMPARO, R., VERDUGO, C.A.R., IBARRA, A.M., RUEDA-PUENTE, E.O., DEL TORO SÁNCHEZ, C.L. & FÉLIX, F.R. (2016). Poliploidía en Moluscos de Importancia Comercial. A Review. *European Scientific Journal*. 12(33): 69-102.
- MELO, E.M.C., GOMES, C.H.A.M., SILVA, F.C., SÜHNEL, S. & MELO, C.M.R. (2015). Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 41(4): 889-898.
- MENG, Q., BAO, Z., WANG, Z., WANG, S., HU, J., HU, X. & HUANG, X. (2012). Growth and reproductive performance of triploid yesso Scallops (*Patinopecten yessoensis*) induced by hypotonic shock. *J. Shell. Res.*, 31(4):1113-1122.
- NELL, J.A. (2002). Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210: 69-88.
- OLIVEIRA, I.B., SILVA NETO, S.R., LAVANDER, H., LIMA, P. & GÁLVEZ, A.O. (2016a). Growth and survival of *Anomalocardia brasiliiana* larvae (Bivalvia: Veneridae) fed with microalgal diets. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44(1):34-38.
- OLIVEIRA, R.L.M., LAVANDER, H.D., SANTOS, L.B.G., CALAZANS, N.K.F., GÁLVEZ, A.O. & PEIXOTO, S.R.M. (2016b). Hatchery Rearing of the Venerid Clam (Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research*, 35: 27-30.

- PEACHEY, B.L. & ALLEN, S.K. (2016). Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 450: 199-205.
- PIFERRER, F., BEAUMONT, A., FALGUIÈRE, J.C., FLAJSHANS, M., HAFFRAY, P. & COLOMBO, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293: 125-156.
- QUILLET, E. & PANELAY, P.J. (1986). Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 57: 271-279.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (1976). *Alguns aspectos ecológicos e análise da população de Anomalocardia brasiliana (Gmelin, 1791) na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba Estado de São Paulo*. 119p. [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo.
- STANLEY, J.G., HIDU, H. & ALLEN JR., S.K. (1984). Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*. v.37, p.147-155.
- TORO, J.E. & SASTRE, H.D. (1995). Induced triploidy in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854), and performance of triploid larvae. *Journal of Shellfish Research*, 14: 161-164.
- TURGEON, D.D., LYONS, W.G., MIKKELSEN, P., ROSENBERG, G. & MORETZSOHN, F. (2009). Bivalvia (Mollusca) of the Gulf of Mexico. In: Gulf of Mexico - Origins, Waters, and Biota. Biodiversity. *Texas A&M University Press, Texas*. p.711-744.
- YAMAMOTO, S. & SUGURAWARA, Y. (1988). Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*. 72: 21-29.
- YANG, H., ZHANG, F. & GUO, X. (2000). Triploid and Tetraploid Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, Produced by Inhibiting Polar Body I. *Mar. Biotechnol.* 2: 466-475.
- YANG, H. & GUO, X. (2006). Polyploid induction by heat shock- induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. *Aquaculture*. 252:171-182.
- WANG, Z., GUO, X., ALLEN, S. K. & WANG, R. (2002). Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. *Aquaculture*, 204: 337-348.

WANG, Z., ZHAO, T., YU, R. & ZHANG, C. (2009). A new method for triploid induction by hypotonic treatment in scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Ocean Univ. China*, 39: 193-196.

WANG, H., ZHU, X., WANG, Y., LUO, M. & LIU, Z. (2012). Determination of optimum temperature and salinity for fertilization and hatching in the Chinese pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker). *Aquaculture*. 358-359: 292-297.

WORMS EDITORIAL BOARD (2016). World Register of Marine Species. Acessado em 02 de janeiro de 2016 em <http://www.marinespecies.org> at VLIZ.

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