

Improvement of European native clams' cultivation
Ruditapes decussatus and *Venerupis corrugata*
in a commercial hatchery

Telma Vieira Nunes

2024

Improvement of European native clams' cultivation
Ruditapes decussatus and *Venerupis corrugata*
in a commercial hatchery

Telma Vieira Nunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Especialista Teresa Baptista e
coorientação da Doutora Andreia Cruz e do Doutor Eric Guévelou

2024

Título: Improvement of European native clams' cultivation *Ruditapes decussatus* and *Venerupis corrugata* in a commercial hatchery

Copyright © Telma Vieira Nunes

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2024

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado é fruto não apenas de um esforço pessoal, mas também do apoio de diversas pessoas que me deram incentivo intelectual e emocional. Por esse motivo, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Especialista Teresa Baptista, pela paciência, por todo o conhecimento transmitido, e por desde o início me ter apoiado neste longo percurso.

Aos meus coorientadores Doutora Andreia Cruz e Doutor Eric Guévelou do Centro Biomarinho da Oceano Fresco, por me terem sugerido este projeto e pelo apoio e sabedoria que foram um pilar essencial para que este trabalho fosse possível.

À Mestre Carolina Tchobanov, e Mestre Damiana Pires por terem estado ao meu lado, por me terem ajudado nas análises de bioquímica e de histologia e especialmente por me terem aturado!!

A toda a equipa do Centro Biomarinho da Oceano Fresco!

Finalmente, aos meus pais e amigos, que me encorajaram a cada momento e não permitiram que desistisse.

Obrigada a todos!

Abstract

In recent years, clam production in Europe has declined due to various factors, including overfishing, abiotic stress, diseases, and recruitment failure. Seed production in hatcheries has become essential to ensure the sustainability of clam production. Artificial breeding conditioning enables hatcheries to extend their production season, reducing dependency on the specific period when wild bank clams naturally mature.

In many bivalve molluscs determining sex and reproductive stage non-lethally is challenging. In bivalve aquaculture, monitoring sexual maturation is crucial for determining the optimal time to induce spawning events for seed production. Anaesthesia is commonly used in aquaculture to facilitate tissue biopsies and for gametogenesis studies. The primary goal of this study was to enhance cultivation methods in commercial farming of native European species like *Ruditapes decussatus*, particularly during critical phases such as conditioning. Initially, the study evaluated the effect of a sandy substrate on *R. decussatus* broodstock conditioning. Subsequently, an assay was conducted to develop a non-lethal method for assessing gonad development stage and sex during conditioning, as well as for collecting tissue samples for later laboratory analysis. This methodology was also tested on clams of the species *Venerupis corrugata*.

Adult specimens of *R. decussatus* were kept in an open system with and without sand during conditioning. Regular samplings were conducted to assess gonadal development, evaluating parameters such as condition index, histological analysis, and biochemical composition (glycogen, protein, and lipids). The results indicated that using sand as substrate did not impact gonadal maturity progression. In terms of biochemical composition, there was an observed increase in protein content during the conditioning period. Significant differences in biochemical composition were noted between the two conditions (with sand/without sand) at the end of the conditioning period.

For the method of collecting biological samples, individuals of each species, *R. decussatus*, and *V. corrugata*, were anesthetized with magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at a concentration of (50g/L). The percentage of anesthetized clams was assessed every hour to determine the effectiveness of the anesthetic. In a subsequent trial, the optimal dosage of the anesthetic for each clam species was determined based on the initial test. Anesthetized clams were also subjected to gonad biopsies for sex determination. The results showed that at a concentration of 50g/L, it took 5 hours for 80% of *V. corrugata* individuals to become anesthetized. However, in *R. decussatus*, a mortality rate of 23.33% was observed among individuals undergoing biopsy procedures. Despite this, gonadal tissue collected via biopsy enabled the determination of an individual's sex through microscopic examination.

The results of this study represent a significant advancement in the conditioning of breeding stock in hatchery units. This study provides valuable insights into how the overall condition of individuals before exposure to experimental conditions influences conditioning success. Additionally, it facilitated the development of a non-lethal method for evaluating sex and collecting biological samples in *R. decussatus* and *V. corrugata*. These findings lay a solid foundation for future research and practical applications in bivalve aquaculture management and reproductive studies.

Keywords- Bivalve; Broodstock conditioning; *Ruditapes decussatus*; Substrate; Anaesthesia; Biopsy; *Venerupis corrugata*;

Resumo

Na Europa, nos últimos anos, a produção de amêijoas diminuiu devido a inúmeros fatores, como a sobrepesca, o stress abiótico, doenças e a falha no recrutamento. A produção de sementes em maternidades tornou-se essencial para garantir a sustentabilidade da produção de amêijoas. Assim, o acondicionamento artificial de reprodutores permite que as maternidades estendam a sua temporada de produção, reduzindo a dependência do período do ano em que as amêijoas dos bancos selvagens se tornam naturalmente maduras.

Na maioria dos moluscos bivalves é difícil determinar o sexo e a fase reprodutiva de forma não letal. Em aquacultura de bivalves, a maturação sexual deve ser monitorizada e avaliada para determinar o melhor momento para induzir eventos de desova para a produção de semente. A anestesia é utilizada em aquacultura para facilitar biópsias de tecidos e para estudos de gametogénese. O presente estudo teve como objetivo principal contribuir para a melhoria do método de cultivo em maternidade comercial de espécies autóctones europeias como *Ruditapes decussatus*, especialmente durante a importante fase de acondicionamento. Para isso, numa primeira fase avaliou-se o efeito de um substrato arenoso no acondicionamento de reprodutores de *R. decussatus*. Numa segunda fase, realizou-se um ensaio com o objetivo de desenvolver um método não letal para avaliar o estágio de desenvolvimento da gónada durante o acondicionamento, o sexo, assim como recolher amostras de tecido para posterior análise em laboratório. Este método foi igualmente testado em amêijoas da espécie *Venerupis corrugata*.

Espécimes adultos de *R. decussatus* foram acondicionados com e sem areia num sistema aberto. Durante o acondicionamento foram realizadas amostragens para avaliar o desenvolvimento das gónadas. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: índice de condição, análise histológica e composição bioquímica (glicogénio, proteína e lípidos). Os resultados mostraram que o uso de areia como substrato não teve qualquer efeito na evolução da maturação gonadal. Nos parâmetros de composição bioquímica, observou-se um aumento no teor de proteínas durante o período de acondicionamento. Entre as condições (com areia /sem areia) foram observadas diferenças significativas na composição bioquímica no final do período do condicionamento.

Para o método de recolha de amostras biológicas, foram anestesiados indivíduos de cada espécie, *R. decussatus* e de *V. corrugata*. Foram expostos ao anestésico cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) com uma concentração de (50g/L). A cada hora, o número de amêijoas anestesiadas foi avaliado para determinar a percentagem de amêijoas anestesiadas. Num segundo ensaio determinou-se a dose ideal para cada espécie de amêijoas com base no primeiro teste. As amêijoas anestesiadas foram ainda sujeitas a uma biópsia da gónada para a determinação do sexo. Para a concentração de 50g/L foram necessárias apenas 5 horas para que 80% dos indivíduos de *V. corrugata* ficassem anestesiados. Em *R. decussatus*, observou-se uma mortalidade de 23,33% nos indivíduos que

foram sujeitos à biópsia. A recolha de tecido gonadal através da biópsia permitiu a determinação do sexo dos indivíduos através da observação microscópica.

Os resultados deste estudo constituem um passo importante para a melhoria do acondicionamento de reprodutores em maternidades. Este estudo servirá de base para entender que o estado geral dos indivíduos antes da exposição às condições experimentais determina o sucesso do acondicionamento. Permitiu ainda desenvolver um método não letal para a avaliação do sexo e recolha de amostras biológicas em *R. decussatus* e *V. corrugata*.

Palavras-chave- Bivalves; Acondicionamento de reprodutores; *Ruditapes decussatus*; *Venerupis corrugata*; Substrato; Anestesia; Biópsia.

Índice Geral

Abstract	viii
Resumo	x
1 Introdução	1
1.1 Gametogénese e composição bioquímica	6
1.2 Técnicas de amostragem não letais	8
2 Materiais e Métodos	11
2.1 Recolha dos animais e aclimação	11
2.2 Desenho experimental – acondicionamento dos reprodutores	11
2.3 Rotinas diárias	12
2.4 Cultivo de microalgas	13
2.5 Plano de amostragem e análises	14
2.5.1 Recolha de dados biométricos	14
2.5.2 Avaliação de infeção por <i>Perkinsus</i> sp. por RFTM	15
2.5.3 Avaliação do estado de maturação em fresco	16
2.5.4 Índice de condição	16
2.5.5 Análise bioquímica	17
2.5.6 Análise histológica	18
2.6 Método para recolha de amostras biológicas em <i>Ruditapes decussatus</i> e <i>Venerupis corrugata</i>	20
2.6.1 Determinar o tempo para anestésiar <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	20
2.6.2 Determinar a dose ideal para anestésiar <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	21
2.7 Análise estatística	21
3 Resultados	23
3.1 Acondicionamento dos reprodutores	23
3.1.1 Dados biométricos	23
3.1.2 Avaliação semi-quantitativa de infeção por <i>Perkinsus</i> sp.	23
3.1.4 Índice de condição	26
3.1.5 Análise bioquímica	27
3.1.6 Análise histológica	30
3.2 Método anestésico para <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	36
3.2.1 Tempo para anestésiar <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	36
3.2.2 Determinação da dose ideal para anestésiar <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	38
4 Discussão	42
5 Conclusão e prespectivas futuras	55

Índice de Figuras

Figura 1- Produção mundial de aquacultura (1991-2020) em milhões de toneladas, adaptado de FAO, 2022.	1
Figura 2- Fotografia do setup utilizado para o ensaio de acondicionamento dos reprodutores de <i>R. decussatus</i>	12
Figura 3- Fotografia do setup do ensaio da anestesia com <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	21
Figura 4- Fotografia de brânquia de um indivíduo <i>R. decussatus</i> , da Galiza, com um nível de infecção muito intenso (5) (ampliação 40x).	24
Figura 5- Avaliação do estado de maturação a fresco em <i>Ruditapes decussatus</i> em 2 tempos de amostragem durante o acondicionamento (T1, T2), (n=20) e (A- T1: Com areia) (B- T1: Sem areia) (C- T2: Com areia) (D- T2: Sem areia) (Estádio 1- Desenvolvimento precoce; Estádio 2- Desenvolvimento tardio; Estádio 3- Maduro; Estádio 4- Pós-desova).	25
Figura 6 - Mortalidade cumulativa expressa em % de indivíduos, ocorrida durante o período de acondicionamento (com e areia e sem areia) (T1- 41 dias e T2 -73 dias).	26
Figura 7 - Índice de condição (média±DP, n=10) em reprodutores <i>Ruditapes decussatus</i> acondicionados com 2 condições: Com areia e Sem areia, em 3 tempos de amostragem (T0, T1 e T2), (p-value<0,05).	27
Figura 8 - Teores de proteína (média±DP, n=10) em reprodutores de <i>Ruditapes decussatus</i> acondicionados com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0, T1 e T2) Os valores são expressos em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de PSLC. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas (p-value <0,05).	28
Figura 9 - Teores de glicogénio (média±DP, n=10) em reprodutores de <i>Ruditapes decussatus</i> acondicionados Com e Sem areia em 3 tempos de amostragem (T0, T1 e T2) Os valores foram expressos em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de PSLC. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas (p-value <0,05).	29
Figura 10 - Teores de lípidos (média±DP, n=10) em reprodutores de <i>Ruditapes decussatus</i> acondicionados com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0, T1 e T2) Os valores foram expressos em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de PSLC. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas (p-value <0,05).	30
Figura 11 - Percentagem do desenvolvimento gonadal de reprodutores fêmea de <i>Ruditapes decussatus</i> por tratamento (com areia e sem areia) em cada tempo de amostragem (T0, T1, T2), (Fase III- gametogénese avançada, Fase IV- Maduro e Fase V- Desova parcial).	31
Figura 12- Percentagem do desenvolvimento gonadal de reprodutores macho de <i>Ruditapes decussatus</i> por tratamento (com areia e sem areia) em cada tempo de amostragem (T0, T1, T2). (Fase III- gametogénese avançada e Fase IV- Maduro).	31
Figura 13- Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de fêmeas de <i>Ruditapes decussatus</i> . A- Gametogénese avançada, B- Maduro, C- Desova parcial e D- Pós-desova.	32
Figura 14- Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de machos de <i>Ruditapes decussatus</i> . A- Gametogénese avançada e B - Maduro.	33
Figura 15- Valores de índice gonadal (IG) (média, n=10) em reprodutores <i>Ruditapes decussatus</i> acondicionados com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0, T1 e T2) Período de repouso sexual = 0, Início da gametogénese= 3, Gametogénese avançada= 4, Maduro= 5, Parcialmente desovado= 2, Desovado= 1. O IG entre 0 (quando todos os indivíduos estão em repouso sexual) e 5 (quando todos os indivíduos estão na fase madura).	34
Figura 16- Efeito do anestésico MgCl_2 [50g/L] em <i>Ruditapes decussatus</i> e <i>Venerupis corrugata</i> (n=30).	36
Figura 17- Fotografia do grupo controlo de <i>V. corrugata</i> onde ocorreu uma desova espontânea.	37
Figura 18- Mortalidade (% indivíduos) de grupo de controlo e com anestésico MgCl_2 [50g/L] em <i>R. decussatus</i> e <i>V. corrugata</i>	37
Figura 19 - Percentagem de indivíduos anestesiados com 3 concentrações de anestésico (MgCl_2) (50 g/L, 55 g/L e 60 g/L) em <i>Ruditapes decussatus</i> (n=30)	38
Figura 20- Mortalidade (% indivíduos) com 3 concentrações de anestésico MgCl_2 (50g/L, 55 g/L, 60 g/L) e biópsia em <i>R. decussatus</i>	39

Figura 21 – Percentagem de indivíduos de <i>Venerupis corrugata</i> anestesiados com uma concentração de 50 g/L MgCl ₂ ,.....	40
Figura 22 - Mortalidade (% indivíduos) com 3 concentrações de anestésico MgCl ₂ (15 g/L, 25 g/L, 50 g/L) e biópsia em <i>V. corrugata</i>	40
Figura 23 - Observação microscópica de tecido gonadal, A- Fêmeas(10x) e B- Macho (40x).....	41

Índice de Tabelas

Tabela 1- Espécies de microalgas usadas em maternidades de bivalves em aquacultura (Kaparapu, 2018).	6
Tabela 2- Tabela representativa do plano de amostragens ao longo do ensaio.	14
Tabela 3- Índices de Ray para a semi-quantificação da intensidade da infecção por <i>Perkinsus</i> (Ray, 1966).	15
Tabela 4- Descrição de cada nível de maturação avaliada a fresco	16
Tabela 5 - Escala reprodutiva para <i>R. decussatus</i> de acordo com Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptada por Matias et al. (2013).	19
Tabela 6 - Dados biométricos (média \pm DP) recolhidos nos vários tempos de amostragem (T0: n=30; T1: n=20; T2: n=20)	23
Tabela 7- Avaliação da infecção por <i>Perkinsus</i> utilizando RFTM de acordo com a escala de Ray (Ray, 1966).	24
Tabela 8- Valores do Índice gonadal (IG) (média, n=10) <i>Ruditapes decussatus</i> , fêmeas e machos acondicionadas com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0, T1 e T2).....	35
Tabela 9- Resultados da correlação de <i>Pearson</i> entre os parâmetros analisados (r- coeficiente de correlação; n.s- correlação não significativa).	35

Lista de Abreviaturas

ANOVA- Método de análise de variância entre grupos

DGRM- Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

DHA - Ácido docosahexanóico

DP- Desvio-padrão

EPA - Ácido eicosapentanóico

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

GVBD- quebra da vesícula germinativa

IC - Índice de Condição

IG - Índice Gonadal

PSLC - Peso seco livre de cinzas

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

r - Coeficiente de correlação

T-ISO - *Isochrysis galbana* clone T-ISO

1 Introdução

A produção aquícola a nível mundial manteve a sua tendência crescente em 2020 ultrapassando 120 milhões de toneladas por ano, compreendendo um total de 87,5 milhões de toneladas de organismos aquáticos para a alimentação humana (Figura 1). Este aumento de produção vem acompanhado de um aumento do consumo *per capita* de alimentos aquáticos que terá sido fortemente influenciado pelo reforço da oferta, mas também por mudanças nas preferências dos consumidores (FAO, 2022). Em 2020, a aquacultura de moluscos representou 21,3% (17,5 milhões de toneladas) da produção total em aquacultura, com a China responsável por mais de 90% da produção (FAO, 2022).

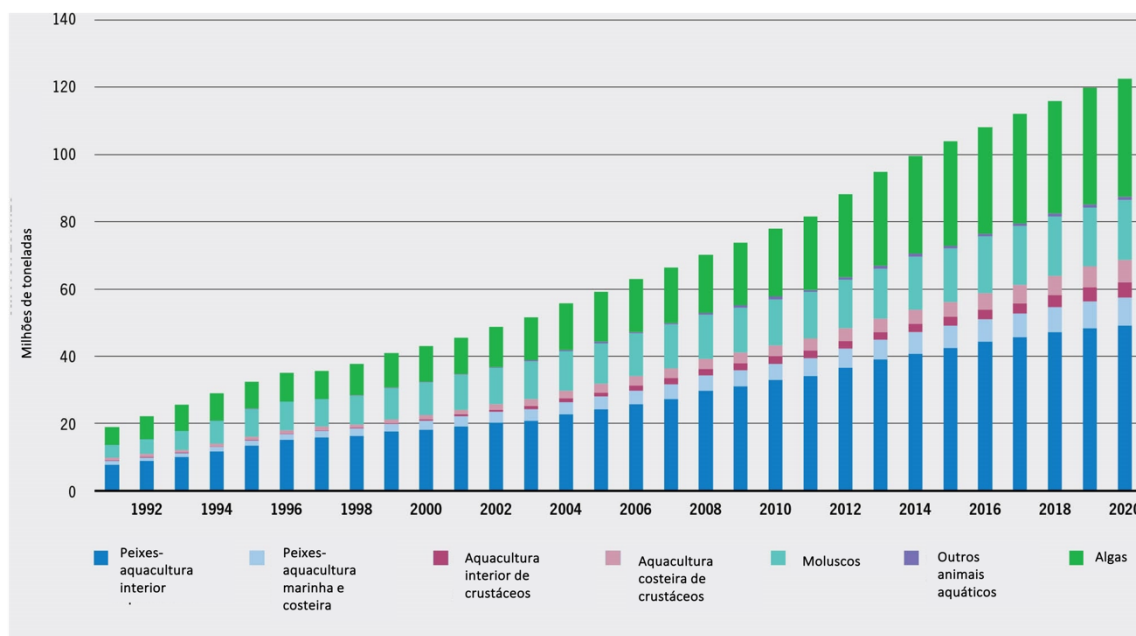


Figura 1- Produção mundial de aquacultura (1991-2020) em milhões de toneladas, adaptado de FAO, 2022.

Portugal é um país oceânico, com uma linha de costa de cerca de 2 500 km, contando com uma das maiores zonas económicas exclusivas do mundo que se estende por 1,7 milhões de km², incluindo uma grande diversidade de ecossistemas e de recursos (ENM 2021-2030). A produção aquícola em Portugal, no ano de 2020, foi de 16 999 toneladas representando um crescimento de 18,6% face a 2019 (INE, 2022). De entre as principais espécies produzidas em Portugal, os bivalves produzidos em regime extensivo

representam uma parte significativa da produção nacional. As amêijoas mantêm-se a espécie mais relevante, seguida das ostras e dos mexilhões (INE, 2022).

Para fornecer alimentos de forma sustentável para a população crescente, há a necessidade de a aquacultura se concentrar em espécies de menor nível trófico na cadeia alimentar, com baixa ou nenhuma necessidade de farinha e óleo de peixe, como ração (Jacquet et al., 2017). Os moluscos bivalves, oferecem uma das opções mais atrativas para responder a essa necessidade de sustentabilidade (Willer & Aldridge, 2019). Os bivalves marinhos são apreciados pelos consumidores devido aos seus benefícios nutricionais, bem como ao seu sabor. Os bivalves são fontes saudáveis de energia e proteína, são ricos em vitaminas (A e D), minerais essenciais (iodo, selênio e cálcio), pobres em gordura e uma boa fonte de ácidos gordos (ômega-3) (Wijsman et al., 2019).

A aquacultura de moluscos bivalves é uma prática considerada sustentável e com menos impacto no ecossistema em comparação com outras espécies que são cultivadas de forma intensiva, sendo capaz de fornecer múltiplos benefícios ao ecossistema, como por exemplo, o controlo de eutrofização, aumento da transparência da água, tem um papel regulador pela captação de carbono, favorece o crescimento de macrófitas que são indicadores de boa qualidade da água, assim como proporciona habitat para diferentes espécies como algas e pequenos crustáceos (Vélez-Henao et al., 2021). Apenas 11% da produção mundial de bivalves provem da pesca selvagem; no entanto, as sementes que são a base para a produção aquícola são muitas vezes retiradas dos bancos naturais (Wijsman et al., 2019). Existem cada vez mais fenómenos de mortalidade massiva de bivalves por todo o mundo, onde a maioria dos episódios são desencadeados por efeitos sinérgicos de um ou mais fatores bióticos ou abióticos (Iglesias et al., 2023; Samain & McCombie, 2008; Soon & Zheng, 2020; Villalba et al., 2014). Dentro dos fatores bióticos, os episódios de mortalidade causada por patógenos constituem um dos principais problemas dos cultivos (Travers et al., 2015). Têm ocorrido surtos de elevada mortalidade na produção de bivalves associado a doenças bacterianas, em particular por organismos do género *Vibrio*, mas também de origem viral de várias famílias como: Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae e Picornaviridae (Solomieu et al., 2015) e protozoários dos géneros, *Halosporidium*, *Bonamia*, *Marteilia* e *Perkinsus* (Loh et al., 2022). As questões das mudanças climáticas, particularmente o aquecimento global

e a acidificação dos oceanos, são também duas fortes ameaças que poderão aumentar a frequência e a intensidade dos surtos de mortalidade de bivalves (Peruzza et al., 2023; Soon & Zheng, 2020; Tan et al., 2020).

Os bivalves intertidais são ecologicamente e economicamente importantes, com enorme relevância no funcionamento da comunidade e na produção pesqueira mundial. Por exemplo, em locais como: rias galegas (noroeste de Espanha) (R. Domínguez et al., 2021; Macho et al., 2016), lago de Bizerte (Tunísia) (Mili et al., 2023), Golfo de San Matias (Argentina) (Narvarte et al., 2007), na província de Shandong (China) (Zhao et al., 2022) mas também na Ria Formosa e Ria de Aveiro (Portugal) (Rocha et al., 2022).

Em Portugal, as espécies presentes nesses bancos naturais são as amêijoas *Ruditapes decussatus*, *Venerupis corrugata*, e a introduzida *Ruditapes philippinarum*, o berbigão *Cerastoderma edule*, o longueirão *Solen marginatus* e o mexilhão *Mytilus* spp., nestas zonas são também cultivadas a ostra-japonesa *Crassostrea gigas* e *R. decussatus* (IPMA, 2019).

A amêijoia *R. decussatus* (Linnaeus, 1758) é um molusco bivalve da família Veneridae, e está amplamente distribuída ao longo das zonas costeiras e estuarinas da Europa e Norte de África, representa uma importante fonte de recursos devido ao seu valor comercial (Parache, 1982 & Matias et al., 2009). Devido à sua considerável importância económica e à elevada procura de mercado, a sobre-exploração da espécie tem exercido uma forte pressão sobre os bancos naturais (Ojea et al., 2004). Em Portugal, as áreas mais produtivas desta espécie são a Ria Formosa e a Ria de Aveiro (Rocha et al., 2022); no entanto, nas últimas décadas, a produção diminuiu consideravelmente principalmente devido a falhas no recrutamento causada por alterações nas taxas de crescimento e mortalidade larval e pós larval (Chícharo & Chícharo, 2001), também a sobre-exploração de juvenis em bancos naturais, pela mortalidade elevada por consequência de alterações climáticas (Rato et al., 2022) e pela introdução de espécies não nativas como *R. philippinarum* (Machado et al., 2018; Matias et al., 2013). *R. decussatus* é uma espécie principalmente presente na zona intertidal, que habita no sedimento, atingindo uma profundidade máxima de 10-12 cm e que consegue suportar grandes alterações nas condições ambientais (Bebiano et al., 2004), como por exemplo a tolerância a níveis relativamente elevados de vários tipos de contaminantes (Dellali, 2001).

Um dos grandes desafios para as maternidades de moluscos é o controlo do acondicionamento dos reprodutores. O acondicionamento dos reprodutores é uma etapa crucial para a preparação da desova num ambiente controlado como as maternidades de bivalves. O acondicionamento artificial permite que as maternidades alarguem a época de produção, reduzindo a dependência do período do ano em que os stocks selvagens se tornam maduros para a desova (Da Costa et al., 2020). Os principais objetivos do acondicionamento de bivalves reprodutores são maximizar a fecundidade dos progenitores, mantendo a qualidade dos ovos e a viabilidade das larvas (Utting & Millican, 1997b). A reprodução artificial de bivalves requer o uso de animais que tenham atingido uma condição sexual ótima que depende de fatores internos que regulam a maturação e desencadeiam a desova como a atividade genética (Boutet et al., 2008) e hormonal (como por exemplo, serotonina, catecolaminas ou prostaglandinas) (Cubero-Leon et al., 2010) e de fatores externos como a temperatura (Delgado & Pérez Camacho, 2007), a alimentação (Delgado & Camacho, 2005), as marés (Lee et al., 2020), a salinidade (Vázquez et al., 2021) e o fotoperíodo (Mallet & Carver, 2009). A idade e tamanho, bem como o estado patológico dos indivíduos, são fatores externos que também têm uma incidência significativa sobre a fecundidade (Machado et al., 2018). Em grande parte, a temperatura e a disponibilidade de alimento são considerados os principais fatores externos que condicionam a sua maturação (Matias et al., 2009). Apesar disso, a influência de outras variáveis ambientais no balanço energético ou no desenvolvimento gonadal dos bivalves, especificamente a presença de substrato, ainda não foi amplamente estudada.

De acordo com Azcona (2013) e Utting & Millican, (1997), a maioria das espécies de bivalves não necessita de ser mantida num substrato; ainda assim, determinadas espécies de navalhas como *Solen marginatus*, *Ensis magnus* e *Ensis siliqua*, necessitam de substrato para a escavação e para evitar a abertura das valvas (da Costa et al., 2011, 2020). Alguns autores, mostraram que a taxa de mortalidade durante o acondicionamento também pode ser reduzida com a utilização de areia como substrato, melhorando a condição energética do reprodutor e reduzindo o tempo de maturação (Delgado et al., 2016; Martínez-Pita et al., 2011). A utilização de substrato para o acondicionamento de bivalves poderá estar relacionada com aspetos fisiológicos por ser esta a condição normal da maioria dos bivalves no substrato natural. Contudo, sabe-se que durante o crescimento,

os moluscos escavadores em condições não naturais podem estar sujeitos a stress fisiológico, desenvolverem deformações na concha e alterações comportamentais (Delgado, 2016).

Na produção de bivalves, existem fezes, pseudo-fezes e outros detritos que se acumulam e modificam as características da água, podendo afetar negativamente a sua saúde, o desenvolvimento dos gâmetas e a maturação dos bivalves (Walne, 1979). Assim, o fluxo de água deve ser tido em consideração durante o acondicionamento dos reprodutores. Um elevado fluxo de água pode inicialmente aumentar a taxa de depuração e incapacitar os bivalves de ingerir mais partículas, enquanto um baixo fluxo pode aumentar a sedimentação de material orgânico e induzir a proliferação bacteriana (Maneiro et al., 2020). Outro fator relevante para o acondicionamento de reprodutores é a alimentação com microalgas. A produção de bivalves está fortemente dependente da produção de microalgas vivas, representando, 30 a 60% dos custos de produção da exploração (Coutteau & Sorgeloos, 1992; Oostlander et al., 2020). As microalgas são a dieta básica para os bivalves filtradores e, por isso, devem ser selecionadas de acordo com o seu valor nutricional, digestibilidade e tamanho. As dietas geralmente são compostas por várias espécies de fitoplâncton, incluindo uma diatomácea e uma ou mais espécies flageladas (Matias et al., 2016), para proporcionar um melhor equilíbrio nutricional (Cheng et al., 2020). As microalgas são a principal fonte de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) como o DHA (ácido docosahexanóico) e EPA (ácido eicosapentanóico), que desempenham um papel importante na cadeia alimentar (Cheng et al., 2020). As dietas à base de microalgas também são conhecidas por aumentar a capacidade antioxidante, e assim, prevenir o stress oxidativo (Amaro et al., 2019; Xu & Yang, 2007), também o elevado teor de polissacarídeos, vitaminas, aminoácidos essenciais e carotenóides que as compõem são importantes (Amaro et al., 2019). O efeito da alimentação no acondicionamento dos reprodutores depende da espécie de microalga e da sua qualidade e quantidade (Anjos et al., 2017; Utting & Millican, 1997b). A disponibilidade de alimento determina a quantidade de energia adquirida e, por consequência, afeta todas as características fisiológicas que constituem a equação do balanço energético, condicionando por isso, o crescimento somático e gonadal dos indivíduos (Delgado et al., 2002).

De acordo com Muller-Feuga et al. (2003), são necessários quatro critérios para uma microalga ser uma potencial fonte de alimento numa maternidade de bivalves, o

tamanho, a digestibilidade, o valor nutricional e a facilidade de produção. Na Tabela 1, estão apresentadas as espécies de microalgas habitualmente utilizadas em maternidades para a alimentação de moluscos bivalves (Kaparapu, 2018).

Tabela 1- Espécies de microalgas usadas em maternidades de bivalves em aquacultura (Kaparapu, 2018).

Espécie	Classe
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Bacillariophyceae
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Bacillariophyceae
<i>Skeletonema costatum</i>	Bacillariophyceae
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Bacillariophyceae
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Bacillariophyceae
<i>Gomphonema</i> sp.	Bacillariophyceae
<i>Nitzschia</i> sp.	Bacillariophyceae
<i>Isochrysis galbana</i>	Prymnesiophyceae
<i>Pavlova lutheri</i>	Prymnesiophyceae
<i>Isochrysis galbana</i> (clone T-ISO)	Prymnesiophyceae
<i>Chlorella minutissima</i>	Chlorophyceae
<i>Tetraselmis suecica</i>	Chlorodendrophyceae
<i>Tetraselmis chui</i>	Chlorodendrophyceae
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	Chlorodendrophyceae

Alimentar os reprodutores com uma dieta adequada pode manter o índice de condição e encurtar o período de acondicionamento. No caso de amêijoas e ostras, por norma, é fornecida uma dieta de 3% de peso seco de microalgas/ dia/ indivíduo, (Maneiro et al., 2020). As reservas de energia nos bivalves são também muito importantes na reprodução, no armazenamento e utilização energética, estando diretamente relacionadas com a qualidade da dieta fornecida e consequentemente afetam o desenvolvimento gonadal, a qualidade dos oócitos e a viabilidade larvar (Anjos et al., 2017).

1.1 Gametogénese e composição bioquímica

Os moluscos bivalves são poiquilotérmicos, o que quer dizer que são organismos com temperatura corporal variável de acordo com meio ambiente (Huo et al., 2018) a maioria destes animais vivem sésseis, onde o único momento em que podem realmente mover-se

é na fase larval que dura entre 3 e 4 semanas (Helm et al., 2004). Os moluscos tendem a viver em ambientes instáveis ou imprevisíveis e seguem uma estratégia de seleção-r (MacArthur & Wilson, 1967), onde altas taxas de crescimento são priorizadas e produzem muitos descendentes, cada um dos quais tem uma probabilidade relativamente baixa de sobreviver até a idade adulta (Stearns, 1977).

Na maioria dos bivalves, a maturidade sexual depende do tamanho e não da idade, e o tamanho na maturidade sexual depende da espécie e da distribuição geográfica, sendo geralmente alcançada quando os moluscos atingem 20 mm (Ojea et al., 2004). Estas espécies são, por norma, gonocóricas, não havendo coexistência de linhas germinativas masculinas e femininas no mesmo espécime (Vilela 1950). Na maioria dos moluscos bivalves o dimorfismo sexual raramente é observado, e por esta razão é difícil determinar o sexo e o estágio reprodutivo sem observação microscópica dos órgãos reprodutivos. O hermafroditismo é raro, mas possível (Delgado & Pérez Camacho, 2002). A mudança de sexo entre duas maturações sexuais também foi teorizada (Sousa, 2014) e documentada em outras espécies de moluscos bivalves, como ostras (Asif, 1979), *Mytilus edulis* (Sugiura, 1962), *Mytilus galloprovincialis* (Lubet, 1959) e *Ruditapes philippinarum* (Devauchelle, 1990). Sob as condições adequadas, a gónada passa por um desenvolvimento contínuo até se tornar totalmente madura. Durante o estágio inicial da gametogénese, o período de repouso sexual, os folículos gonadais estão ausentes e os tecidos conjuntivos e musculares ocupam toda a zona desde a glândula digestiva até ao pé. Não há evidência de desenvolvimento gonadal e a determinação do sexo não é possível, apenas pela observação das características fenotípicas exteriores do animal. A produção de óvulos e espermatozoides é denominada gametogénese; a gónada é composta de ductos ciliados, muito ramificados, dos quais se abrem numerosos sacos, denominados folículos. Os gâmetas surgem pela proliferação de células germinativas que revestem a parede dos folículos. A gónada sofre um desenvolvimento contínuo até se tornar totalmente madura. Esse processo foi dividido em várias fases nomeadamente, o repouso, em desenvolvimento, maduro, desova parcial e desova (Helm et al., 2004).

A gametogénese é um processo altamente exigente em termos de energia. Assim, os bivalves marinhos usam uma estratégia oportunista ou conservadora para controlar o gasto de energia durante esse processo. As espécies oportunistas obtêm e armazenam a energia antes do processo de gametogénese, enquanto as espécies conservadoras dependem principalmente da energia obtida da alimentação exógena durante o processo

de gametogénese (Hassan et al., 2018). Em moluscos, as atividades metabólicas sazonais resultam de interações complexas entre a disponibilidade de alimento, as condições ambientais, o crescimento e a reprodução (Gabbott, 1983). Em geral, os bivalves marinhos apresentam ciclos bioquímicos sazonais que estão intimamente relacionados com a atividade reprodutiva (Joaquim et al., 2023; Machado et al., 2018; Ojea et al., 2004).

Por norma, a energia é armazenada antes da gametogénese, quando o alimento é abundante, na forma de glicogénio, lípidos e proteínas (Albentosa et al., 2007; Ojea et al., 2004), principalmente no manto e na glândula digestiva (Martínez-Pita et al., 2012).

Os lípidos são as biomoléculas mais influenciadas pelo ciclo reprodutivo anual devido à sua relação com a maturação gonadal (Aníbal et al., 2011) e, devido às suas grandes contribuições calóricas por unidade estrutural, representando uma proporção maior nas reservas de energia dos bivalves (Matias et al., 2013; Ojea et al., 2004b). Geralmente são usados como fonte de energia durante a gametogénese (Beukema & De Bruin, 1977), e constituem a principal reserva nutricional nos ovos e larvas, além de condicionarem a sua viabilidade (Delgado et al., 2004; Helm et al., 1973). Os níveis máximos de lípidos ocorrem principalmente no período pré-desova (Camacho et al., 2003). As proteínas são utilizadas principalmente em funções estruturais e representam uma reserva energética em bivalves adultos, particularmente durante a gametogénese e em situações de baixos níveis de glicogénio ou equilíbrio energético severo (Beninger & Lucas, 1984). Os hidratos de carbono constituem uma das reservas bioenergéticas mais importantes em moluscos bivalves e, devido à sua hidrossolubilidade, estão disponíveis para uso imediato, sendo o glicogénio o principal componente para fornecer as necessidades energéticas no ciclo reprodutivo (Matias et al., 2013). As variações no teor de hidratos de carbono mostram uma relação inversa no estado de maturação das gónadas (Camacho et al., 2003).

1.2 Técnicas de amostragem não letais

Em aquacultura de bivalves, em determinados procedimentos, como por exemplo, a implementação de um programa de melhoramento de espécies, é importante monitorizar a maturação sexual dos reprodutores para determinar o melhor momento para induzir

eventos de desova para a produção de sementes. Além disso, poderá ser útil saber antecipadamente o sexo dos indivíduos e ainda retirar amostras de tecido para posterior análise.

A observação do órgão reprodutor, a determinação do sexo e a amostragem do tecido são, em geral, invasivas e podem ser letais. Os bivalves fecham firmemente as valvas não sendo possível proceder à inspeção e amostragem, sem que seja necessário forçar a abertura da concha e sacrificar o indivíduo. Foram desenvolvidas técnicas que permitem a observação de forma não invasiva, nomeadamente o uso de ressonância magnética, que permite a visualização de tecidos moles. Contudo essas técnicas são muito dispendiosas, difíceis de implementar em campo e não permitem a recolha de amostras (Hintz et al., 2017).

A anestesia é amplamente utilizada em aquacultura para facilitar biópsias de tecidos e para estudos de gametogénese (Suquet et al., 2009). A administração de doses de compostos anestésicos tem um baixo custo e é eficaz em permitir o acesso físico às estruturas internas de uma ampla gama de moluscos, como gastrópodes que inclui espécies do género *Haliotis*, mas também cefalópodes (*Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis*), bivalves como ostras (*Pinctada maxima*, *Ostrea edulis*), vieiras (*Pecten fumatus*) e amêijoas gigantes (*Tridacna sp.*) (Lewbart & Mosley, 2012). Dois anestésicos comumente administrados são o cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e o AQUI-S® (uma formulação que contém isoeugenol como composto ativo), que são conhecidos pela sua facilidade de uso com baixa mortalidade em espécies marinhas (Lellis et al., 2000). Contudo, a dose ideal e o tempo de imersão são bastante variáveis entre espécies (Alipia et al., 2014). A ação anestésica do $MgCl_2$ é atribuída aos iões de magnésio (Mg^{2+}) que servem como bloqueadores dos canais de cálcio, impedindo que os iões cálcio (Ca^{2+}) entrem nas células. Consequentemente, a concentração intracelular de Ca^{2+} é mantida abaixo do limiar necessário para iniciar a libertação de acetilcolina, que não transmite um potencial de ação. O bloqueio dos canais de cálcio força o acoplamento excitação-contração no músculo adutor a falhar, impedindo a contração muscular e mantendo as valvas abertas (Azizan et al., 2021). A ação anestésica do isoeugenol (4-propenil-2-metoxifenol), é atribuída pela regulação do complexo recetor de ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (Souza et al., 2019).

Objetivo

O presente estudo tem como objetivo principal contribuir para a melhoria do método de cultivo em maternidade comercial de espécies autótonas europeias como *Ruditapes decussatus*, especialmente durante a importante fase de acondicionamento. Para isso, numa primeira fase avaliou-se o efeito de um substrato arenoso no acondicionamento de reprodutores de *R. decussatus*, e, numa segunda fase, realizou-se um ensaio com o objetivo de desenvolver um método não letal que permita avaliar o estágio de desenvolvimento da gónada durante o acondicionamento, o sexo, assim como recolher amostras de tecido para posterior análise em laboratório. Este método foi igualmente testado em amêijoas da espécie *Venerupis corrugata*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Recolha dos animais e aclimação

Cerca de 332 reprodutores de *R. decussatus* provenientes de três locais distintos - Óbidos, Algarve e Galiza -, em percentagens de 22%, 42% e 36%, respetivamente, foram aclimatados no Centro Biomarinho da Oceano Fresco (OF) localizado na Nazaré (Portugal). Os reprodutores entraram na maternidade em diferentes datas, sendo que os indivíduos de Óbidos iniciaram a aclimação em janeiro de 2023 e os do Algarve e Galiza em fevereiro do mesmo ano. Considerando como referência a temperatura da água no meio natural, foi feito um incremento diário de 0,1°C até ser atingida a temperatura de acondicionamento de 19°C, com o auxílio de um refrigerador portátil (TECO, TK100, SEACHILL). Após o processo de aclimação, os animais foram mantidos na maternidade até ao início dos ensaios, sendo posteriormente transportados até às instalações do Biotério do Edifício Cetemares - MARE – Politécnico de Leiria (Peniche, Portugal), em seco, refrigerados ($\pm 10^\circ\text{C}$) durante cerca de 1 hora, em sacos de rede bem apertados, dentro de um caixa térmica com placas de gelo e cobertos com panos húmidos.

2.2 Desenho experimental – acondicionamento dos reprodutores

O ensaio de acondicionamento dos reprodutores decorreu nas instalações do Biotério do Edifício Cetemares – MARE – Politécnico de Leiria (Peniche, Portugal), e teve início a 15 de março de 2023. As amêijoas foram acondicionadas durante 73 dias. Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 tratamentos - com substrato (A) e sem substrato (B) em 4 tanques (duas réplicas por tratamento) (Figura 2), a uma densidade de 7 kg/ m². Os tanques que continham o substrato apresentavam 4 centímetros de areia e 4 centímetros de coluna de água. Os tanques sem substrato tinham um volume de 25L de água e os animais estavam dentro de um cesto de rede. Os 4 tanques estavam montados num sistema que era abastecido com água salgada através de uma bomba que estava num reservatório de 1 000L, sendo o seu volume repostado diariamente com água salgada do furo que abastece o edifício Cetemares, a temperatura foi ajustada para a temperatura de

acondicionamento com o auxílio de um refrigerador portátil (HC2200A-HAILEA) (temperatura média= $19,51\pm 0,27^{\circ}\text{C}$; salinidade= $32,38\pm 0,35$ ppt). Cada um dos tanques foi adaptado para ter uma saída de água na zona superior do mesmo, de forma a evitar que a areia saísse. O substrato utilizado para o ensaio teve origem na Praia do Sul, Nazaré (Portugal), e antes da sua utilização foi previamente lavado com água doce e colocado nos tanques com o sistema a funcionar em circuito aberto.

O ensaio decorreu num sistema aberto, cujo fluxo de água variava entre os tratamentos, tendo sido definido 5L/ hora e 10L/ hora, para os tanques com areia e sem areia, respetivamente. Estes fluxos foram ajustados para que houvesse uma taxa total de renovação da água superior a 90 min (Helm et al., 2004). Os tanques tinham arejamento contínuo. A dieta das amêijoas foi de 3% do peso seco, sendo alimentadas ao longo de 24 horas, com intervalos de 15 minutos programados com um temporizador. Este estava ligado a uma bomba submersível, dentro de um tanque cilindrocónico de 40L de capacidade, onde a dieta (Secção 2.4) a fornecer era colocada diariamente.

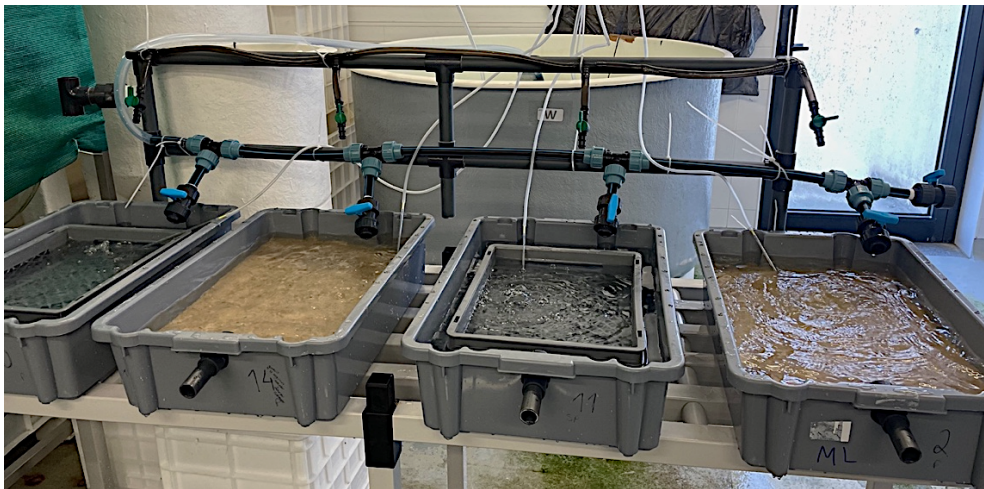


Figura 2- Fotografia do *setup* utilizado para o ensaio de condicionamento dos reprodutores de *R. decussatus*.

2.3 Rotinas diárias

As rotinas diárias tinham início com a verificação e registo de ocorrência de mortalidade nos tanques. A limpeza dos tanques, em ambos os tratamentos, foi realizada

3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira). Para o tratamento sem areia, a limpeza consistiu em retirar o cesto com os animais e depois lavar os tanques com sabão neutro e enxaguar com água salgada. Para o tratamento com areia, efetuou-se uma sifonagem superficial do substrato, e 1 vez por semana (segunda-feira) o substrato foi remexido levemente para soltar as partículas em suspensão e aumentou-se um pouco o fluxo de água durante 10 minutos para que as partículas saíssem. Diariamente, a salinidade, o pH e a temperatura foram medidos com uma sonda multiparamétrica (YSI Professional series). Por fim, o tanque de alimentação de microalgas foi reabastecido com a quantidade diária necessária (Secção 2.4.). Três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) procedeu-se à limpeza do tanque cilíndrico onde foi colocada a mistura de microalgas.

2.4 Cultivo de microalgas

Microalgas das espécies *Tisochrysis galbana* clone (T-ISO), *Chaetoceros gracilis*, *Diacronema lutheri*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* cedidas pela OF foram cultivadas em *carboys* (10L) com água do mar (salinidade $33\pm 0,5$ ppt), filtrada ($1\mu\text{m}$), tratada com UV e com hipoclorito de sódio (1mL/L) sendo este neutralizado após 24 horas, com tiosulfato de sódio (1mL/L). A água foi enriquecida com 1 mL/L de nutrientes (Nutribloom plus, NUTRIBLOOM®, Necton) e, no caso da diatomácea foram adicionados silicatos (Silicates Solution, NUTRIBLOOM®, Necton). As microalgas foram cultivadas a uma temperatura de $19\pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14 h luz: 10h escuro, aeração contínua. O *stock* de cada espécie de microalga foi mantido em balões com volume de 6L. As microalgas foram colhidas diariamente na fase de crescimento exponencial mantendo um cultivo contínuo. As densidades das microalgas foram determinadas semanalmente por contagens na câmara de Neubauer. As percentagens de cada espécie de microalga que compunha a dieta foram de 40% *C. gracilis*, 15% *D. lutheri*, 15% T-ISO, 15% *T. suecica* e 15% *I. galbana*.

2.5 Plano de amostragem e análises

A Tabela 2 é representativa do plano de amostragem ao longo do ensaio, onde foram considerados 3 tempos de amostragem (T0, T1, T2), assim como as análises realizadas (representadas por um ‘x’). Na primeira amostragem, quando o ensaio iniciou (T0), foram analisados 30 indivíduos; posteriormente em T1 (41 dias de acondicionamento) e em T2 (73 dias de acondicionamento), foram analisados 20 indivíduos.

Tabela 2- Tabela representativa do plano de amostragens ao longo do ensaio.

Parâmetros avaliados	T0: início do acondicionamento (15/03/2023)	T1: 41 dias de acondicionamento (24/04/2023)	T2: 73 dias de acondicionamento (26/05/2023)
Dados biométricos	X	X	X
Infeção por <i>Perkinsus</i>	X		
Avaliação do estado de maturação a fresco		X	X
Índice de condição	X	X	X
Análise bioquímica	X	X	X
Análise histológica	X	X	X
Índice gonadal	X	X	X

2.5.1 Recolha de dados biométricos

A recolha de dados biométricos foi realizada em todos os tempos de amostragem (T0 n=30; T1 n=20, T2 n=20). Nesta análise, os indivíduos foram pesados numa balança analítica (Haus, Pioneer) para o registo do peso total (g), peso da concha (g) e peso da

carne (g). Foram ainda feitas medições com uma craveira da largura (mm), comprimento (mm) e espessura (mm) em cada amêijoia.

2.5.2 Avaliação de infecção por *Perkinsus* sp. por RFTM

Para a preparação dos tubos com Ray's Fluid Thioglycolate Medium (RFTM), dissolveu-se 29,75 g meio tioglicolato (OXOID), em água destilada, adicionando-se 20 g cloreto de sódio (NaCl) (PanReac AppliChem), agitou-se e aqueceu-se até ferver. Em seguida, adicionou-se 0,05g de cloranfenicol (ACRÓS ORGANICS) (previamente dissolvido em água destilada) e agitou-se novamente. Colocou-se 9,5 mL de FTM em cada tudo, autoclavou-se os tubos a 120 °C durante 20 minutos e foram guardados no escuro até serem usados.

Para a semi-quantificação de *Perkinsus* colocou-se uma hemibrânquia no tubo com FTM e adicionou-se 0,5 de solução de Nistatina (>4400 U/mg) (MEMD Millipore Corp., USA), sem agitar o tubo. Após 5 dias de incubação, no escuro, a 25° C foi preparada uma lâmina com uma gota de solução de Lugol e colocada a hemibrânquia. Após 15 min observou-se ao microscópio ótico (Optika, B-192). Para a semi-quantificação da intensidade da infecção de *Perkinsus* utilizou-se o Índice de Ray (Ray, 1966), (Tabela 3).

Tabela 3- Índice de Ray para a semi-quantificação da intensidade da infecção por *Perkinsus* (Ray, 1966).

Escala de intensidade da infecção	Descrição
0	<u>Ausência de parasita</u> : 0 células na preparação microscópica.
1	<u>Infeção muito ligeira</u> : De 1-10 células em toda a preparação microscópica.
2	<u>Infeção ligeira</u> : Em 10 campos microscópicos randomizados (4x), pelo menos 1 célula/campo microscópico é observado
3	<u>Infeção moderada</u> : Em 10 campos microscópicos randomizados (10x), pelo menos 10 células/campo microscópico são observados

4	<u>Infeção intensiva</u> : Em 10 campos microscópicos randomizados (10x), pelo menos 50 células/campo microscópico são observados
5	<u>Infeção muito intensiva</u> : Em 10 campos microscópicos randomizados (40x), pelo menos 25 células/campo microscópico são observados

2.5.3 Avaliação do estado de maturação em fresco

Para a avaliação do estado de maturação em fresco, foram selecionadas 20 amêijoas (T1 e T2), às quais também foi feita a análise biométrica e a identificação do sexo (Tabela 4).

Tabela 4- Descrição de cada nível de maturação avaliado a fresco (Escala de avaliação fornecida pela OF)

Nível de Maturação		Descrição	
Estádio	Denominação	Aparência macroscópica	Esfregaço a fresco
0	Repouso	Massa visceral plana, esbranquiçada e transparente (observam-se os intestinos)	Ausência de gâmetas
1	Desenvolvimento precoce	Massa visceral continua pequena	Gâmetas começam a aparecer
2	Desenvolvimento tardio	Tamanho da gónada começa a aumentar	Gâmetas começam a ser mais abundantes
3	Maduro a desovar	A gónada atinge o seu desenvolvimento máximo ocupa a maior parte da massa visceral	Abundância de gâmetas
4	Pós desova	Gónada em regressão e flácida	Gâmetas residuais

2.5.4 Índice de condição

O índice de condição (IC) foi calculado em todas as amostragens usando 10 indivíduos de cada tratamento (com e sem areia). Para cada amostra, o corpo mole foi separado da concha e ambos foram colocados na estufa a 80°C e pesados após 24h. Em

seguida, o corpo mole foi colocado na mufla a 450°C durante 24h e novamente pesado para a quantificação das cinzas.

O índice de condição das amêijoas foi calculado conforme descrito e adaptado de Walne & Mann (1975):

$$IC = \frac{(\text{Peso seco da carne (g)} - \text{Peso cinzas (g)})}{\text{Peso da concha seca (g)}} \times 100$$

2.5.5 Análise bioquímica

Para a análise bioquímica de proteínas, glicogénio e lípidos totais utilizaram-se 10 indivíduos recolhidos aleatoriamente em cada tempo de amostragem (T0, T1 e T2). A parte edível das amêijoas foi retirada, colocada em tubos e mantida a -20°C até a realização das análises. Depois de descongeladas procedeu-se à sua homogeneização, com um homogeneizador (IKA T18 digital Ultra Turrax, Scansci), mantendo as amostras em gelo, para evitar a sua deterioração.

As proteínas foram determinadas através do método de Lowry modificado (Shakir et al., 1994). Para o padrão das proteínas foi utilizada uma solução de albumina bovina (1mg/mL) com NaOH (N/100) em diferentes concentrações e colocada em tubos de ensaio até um volume final de 300mL. Foi ainda adicionada a cada um desses tubos 1mL da solução alcalina de sulfato de cobre que continha 185mM Na₂CO₃, 98,1mM NaOH, 0,39mM CuSO₄ × 5 H₂O e 0,7 mM KNaC₄H₄O₆ × 4 H₂O. Posteriormente, foi incubado a 37°C durante 3 minutos. Após essa incubação, foi adicionado 0,1 mL de reagente Folin-Calciteau (diluído 1:1 v/v com H₂O) agitado no vórtex e novamente incubado. A absorvância foi lida a 750 nm. O teor do glicogénio foi determinado a partir do homogeneizado seco a 80°C durante 24 horas ao qual se adicionou 500 mL de KOH a 33% e levando-se à ebulição durante 15 minutos. Depois de arrefecer, adicionou-se 25 mL de Na₂SO₄ saturado e levou-se ao vórtex. Juntou-se 1 mL de etanol e deixou-se precipitar durante 30 minutos a 4°C. O precipitado foi dissolvido em 250 mL de água destilada e 500 mL de etanol. Depois de centrifugar durante 10 minutos a 300 r.p.m (rotor F-45-30-11), decantou-se o sobrenadante e redissolveu-se o precipitado em 200 mL de

água destilada. Por fim, adicionou-se 1,5 mL de solução de antrona aos padrões, aos brancos e às amostras e colocou-se em banho de água a 90°C durante 20 minutos. Depois desse tempo, deixou-se arrefecer e a leitura foi feita no espectrofotômetro a 620 nm (Viles & Silverman, 1949). Os lípidos totais foram extraídos a partir do homogeneizado, utilizando o reagente clorofórmio/metanol (Folch et al., 1957). Os lípidos usados como padrão foram preparados a partir de colesterol standard, 10 mg em 100 mL de clorofórmio/metanol (2:1). A cada amostra foi adicionado 200 mL de NaCl (0,7%) e para remover o solvente das amostras, foram colocadas em banho-maria a 80°C durante 30 minutos. Depois de arrefecer, foi adicionado 1 mL de H₂SO₄ e foram estimados por espectrometria, após carbonizar com ácido sulfúrico concentrado, depois de adicionar 1,5 mL de água destilada e levar ao vórtex (Marsh & Weinstein, 1966). As amostras foram realizadas em duplicado e os valores das leituras obtidos no espectrofotômetro a 450 nm (Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer). O teor calórico de proteínas, lípidos e glicogênio nos tecidos foi calculado utilizando os fatores 17,9 KJ g⁻¹ (Beukema & Bruin, 1979), 33 KJ g⁻¹ (Beninger & Lucas, 1984) e 17,2 KJ g⁻¹ (Paine, 1971), respetivamente. Os resultados da composição bioquímica foram determinados a partir da média, em duplicado e expressos em peso seco livre de cinzas (µg⁻¹ mg⁻¹ PSLC).

2.5.6 Análise histológica

Dos organismos recolhidos para as amostragens, 10 de cada tratamento, foram utilizados para a análise histológica. A massa visceral foi separada dos sífões e das brânquias e foi fixada em solução de Davidson durante 48 horas, tendo sido posteriormente transferida para álcool etílico a 70% até ao processamento. Para o processamento, as amostras foram colocadas num processador de tecidos (Leica TP1020) para desidratação, clarificação e impregnação de parafina nos tecidos e posteriormente incluídas em blocos de parafina. Foram cortadas em secções finas (6-8µm) no micrómetro (accu-cut® SEM SaKURA), colocadas em lâminas que foram coradas com hematoxilina e eosina. As preparações histológicas foram examinadas num microscópio ótico (Leica DM 2000 LED) e fotografadas (Leica HC 170 HD). A cada indivíduo foi atribuído um estágio que representa o seu estado de maturação gonadal, descrito por Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptado por Matias et al. (2013) (Tabela 5).

Tabela 5 - Escala reprodutiva para *R. decussatus* de acordo com Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptada por Matias et al. (2013).

Estádio	Descrição histológica
Repouso sexual (Fase I)	Os folículos gonadais estão ausentes e o tecido muscular e conectivo ocupa toda a zona da glândula digestiva ao pé. Não há evidências de desenvolvimento gonadal e não é possível a determinação do sexo.
Início da gametogénese (Fase II)	Folículos e acini gonadal começam a aparecer em fêmeas e machos, respetivamente. Aumentam de tamanho e aparecem cobertos em oócitos na fase de crescimento nas fêmeas e com gâmetas imaturos (espermatogónia e espermatócitos) nos machos.
Gametogénese avançada (Fase III)	Os folículos ocupam uma grande parte da massa visceral. A presença de tecido muscular e conjuntivo é reduzida. No fim deste estágio, caracterizado pelo crescimento celular intenso nas fêmeas, o oócito projeta-se de centro do lúmen, permanecendo preso, através do pedúnculo. A abundância de oócitos livres é igual aos que se encontram unidos à parede do folículo. Nos machos, a maioria dos acini encontra-se cheia de espermatídios e espermatozoides.
Maduro (Fase IV)	Corresponde à maturidade, da maioria dos gâmetas. Nos oócitos maduros ocorre a rutura do pedúnculo, e consequentemente, os oócitos, ocupam o interior folicular. Nos machos, os acini gonadais contêm principalmente espermatozoides
Desova parcial (Fase V)	Os gâmetas são libertados. Dependendo do grau de desova, os folículos estão mais ou menos vazios. As paredes do folículo estão rebentadas. Existem muitos espaços vazios entre e dentro dos folículos.
Desova (Fase VI)	Tecido conjuntivo interfolicular abundante. Resíduos ocasionais de espermatozoides ou oócitos reenviados.

O índice gonadal (IG) foi calculado em todas as amostragens usando o método proposto por Seed (1976). Para cada uma das fases foi atribuída uma classificação numérica da seguinte forma: repouso sexual =0, início da gametogénese =3, gametogénese avançada =4, maduro =5, desova parcial =2 e desova =1.

$$IG = \frac{(\sum \text{Ind. cada estágio} * \text{Classificação da fase})}{\text{Total ind. por amostragem}}$$

2.6 Método para recolha de amostras biológicas em *Ruditapes decussatus* e *Venerupis corrugata*

2.6.1 Determinar o tempo para anestésias *R. decussatus* e *V. corrugata*

Inicialmente (ensaio 1) foi crucial para determinar o tempo necessário para anestésias as duas espécies com a mesma concentração de anestésico ($MgCl_2$), bem como avaliar a mortalidade. Na fase seguinte (ensaio 2) pode-se ampliar ou reduzir a concentração de anestésico de forma a reduzir o tempo de indução, a permitir a recolha de amostras e que limitar a mortalidade subsequente.

Para o ensaio 1 – determinação do tempo para anestésias - foram utilizados 60 indivíduos de cada espécie. Destes, 30 indivíduos de *R. decussatus* e 30 de *V. corrugata* foram expostos ao anestésico cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$; LabChem) com uma concentração de 50g/L (Suquet et al., 2009). O grupo controlo, foi preparado com 30 indivíduos de cada espécie que não foram expostos ao anestésico, mas que foram colocados nas mesmas condições e tiveram a mesma manipulação. Os indivíduos foram colocados em recipientes de 2 litros em triplicados, com 10 amêijoas, cada (Figura 3). A cada hora, o número de amêijoas anestésias foi avaliado para determinar a percentagem de indivíduos anestésias. Considerou-se que estavam anestésias quando, após 3 pressões suaves sucessivas nas valvas, não ocorreu o fecho das mesmas. A exposição ao anestésico terminou quando 80% das amêijoas foram anestésias ou ao fim de 12 horas de exposição. As amêijoas anestésias foram devolvidas ao tanque de recuperação com água limpa. A sobrevivência foi monitorizada e registada diariamente, durante 1 semana após a exposição ao anestésico.

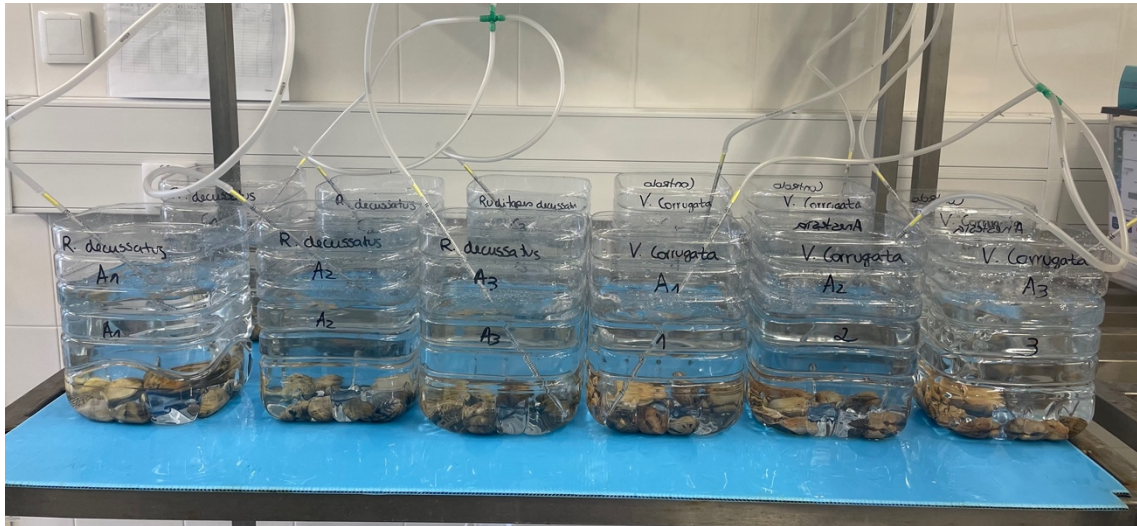


Figura 3 - Fotografia do *setup* do ensaio da anestesia com *R. decussatus* e *V. corrugata*.

2.6.2 Determinar a dose ideal para anestésias *R. decussatus* e *V. corrugata*

Para o ensaio 2 – determinação da dose ideal para anestésias - foram utilizados 120 indivíduos de cada espécie para testar 3 concentrações de anestésico, tendo em conta os resultados obtidos no ensaio 1. Para *R. decussatus*, as doses utilizadas foram: 50g/L, 55g/L e 60 g/L. Para *V. corrugata*, as doses utilizadas foram 15g/L, 25g/L e 50g/L. As condições experimentais foram as mesmas do primeiro ensaio. Paralelamente, havia um grupo controlo (em triplicado) para cada uma das espécies. Adicionalmente, aos 15 indivíduos que anestésiam mais rapidamente, foi realizada uma biópsia para a amostragem de gónada para a determinação do sexo. A sobrevivência foi monitorizada diariamente, durante 1 semana após a exposição ao anestésico.

2.7 Análise estatística

Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (DP). Para os dados relativos à bioquímica, índice de condição e índice gonadal foi realizada a análise de variância ANOVA unilateral ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis nas classificações, sempre que os pressupostos da ANOVA falharam, ou seja, normalidade dos dados e

homogeneidade de variâncias. O coeficiente de correlação de *Pearson* foi usado para determinar o grau de associação entre parâmetros (índice de condição, índice gonadal proteínas, glicogénio, lípidos totais). Os resultados foram considerados significativos com valor de *p-value* < 0,05. Toda a análise estatística foi realizada com IBM SPSS Statistics (version 28.0.0.0 190).

3 Resultados

3.1 Acondicionamento dos reprodutores

3.1.1 Dados biométricos

Os dados biométricos recolhidos em todos os tempos de amostragem (T0- 0 dias, T1- 41 dias e T2-73 dias) estão apresentados na Tabela 6. O comprimento das amêijoas variou entre $38,31 \pm 3,50$ mm e $38,19 \pm 2,23$ mm. Para a largura dos indivíduos, os valores obtidos foram de $26,19 \pm 2,48$ até $26,24 \pm 1,56$ mm. A espessura também foi um dado biométrico recolhido com valores que oscilaram de $16,53 \pm 2,01$ mm a $16,58 \pm 1,55$ mm. O peso total de cada um dos indivíduos foi de $17,67 \pm 4,60$ g, até $17,76 \pm 3,86$ g. O peso da concha revelou valores de $9,58 \pm 1,34$ g até $9,58 \pm 1,34$ g; por último, o peso da víscera variou entre $4,40 \pm 1,20$ g e $4,41 \pm 0,80$ g.

Tabela 6 - Dados biométricos (média \pm DP) recolhidos nos vários tempos de amostragem (T0: n=30; T1: n=20; T2: n=20).

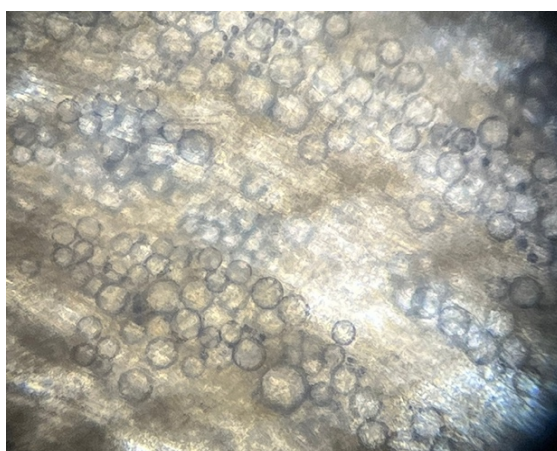
Amostragem	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Peso total (g)	Peso da concha (g)	Peso da víscera (g)
T0	$38,31 \pm 3,50$	$26,19 \pm 2,48$	$16,53 \pm 2,01$	$17,67 \pm 4,60$	$9,58 \pm 2,49$	$4,40 \pm 1,20$
T1	$38,29 \pm 4,51$	$26,23 \pm 2,55$	$16,58 \pm 1,55$	$17,76 \pm 3,86$	$9,63 \pm 2,06$	$4,41 \pm 0,80$
T2	$38,19 \pm 2,23$	$26,24 \pm 1,56$	$16,53 \pm 1,32$	$17,69 \pm 2,53$	$9,58 \pm 1,34$	$4,39 \pm 0,84$

3.1.2 Avaliação semi-quantitativa de infeção por *Perkinsus sp.*

Os indivíduos analisados apresentavam origens geográficas distintas: Algarve (AL), Galiza (GA) e Óbidos (OB). As amêijoas mostraram valores variáveis de intensidade de infeção em todas as origens (Tabela 7): 30% apresentaram ausência do parasita, 30% infeção muito ligeira, 30% infeção ligeira e apenas 10% indicou infeção muito intensa (Figura 4).

Tabela 7- Avaliação da infecção por *Perkinsus* utilizando RFTM de acordo com a escala de Ray (Ray, 1966)

Origem	Escala de intensidade da infecção	Descrição
AL	2	Infeção ligeira
AL	2	Infeção ligeira
AL	1	Infeção muito ligeira
AL	1	Infeção muito ligeira
GA	0	Ausência de parasita
GA	5	Infeção muito intensa
GA	2	Infeção ligeira
GA	0	Ausência de parasita
OB	0	Ausência de parasita
OB	1	Infeção muito ligeira

**Figura 4-** Fotografia de brânquia de um indivíduo *R. decussatus*, da Galiza, com um nível de infecção muito intenso (5) (ampliação 40x).

3.1.3 Avaliação do estado de maturação em fresco

A avaliação do estado de maturação a fresco foi realizada nas amostragens T1 e T2 para machos e fêmeas, sendo possível observar algumas diferenças entre tratamentos. Em T1, no tratamento com areia (Figura 5- T1-A) é possível verificar que 10% dos indivíduos se encontravam no estágio 1 (Desenvolvimento precoce), 10% no estágio 2 (Desenvolvimento tardio), e 10% no estágio 4 (Pós-desova), sendo que os restantes 30%

se encontravam no estágio 3 (Maduro). Para o tratamento sem areia (Figura 5- T1-B), observou-se apenas 2 estádios, 90% dos indivíduos estavam no estágio 3 (Maduro) e 10% no estágio 2 (Desenvolvimento tardio). Na amostragem (T2), para o tratamento sem areia (Figura 5-T2-C) comparativamente com T1, observa-se um aumento da percentagem de indivíduos no estágio 3 (90%) e apenas 10% no estágio 2. No tratamento sem areia (Figura 5-Figura 5-T2-D), as amêijoas apresentaram um maior desenvolvimento gonadal encontrando-se a totalidade dos indivíduos no estágio 3 (Maduro).

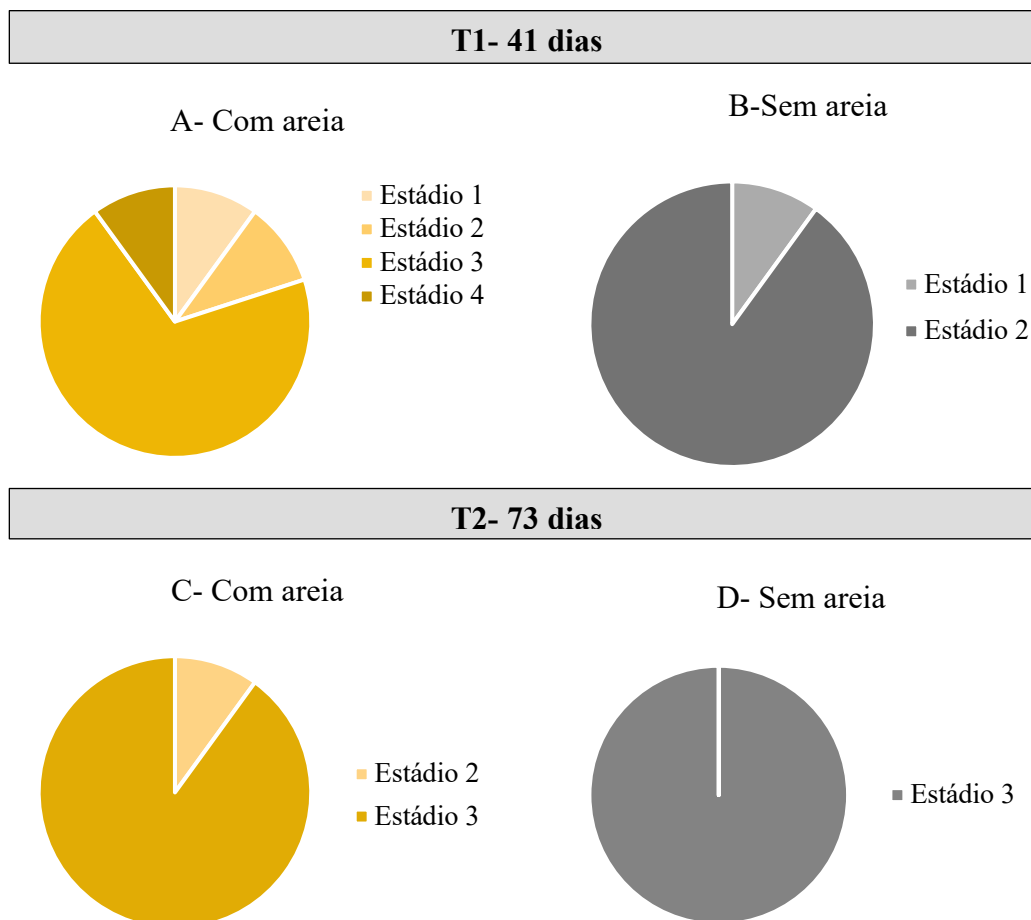


Figura 5- Avaliação do estado de maturação a fresco em *Ruditapes decussatus* em 2 tempos de amostragem durante o acondicionamento (T1- 41 dias, T2- 73 dias), (n=20) e (A- T1: Com areia) (B- T1: Sem areia) (C- T2: Com areia) (D- T2: Sem areia) (Estádio 1- Desenvolvimento precoce; Estádio 2- Desenvolvimento tardio; Estádio 3- Maduro; Estádio 4- Pós-desova).

A mortalidade durante o acondicionamento mostrou uma tendência idêntica para os dois tratamentos, tendo-se, no entanto, verificado uma mortalidade ligeiramente mais elevada no tratamento com areia (59%) do que no tratamento sem areia (56%) (Figura 6).

As diferenças da mortalidade entre tratamentos ao longo do ensaio também foram registadas (Figura 6) no tratamento com areia entre T0 e T1 foi de 56,6 % e no tratamento sem areia foi de 48,2 %, já entre T1 e T2 a mortalidade baixou, registando o valor de 2,4 % para o tratamento com areia e 7,8 % no tratamento sem areia.

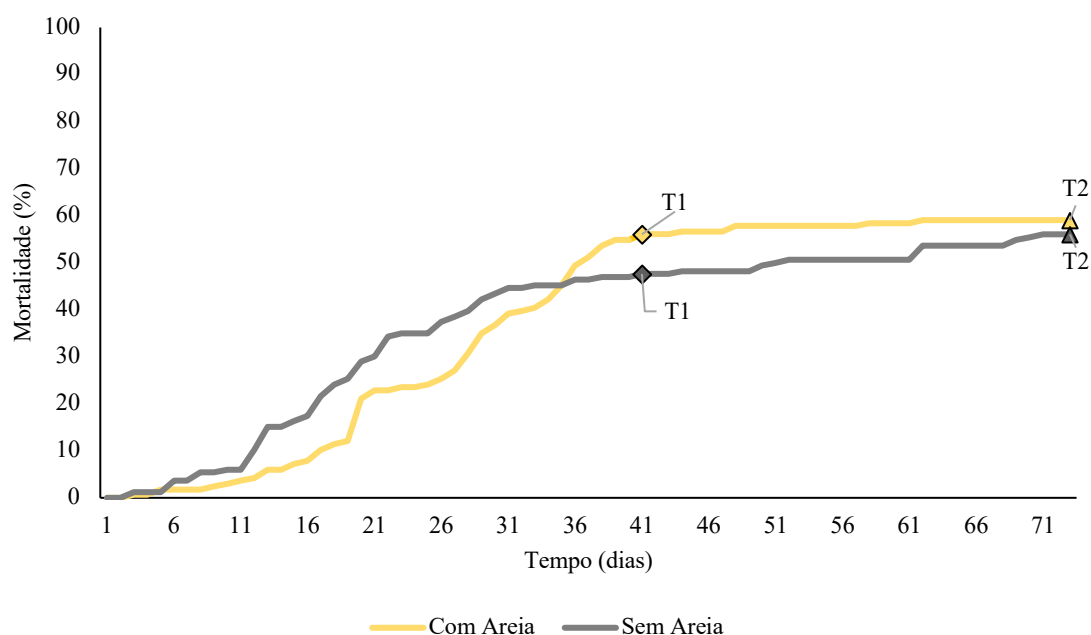


Figura 6 - Mortalidade cumulativa expressa em % de indivíduos, ocorrida durante o período de acondicionamento (com e areia e sem areia) (T1- 41 dias e T2 -73 dias).

3.1.4 Índice de condição

O valor do índice de condição (IC) registado para o início do ensaio (T0) foi de $7,45 \pm 1,49$. Durante o período de acondicionamento, os valores do IC para T1 e T2 no tratamento com areia foram menores variando entre $6,52 \pm 1,96$ e $6,78 \pm 2,17$, respetivamente. Para o tratamento Sem areia, o IC revelou valores superiores que variaram de $7,69 \pm 1,90$ para T1 e $7,83 \pm 1,53$ para T2. A análise estatística realizada mostrou não haver diferenças estatisticamente significativas, (p -value $< 0,05$) (Figura 7).

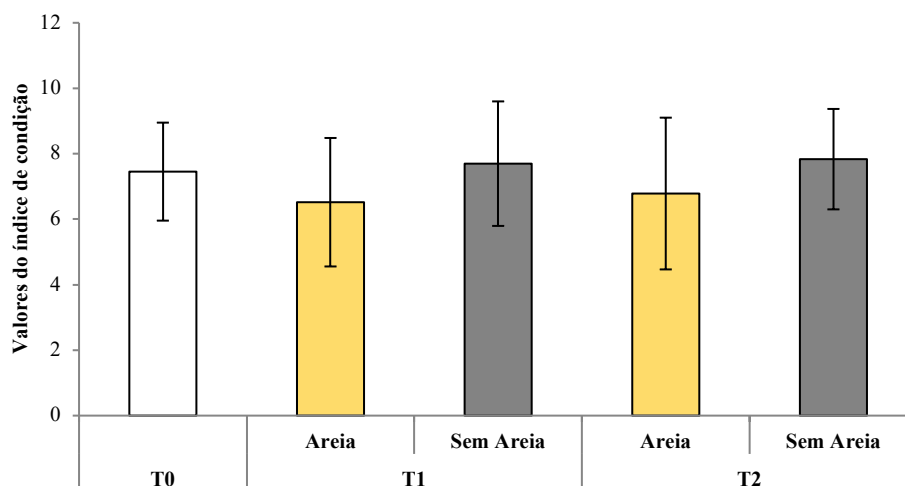


Figura 7 - Índice de condição (média±DP, n=10) em reprodutores *Ruditapes decussatus* acondicionados com 2 condições: Com areia e Sem areia, em 3 tempos de amostragem (T0- início, T1- 41 dias e T2- 73 dias), (p -value<0,05).

3.1.5 Análise bioquímica

Em relação à composição bioquímica, os reprodutores apresentaram maior teor em proteínas, sendo o componente de tecido seco maioritário das amêijoas, seguido pelos lípidos totais e glicogénio.

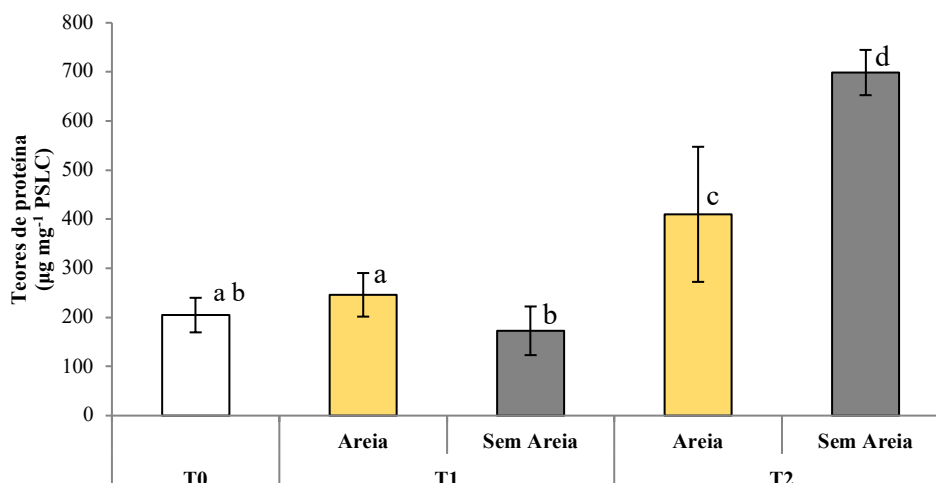


Figura 8 -Teores de proteína (média±DP, n=10) em reprodutores de *Ruditapes decussatus* acondicionados com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0- início, T1- 41 dias e T2- 73 dias) Os valores são expressos em µg mg⁻¹ de PSLC. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas (*p-value* <0,05).

O teor de proteínas variou entre 172,73±35,20 µg mg⁻¹ de PSLC obtido em (T0) e 698,70±46,09 µg mg⁻¹ PSLC observado em T2 no tratamento sem areia (Figura 8). Quando comparados os dois tratamentos, com e sem areia, nos diferentes tempos de amostragem, verifica-se a existência de diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, *p-value* <0,05). O valor de proteínas em T1, no tratamento com areia, apresentou um valor mais elevado de 245,98±44,39 µg mg⁻¹ PSLC quando comparado com o tratamento sem areia (172,73±49,53 µg mg⁻¹ PSLC). Pelo contrário, em T2, o maior teor de proteínas, significativamente diferente, observou-se no tratamento sem areia.

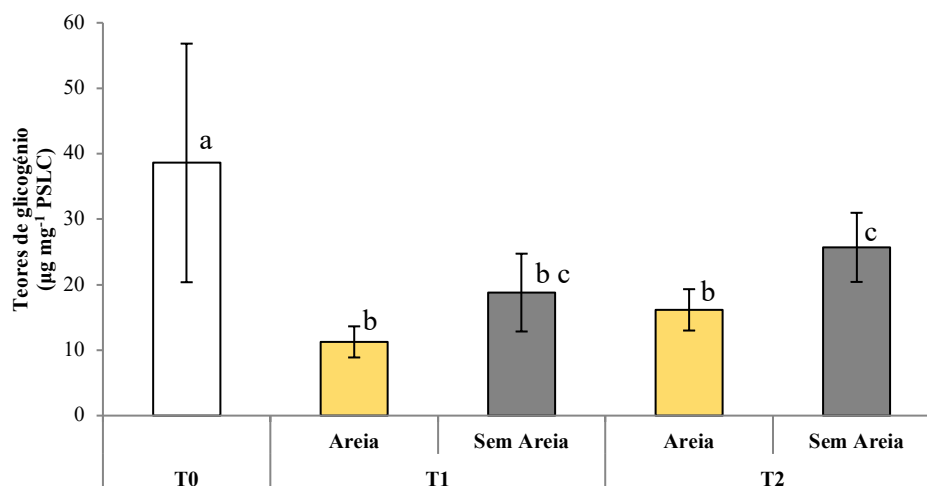


Figura 9 - Teores de glicogénio (média±DP, n=10) em reprodutores de *Ruditapes decussatus* acondicionados Com e Sem areia em 3 tempos de amostragem (T0- início, T1- 41 dias e T2- 73 dias) Os valores foram expressos em µg mg⁻¹ de PSLC. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas (p -value <0,05).

Para o teor de glicogénio, o valor significativamente mais elevado observou-se em T0 (38,59±18,22 µg mg⁻¹ PSLC) e o mais baixo em T1 no tratamento com areia (11,26±2,38 µg mg⁻¹ PSLC) (Figura 9). O valor de glicogénio obtido, mostrou valores superiores no tratamento sem areia quer em T1 como em T2. Observam-se diferenças estatisticamente significativas em T2, quando comparados os dois tratamentos (Kruskal-Wallis, p -value < 0,05).

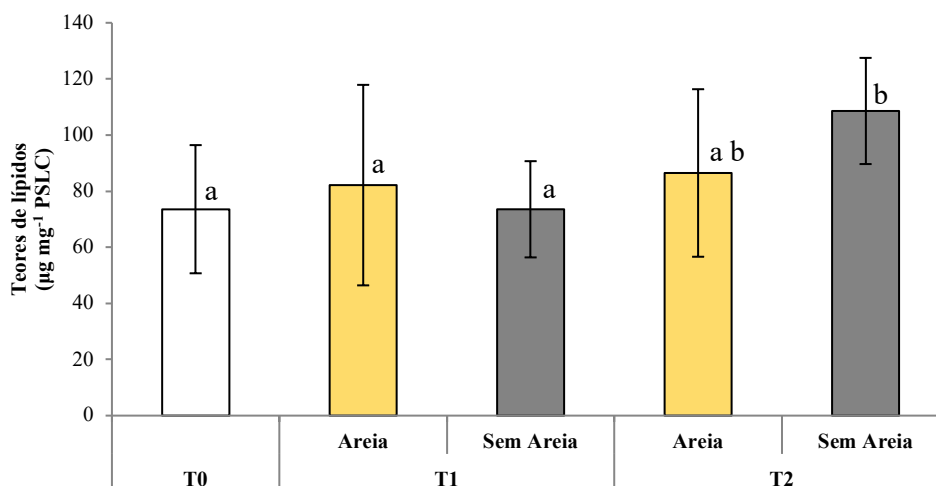


Figura 10 - Teores de lípidos (média±DP, n=10) em reprodutores de *Ruditapes decussatus* acondicionados com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0- início, T1- 41 dias e T2- 73 dias) Os valores foram expressos em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de PSLC. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} < 0,05$).

Os níveis do teor de lípidos totais variaram entre $73,54 \pm 17,15 \mu\text{g mg}^{-1}$ PSLC em T1, no tratamento sem areia e $108,58 \pm 18,92 \mu\text{g mg}^{-1}$ PSLC em T2 sem areia (Figura 10). O valor obtido em T2 para o tratamento sem areia mostrou ser significativamente maior (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} < 0,05$) que nos outros tratamentos nos vários tempos de amostragem.

3.1.6 Análise histológica

Os resultados da análise histológica estão apresentados nas Figura 11 e Figura 12. Foi possível verificar que houve diferenças entre fêmeas e machos durante o acondicionamento nos dois tratamentos, sendo que as fêmeas apresentaram 4 fases diferentes de desenvolvimento gonadal, - Fase III- Gametogênese avançada (Figura 13-A), Fase IV- Maduro (Figura 13-B), Fase V- Desova parcial (Figura 13-C) e Fase VI- Pós desova (Figura 13-D) -, enquanto nos machos apenas se distinguiram 2 fases - Fase III- gametogênese avançada (Figura 14-A) e Fase IV- Maduro (Figura 14-B). A percentagem total de fêmeas e machos analisados foi diferente, sendo 56% fêmeas e 44% machos, ou

seja, para cada tempo de amostragem (T0, T1 e T2) a proporção de machos em relação às fêmeas foi de T0: 3/10, T1:7/20 e para T2: 12/20.

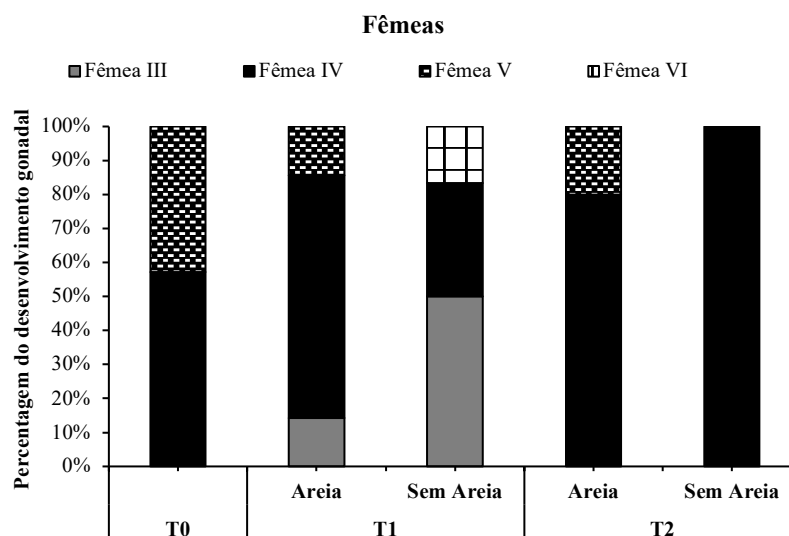


Figura 11 -Porcentagem do desenvolvimento gonadal de reprodutores fêmea de *Ruditapes decussatus* por tratamento (com areia e sem areia) em cada tempo de amostragem (T0 início, T1- 41 dias, T2- 73 dias), (Fase III- gametogênese avançada, Fase IV- Maduro e Fase V- Desova parcial).

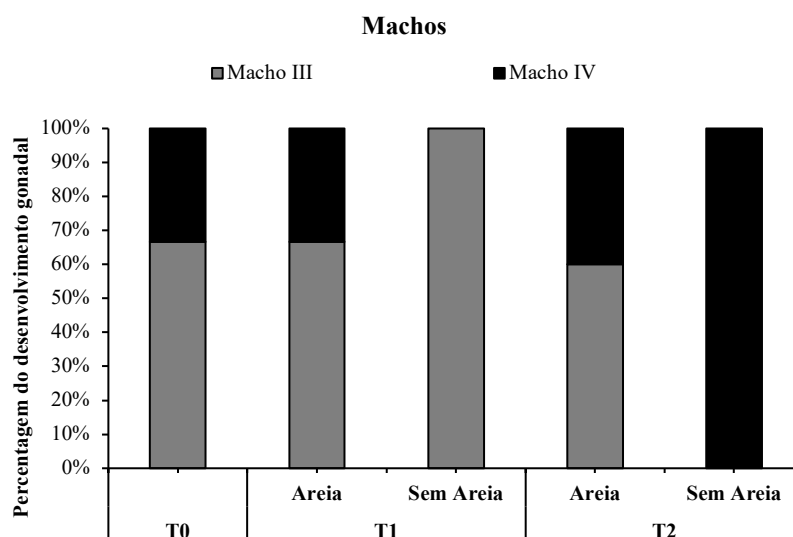


Figura 12-Porcentagem do desenvolvimento gonadal de reprodutores macho de *Ruditapes decussatus* por tratamento (com areia e sem areia) em cada tempo de amostragem (T0- início, T1- 41 dias, T2- 73 dias). (Fase III- gametogênese avançada e Fase IV- Maduro).

No início do condicionamento (T0), 57,14% das fêmeas estavam maduras (Fase-IV) e 42,86% encontravam-se em desova parcial (Fase-V). Após 41 dias de condicionamento

(T1), 33,33% das fêmeas do tratamento com areia estavam maduras (Fase-IV), 50% em gametogênese avançada (Fase-III), e 16,67% em pós-desova (Fase-VI). Para o tratamento sem areia, 50% estavam em gametogênese avançada (Fase-III) e 50% maduras (Fase-IV). As fêmeas avaliadas em (T2) após 73 dias de acondicionamento, para o tratamento com areia encontravam-se com um desenvolvimento gonadal mais avançado do que as do tratamento sem areia, em que todas as fêmeas estavam maduras (Fase-IV). Por outro lado, no tratamento com areia, 80% das fêmeas estavam maduras (Fase-IV) e 20% já se encontravam em desova parcial (Fase-V) (Figura 11). No que se refere aos machos analisados, não se observaram diferenças entre T0 e T1 para o tratamento com areia encontrando-se 66,67% dos indivíduos em gametogênese avançada (Fase-III) e 33,33%, maduros (Fase-IV). Para o tratamento sem areia a totalidade dos machos encontravam-se menos desenvolvidos, em gametogênese avançada (Fase-III). No T2, 60% dos machos acondicionados com areia estavam em gametogênese avançada (Fase-III) e 40% em estágio maduro (Fase-IV); em comparação, os machos acondicionados sem areia encontravam-se mais maduros, sendo que todos apresentavam características da Fase-IV (Maduro) (Figura 12).

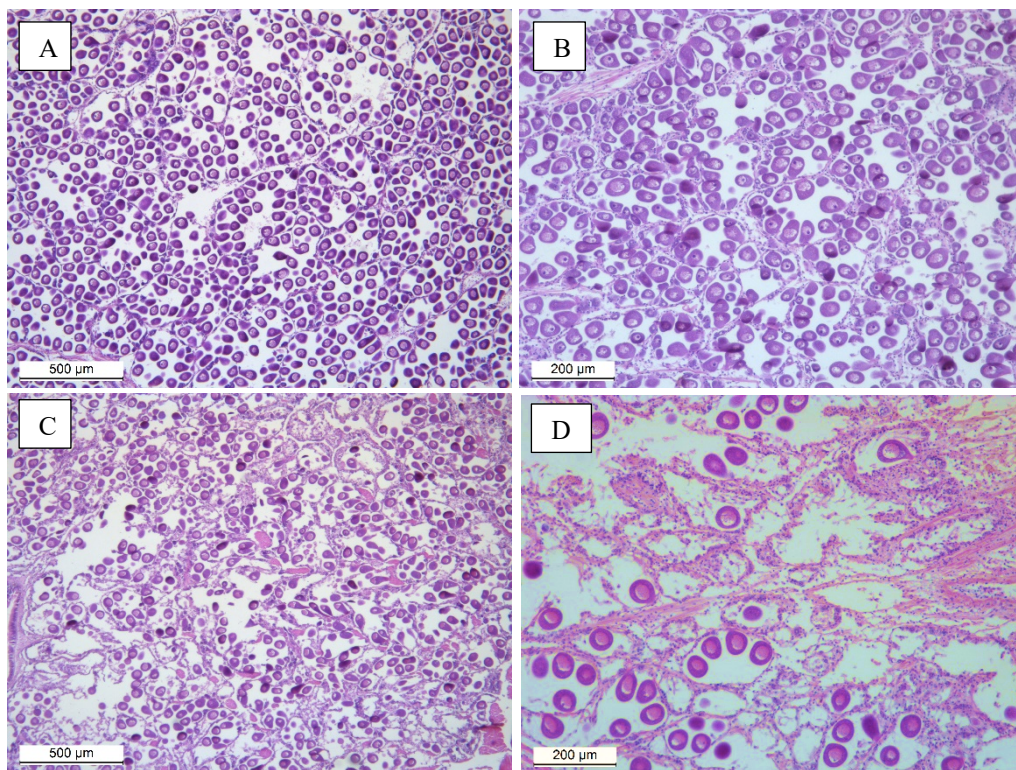


Figura 13-Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de fêmeas de *Ruditapes decussatus*. A- Gametogênese avançada, B- Maduro, C- Desova parcial e D- Pós-desova.

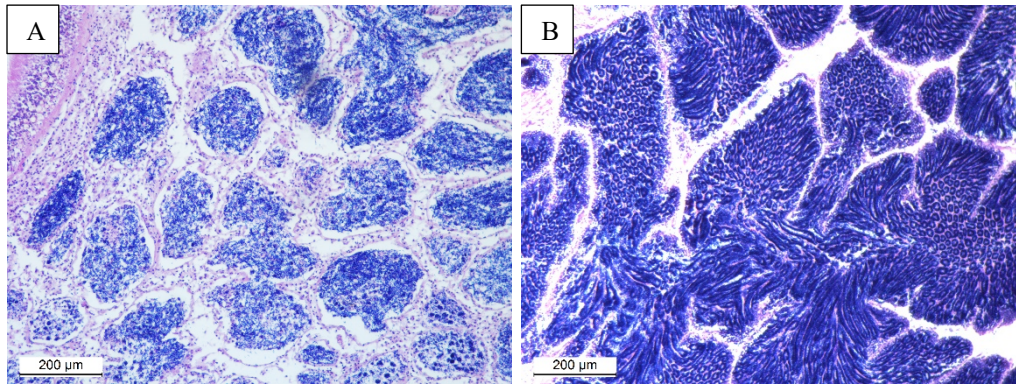


Figura 14- Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de machos de *Ruditapes decussatus*. A- Gametogénese avançada e B – Maduro.

O índice gonadal (IG) não mostrou diferenças estatisticamente significativas ao longo do acondicionamento quando comparados os 2 tratamentos (com e sem areia) (Figura 15): o início do ensaio (T0) verificou-se um IG de 3,9, aumentando em T1 para 4,4 e para 4,3 nos tratamentos com areia e sem areia, respetivamente. O valor mais elevado de IG foi observado no T2 em que se registou um valor de IG de 4,4 e de 5 para as amêijoas acondicionadas com e sem areia, respetivamente (Figura 15).

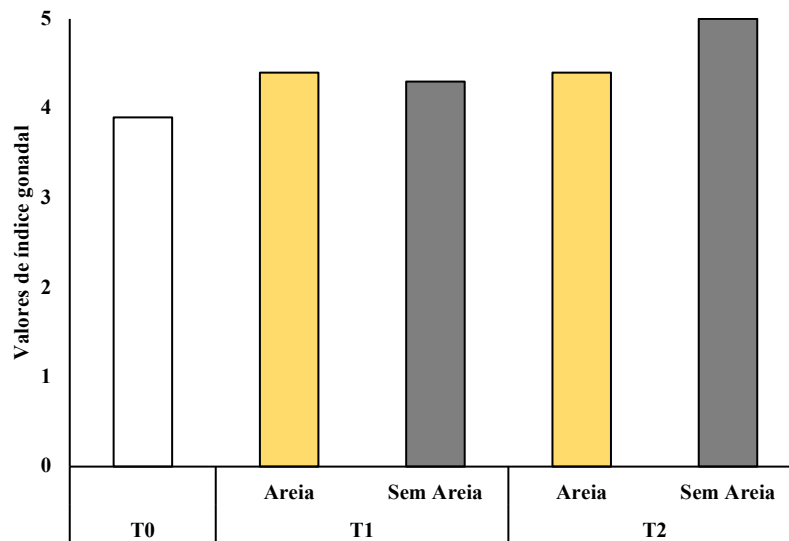


Figura 15- Valores de índice gonadal (IG) (média, n=10) em reprodutores *Ruditapes decussatus* acondicionados com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0- início, T1- 41 dias e T2- 73 dias) Período de repouso sexual = 0, Início da gametogênese= 3, Gametogênese avançada= 4, Maduro= 5, Parcialmente desovado= 2, Desovado= 1. O IG entre 0 (quando todos os indivíduos estão em repouso sexual) e 5 (quando todos os indivíduos estão na fase madura).

O IG entre fêmeas e machos houve diferenças para T0, em que os machos registraram um valor superior de IG de 4,33 e as fêmeas de 3,71 (Tabela 8). As fêmeas analisadas em T1, amêijoas acondicionadas com areia obtiveram um valor mais alto (IG= 4,43), comparativamente com as fêmeas acondicionadas sem areia (IG= 3,83). Contrariamente, os machos registraram um valor superior no acondicionamento sem areia (IG= 5). Como se pode observar na Tabela 8, para o último tempo de amostragem (T2) não houve qualquer diferença entre fêmeas e machos nos 2 tratamentos, com e sem areia.

Tabela 8 - Valores do Índice gonadal (IG) (média, n=10) *Ruditapes decussatus*, fêmeas e machos acondicionadas com e sem areia em 3 tempos de amostragem (T0 início, T1- 41 dias e T2- 73 dias)

Índice Gonadal			
Tempo	Tratamento	Fêmeas	Machos
T0		3,71	4,33
T1	Areia	4,43	4,33
	Sem Areia	3,83	5
T2	Areia	4,4	4,4
	Sem Areia	5	5

Na Tabela 9 é possível verificar os resultados da correlação de Pearson em que as correlações não foram significativas quer dos índices de condição e gonadal quer para o glicogénio com exceção do teor de proteínas que apresenta uma correlação positiva com o teor de lípidos totais ($r_{\text{Pearson}} = 0,447$, $p\text{-value} < 0,01$).

Tabela 9- Resultados da correlação de Pearson entre os parâmetros analisados (r- coeficiente de correlação; n.s- correlação não significativa).

	Glicogénio	Lípidos	Proteína	Índice condição (IC)	Índice gonadal (IG)
Glicogénio	n.s		n.s	n.s	n.s
Lípidos			$r = 0,447$ $p\text{-value} < 0,01$	n.s	n.s
Proteína				n.s	n.s
Índice de Condição (IC)					n.s

3.2 Método anestésico para *R. decussatus* e *V. corrugata*

3.2.1 Tempo para anestésiar *R. decussatus* e *V. corrugata*

Neste primeiro ensaio foi analisado o tempo necessário para anestésiar *R. decussatus* e *V. corrugata*, com uma concentração de anestésico de 50g/L de MgCl₂. Os exemplares de *V. corrugata* foram anestésidos mais rapidamente do que os de *R. decussatus* (Figura 16). Foram necessárias apenas 5 horas para que 80% dos indivíduos de *V. corrugata* ficassem anestésidos. Para os indivíduos do grupo de controlo de *V. corrugata*, após serem colocados nos tanques, observou-se uma desova espontânea (Figura 17). Pelo contrário, com *R. decussatus* após o tempo total de exposição ao anestésico (12 horas) apenas 40% dos indivíduos foram anestésidos (Figura 16).

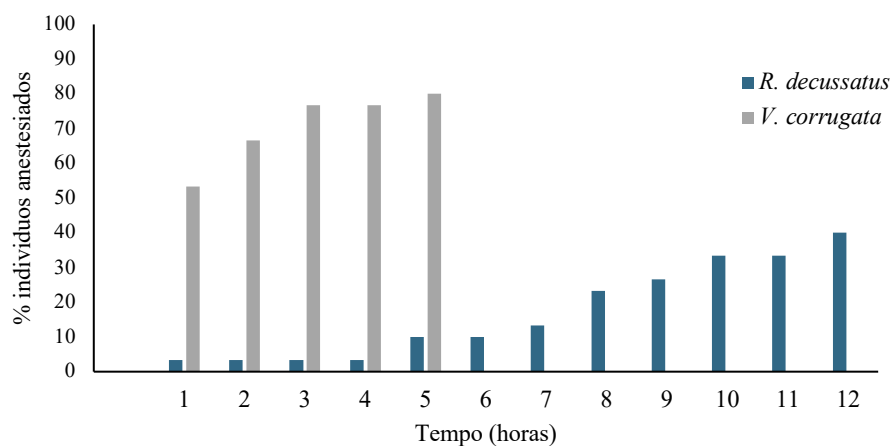


Figura 16- Efeito do anestésico MgCl₂ [50g/L] em *Ruditapes decussatus* e *Venerupis corrugata* (n=30).



Figura 17- Fotografia do grupo de Controlo de *V. corrugata* onde ocorreu uma desova espontânea.

A mortalidade ocorrida quer no grupo de controlo, quer no grupo exposto ao anestésico foi observada e registada ao longo de uma semana (Figura 18). A percentagem mais elevada de mortalidade ocorreu em *V. corrugata* que foi anestesiada (56,67%), seguida do grupo de controlo da mesma espécie (16,67%). No grupo de Controlo de *R. decussatus* não ocorreu mortalidade; já no grupo que foi anestesiado verificou-se uma mortalidade de 6,67%.

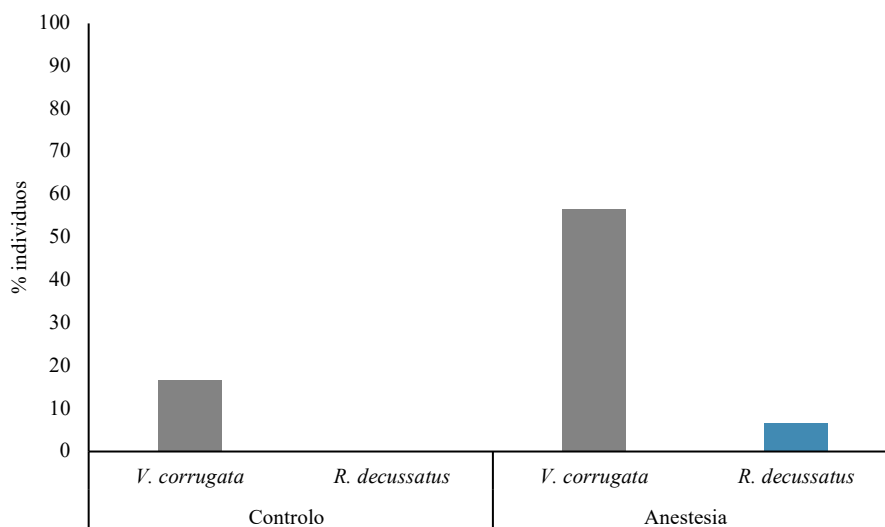


Figura 18- Mortalidade (% indivíduos) de grupo de controlo e com anestésico MgCl₂ [50g/L] em *R. decussatus* e *V. corrugata*.

3.2.2 Determinação da dose ideal para anestésiar *R. decussatus* e *V. corrugata*

Com base nos resultados obtidos no primeiro ensaio, realizou-se um segundo ensaio em que foram testadas diferentes concentrações de anestésico $MgCl_2$ para cada espécie. Em *R. decussatus* foram testadas 50 g/L, 55 g/L e 60 g/L e em *V. corrugata* foram testadas 15g/L, 25g/L e 50 g/L.

Dose para anestésiar *Ruditapes decussatus*

Neste segundo ensaio, *R. decussatus* obteve uma percentagem de indivíduos anestesiados de 60% em 12 horas de exposição, com a concentração de 50 g/L de $MgCl_2$, a mesma do primeiro ensaio. Com o aumento da concentração de anestésico para 55 g/L, as amêijoas atingiram 63% de indivíduos anestesiados com 12 horas de exposição. Quando a concentração aumentou para 60 g/L, 80% de indivíduos foram anestesiados apenas com 11 horas de exposição. A concentração que resultou numa maior percentagem de indivíduos anestesiados nas primeiras horas, foi a de 55 g/L. A 50% desses indivíduos já anestesiados, foi efetuada uma biópsia de tecido gonadal para a determinação do sexo dos indivíduos (Figura 19).

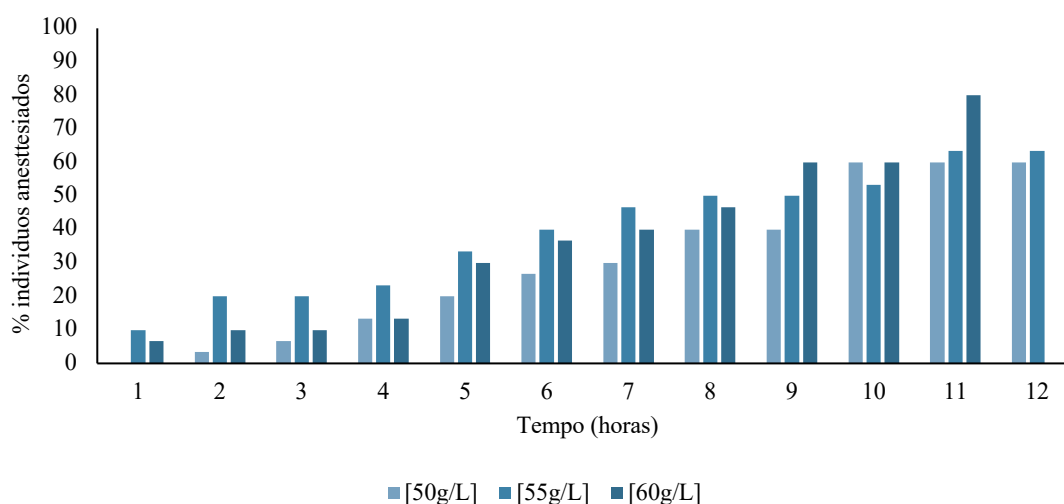


Figura 19 – Percentagem de indivíduos anestesiados com 3 concentrações de anestésico ($MgCl_2$) (50 g/L, 55 g/L e 60 g/L) em *Ruditapes decussatus* (n=30)

A mortalidade observada após a exposição a diferentes concentrações de anestésico em *R. decussatus* variou de 0% no grupo de Controlo e para a concentração de 60 g/L, e 3,33% para a concentração de 55g/L (Figura 20). Para os indivíduos que foram sujeitos à biópsia observou-se uma mortalidade de 23,33% (Figura 20).

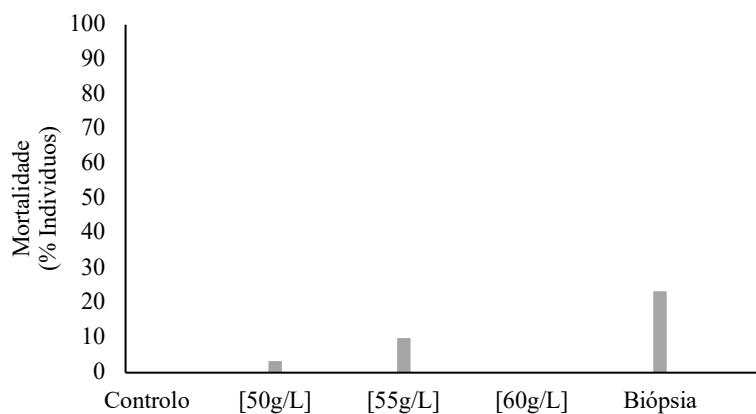


Figura 20- Mortalidade (% indivíduos) com 3 concentrações de anestésico MgCl₂ (50g/L, 55 g/L, 60 g/L) e biópsia em *R. decussatus*.

Dose para anestésiar *Venerupis corrugata*

As concentrações de anestésico MgCl₂ de 15g/L e 25g/L usadas para anestésiar *V. corrugata* não tiveram efeito (Figura 21). A concentração de 50 g/L utilizada no primeiro ensaio, permitiu anestésiar 80% dos indivíduos logo após 3 horas de exposição. A biópsia foi posteriormente realizada a 50% dos indivíduos anestesiados.

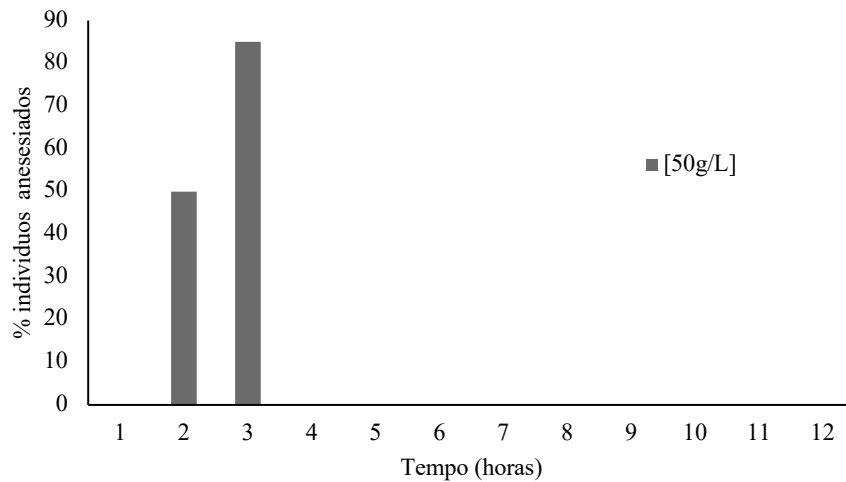


Figura 21 – Percentagem de indivíduos de *Venerupis corrugata* anesesiados com uma concentração de 50 g/L MgCl₂,

A mortalidade observada (Figura 22) após a exposição a diferentes concentrações de anestésico em *V. corrugata* variou de 0% em 15 g/L, 3,33% para a concentração de 25g/L e 6,67% para a concentração de 50 g/L. No grupo de Controlo houve uma mortalidade de 10% e a maior percentagem de mortalidade ocorreu no grupo que sofreu a biópsia (20%).

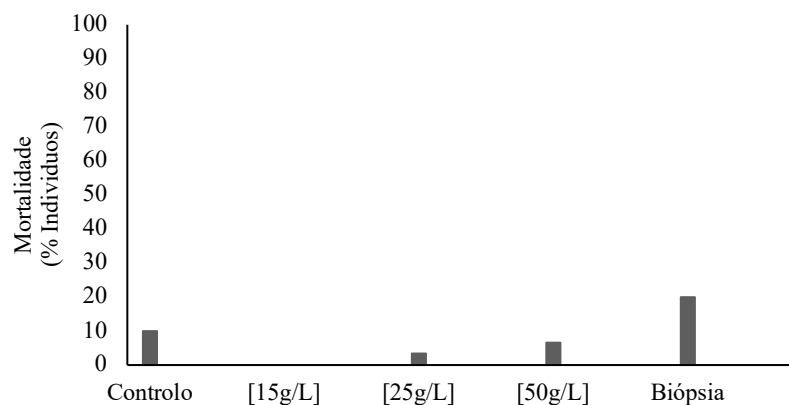


Figura 22- Mortalidade (% indivíduos) com 3 concentrações de anestésico MgCl₂ (15 g/L, 25 g/L, 50 g/L) e biópsia em *V. corrugata*.

A recolha de tecido gonadal através da biópsia permitiu a determinação do sexo dos indivíduos através da observação microscópica (Figura 23).

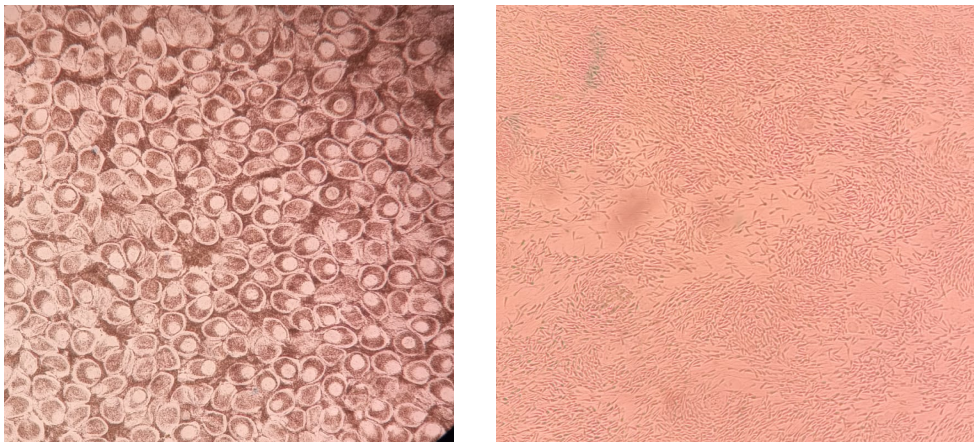


Figura 23- Observação microscópica de tecido gonadal, A- Fêmea (10x) e B- Macho (40x)

4 Discussão

Acondicionamento

Ao contrário dos ecossistemas naturais, as maternidades de bivalves oferecem um ambiente favorável e constante para o cultivo, reduzindo fontes de stress causadas por condições subótimas ou flutuantes (Nascimento-Schulze et al., 2021). Nestes sistemas artificiais, as condições ambientais podem ser manipuladas para desencadear a gametogénese nos reprodutores ao longo do ano, estendendo o período de disponibilidade de reprodutores maduros (Nascimento-Schulze et al., 2021). Condições inadequadas levam à redução da qualidade e quantidade dos gâmetas e por isso, a manutenção de condições ideais para reprodutores deve ser assegurada de forma a minimizar o stress (Ojea et al., 2008). Existem muitos estudos cujo objetivo é determinar o efeito das condições ambientais (temperatura, salinidade, fotoperíodo, disponibilidade de alimento e composição da dieta) nos processos reprodutivos em bivalves (Anjos et al., 2017; Argüello-Guevara et al., 2013; Domínguez et al., 2010; Magaña Carrasco et al., 2018; Utting & Millican, 1997). Porém, poucos estudos avaliam a necessidade do acondicionamento de reprodutores em substrato, embora seja esta a condição natural de muitas espécies de bivalves. Por isso, ter o controlo nos processos reprodutivos desempenha um papel crítico na produção de qualquer espécie.

No início deste estudo, houve dificuldades na obtenção de reprodutores *R. decussatus* devido a recorrentes episódios de mortalidade que têm ocorrido nos bancos naturais. Por esse motivo, foram usados reprodutores de diferentes origens, nos quais se quantificou a intensidade de infeção por *Perkinsus* sp.. Dos animais analisados, independentemente da sua origem, grande parte apresentava sinais de infeção: 30% apresentaram ausência do parasita, 30% infeção muito ligeira, 30% infeção ligeira e apenas 10% indicou infeção muito intensa. Sabe-se que os efeitos na capacidade reprodutiva dos bivalves devido a infeções patológicas são uma das principais causas da diminuição da produção e recrutamento em bancos marinhos e estuarinos. De acordo com Casas & Villalba, 2012; Fernández-Boo et al., 2023; Park et al., 2006; Soudant et al., 2013; Villalba et al., 2011, este parasita pode provocar efeitos graves na fisiologia do hospedeiro, originando um

desequilíbrio energético, um (Dittman et al., 2001; Villalba et al., 2004) atraso na maturação das gónadas e impactos na reprodução que pode causar mortalidade massiva ou infeção por outros patógenos, levando a um comprometimento das funções biológicas de defesa.

Durante o acondicionamento, a mortalidade foi monitorizada e apresentou a mesma tendência entre tratamentos (Com e Sem Areia) sendo o tratamento com areia aquele que apresentou uma percentagem de mortalidade maior (59%). Nos primeiros 30 dias (fase de adaptação), houve um aumento acentuado da mortalidade (38,4% por mês entre o T0 e T1 – 41 dias), e, verificando-se posteriormente uma estabilização em ambos os tratamentos (4,7% por mês entre o T1 e T2 – 32 dias). Neste ensaio, o tratamento com areia parece não ter promovido uma menor taxa de mortalidade, tal como observado por Martínez-Pita et al. (2008), aquando do acondicionamento de *Calista chione*. Nesse estudo, o acondicionamento decorreu durante 60 dias, tendo ocorrido a mortalidade de 50% dos indivíduos mantidos sem substrato, enquanto nos indivíduos mantidos em substrato a mortalidade foi de 20%. Perante a elevada percentagem de mortalidade observada durante o acondicionamento de *R. decussatus*, seria importante fazer um seguimento histopatológico com recolha de brânquias dos indivíduos ao longo do acondicionamento, a fim de entender a evolução da infeção por *Perkinsus sp.* e de que forma a utilização do substrato pode ter influenciado.

Conhece-se que a produção desta espécie tem sofrido um declínio causado por mortalidades massivas que estão associadas a fatores sinérgicos que contribuíram para essas flutuações, como stress biótico (causado por doenças) e abiótico (causado por fatores ambientais) (Estêvão et al., 2023) daí a dificuldade da obtenção dos reprodutores para este estudo. A temperatura e a salinidade da água, a presença de poluentes específicos e a composição dos sedimentos onde as amêijoas vivem são fatores abióticos que devem ser levados em consideração (De Montaudouin et al., 2010). Estes fatores estão a agravar -se devido às alterações climáticas e à poluição antropogénica, que podem reduzir ou comprometer a sua capacidade respiratória quando combinadas com lesões nas brânquias causada pela infeção por parasitas, tornando-as menos resistentes a baixos níveis de oxigénio (Binias et al., 2014). Considera-se o tamanho/idade do hospedeiro com uma relação com prevalência de infeção e a intensidade da perkinsose. Em amêijoas *R. decussatus* maiores de 34 mm e infetadas com *P. olseni* apresentam maior taxa de

mortalidade do que as mais jovens (Villalba et al., 2005). No entanto, *Perkinsus olseni* não é considerado mortal para espécies de moluscos, mas sim os fatores sinérgicos juntamente com a alta prevalência de infecção, que causam incapacidade de homeostase metabólica pelo hospedeiro, acabando numa incapacidade de subsistência do organismo (Ruano et al., 2015; Villalba et al., 2004). Em *R. decussatus*, a alta infecção por *P. olseni* causa inibição da gametogénese, redução do número de amêijoas com gónada madura e uma diminuição significativa do tecido de armazenamento e gâmetas, enquanto a infiltração hemocítica da gónada aumenta (Estêvão et al., 2023).

O índice de condição (IC), um dos parâmetros que avalia a condição fisiológica dos bivalves, não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Com e Sem areia), assim como o IC avaliado antes do acondicionamento não revelou diferenças entre os indivíduos. O IC deveria aumentar com o desenvolvimento gonadal e neste estudo isso não se verificou, muito embora o IG para T2 terá sido de 5. Ainda assim, houve uma tendência notória nos valores do IC mais baixos no acondicionamento com areia em todos os tempos de amostragem (T1 e T2). O valor mais elevado do IC foi de $7,69 \pm 1,90$ após 41 dias de acondicionamento (T1). Este valor é considerado baixo quando comparado com Abbas et al., (2018) que fez um acondicionamento sem areia de 48 dias e obteve valores bastante mais elevados de IC de 18,43 em *R. decussatus*. Também Matias et al., (2016) fez o acondicionamento com *R. decussatus* durante 8 semanas e obteve um IC de $19,5 \pm 2,0$ com uma temperatura de acondicionamento de 20°C com uma dieta *Chaetoceros calcitrans* e T-ISO, à exceção do tratamento 'starved'. Sabe-se ainda que valores elevados de IC são bons indicadores de acumulação de reservas alimentares que serão usadas para o desenvolvimento gonadal (Abbas et al., 2018; Aldrich & Crowley, 1986; Dare & Edwards, 1975). Desde o início do acondicionamento (T0) até T1 houve uma diminuição do IC. Esta diminuição poderá estar relacionada especificamente com perdas de tecidos de reserva, devido à utilização de toda a energia disponível para o maturação sexual e reprodução (Abbas et al., 2018; Delgado & Camacho, 2005). Tal como descrito por Barber & Blake (1981) e Castro & de Vido de Mattio (1987), nos bivalves existe uma estreita relação entre o ciclo reprodutivo e os ciclos de armazenamento e utilização de energia. Assim, o ciclo reprodutivo é controlado pela temperatura e disponibilidade de alimento que regulam principalmente o tempo e a taxa

de armazenamento de energia, sendo o efeito destas variáveis complexo e dependente da aquisição e gasto de energia (Pérez-Camacho et al., 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram que a temperatura utilizada foi favorável ao amadurecimento das gónadas dos indivíduos. A temperatura de acondicionamento utilizada para *R. decussatus* foi de $19,51 \pm 0,27^\circ\text{C}$. Esta temperatura está de acordo a que foi reportada por Da Costa et al., (2012), Dubert et al., (2016) e Matias et al., (2016). Nos seus estudos, estes autores revelam que uma temperatura constante (20°C) e/ou um aumento gradual da temperatura do meio natural até à temperatura de acondicionamento são duas estratégias adequadas para obter amêijoas adultas sexualmente maduras. Ojea et al., (2008) revela ainda que um aumento gradual durante o acondicionamento, desde os 14°C até aos 20°C , tem maior sucesso aquando do decorrer de uma desova. Adicionalmente Abbas et al., (2018), testou um aumento gradual da temperatura da água de $17,5^\circ\text{C}$ até 22°C , obtendo uma redução no tempo de maturação. De acordo com o estudo de Matias et al., (2016) os seus resultados mostraram que o tempo necessário para completar o processo da gametogénese está inversamente correlacionado com a temperatura provavelmente pelo facto de que a uma temperatura de 22°C os indivíduos gastam mais energia no metabolismo basal e por isso menos é alocada para o crescimento somático.

A dieta utilizada para o acondicionamento dos reprodutores foi de 3% do peso seco de amêijoas por peso seco de microalga. De acordo com Utting (1997), para acondicionar a maioria dos bivalves a proporção da dieta deve variar entre 3 e 6% do peso seco da carne em peso seco de microalgas por dia. Por isso, a percentagem de dieta utilizada, não terá sido um fator limitante na maturação de *R. decussatus*. A caracterização das dietas é importante uma vez que uma dieta controlada e constituída por mais do que uma espécie de microalga influencia a fisiologia dos bivalves, particularmente as proteínas, hidratos de carbono e especialmente os lípidos (Joaquim et al., 2011; Matias, et al., 2009; Rato et al., 2018). A composição da dieta utilizada para o acondicionamento de *R. decussatus* foi uma mistura de espécies de microalgas, - 40% diatomácea (*C. gracilis*) e 60% flageladas (*T. suecica*+ *I. galbana*+ T-ISO + *D. lutheri*) - uma vez que estas variam consideravelmente o seu valor nutricional e somente misturando é possível obter

condições nutricionais ideais. Contudo, alguns autores defendem que uma dieta composta, principalmente por diatomáceas, resulta em melhores resultados no desempenho reprodutivo do que uma dieta dominada por flagelados (Anjos et al., 2017; Pronker et al., 2008). Por isso, a composição da dieta deveria ter sido ajustada com a adição de pelo menos mais uma espécie de diatomácea. A composição bioquímica da dieta não foi avaliada, e esta determinação teria sido importante para conhecer o seu valor nutricional e saber efetivamente se estaria conforme as necessidades de *R. decussatus*. No estudo de Matias et al., (2016) a dieta que resultou em amêijoas com melhor desempenho reprodutivo foi uma dieta composta por T-ISO e *Chaetoceros calcitrans* em iguais proporções, comparativamente com dietas monoespecíficas.

As proteínas foram o constituinte predominante do tecido seco das amêijoas, seguidas pelos lipídios totais e glicogénio. Neste estudo observou-se uma correlação positiva das proteínas com os lipídios totais. O teor das proteínas não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre T0 e T1; contudo, no final do ensaio (T2), os valores aumentaram significativamente, sendo o maior valor observado no tratamento sem areia. As proteínas constituem, quantitativamente, a maior fração nos oócitos e outros tecidos moles dos bivalves, e assumem o papel de fornecer energia durante a maturação sexual (Camacho et al., 2003). De acordo com vários autores, nos bivalves, as proteínas somáticas são utilizadas como reserva energética em situações de stress nutricional e desequilíbrio energético ou durante a maturação gonadal (Gabbott & Bayne, 1973; Liu et al., 2008; Matias et al., 2013), e também como fonte de manutenção energética quando as reservas dos hidratos de carbono já foram esgotadas (Albentosa et al., 2007; da Costa, 2012; Matias et al., 2013). Visto que o valor das proteínas aumentou no final do ensaio, principalmente na condição sem areia, estima-se então que as amêijoas desta condição se encontravam mais maduras, o que também foi confirmado pelos valores do IG em T2 que foi de 5, revelando que os indivíduos analisados estavam maduros. A análise histológica realizada revela que os resultados foram diferentes entre machos e fêmeas. Para tratamento com areia, 80% das fêmeas estavam maduras (Fase-IV) e 20% já se encontravam em desova parcial (Fase-V); no tratamento sem areia, todas as fêmeas estavam maduras (Fase-IV). No caso dos machos acondicionados com areia, 60% estavam em gametogénese avançada (Fase-III) e 40% em estágio maduro (Fase-IV); por

outro lado, os machos acondicionados sem areia encontravam-se mais maduros, sendo que todos apresentavam características da Fase-IV (Maduro). Os oócitos avaliados na condição sem areia, encontravam-se na sua totalidade maduros; por esse motivo pode dizer-se que estes animais teriam um melhor desenvolvimento gonadal comparativamente com a condição com areia.

Nos bivalves marinhos adultos, os hidratos de carbono, principalmente o glicogénio, são considerados a principal fonte de energia. São importantes na formação de gâmetas e na manutenção da condição adulta durante períodos de maior stress ou no inverno (Gabbott, 1975). As variações no conteúdo de hidratos de carbono mostram uma relação inversa com o estado de maturação das gónadas (Camacho et al., 2003; Martínez et al., 1993). A fecundidade e a qualidade dos ovos estão intimamente relacionadas com os ciclos de glicogénio e a síntese de lípidos durante a vitelogénese, da qual dependem as reservas de glicogénio (Gabbott, 1983). A interrupção desses ciclos, causada pelo acondicionamento artificial a temperaturas elevadas, pode forçar o desenvolvimento de oócitos antes de terem acumulado glicogénio suficiente para a síntese lipídica (Ojea et al., 2008).

No presente estudo, o glicogénio diminuiu após o início do acondicionamento sendo o valor mais elevado observado na primeira amostragem (T0). Relativamente aos tratamentos, a condição com areia revelou sempre valores mais baixos de glicogénio. O elevado valor de glicogénio no início do estudo, seguido de um decréscimo acentuado, pode indicar que houve uma desova espontânea, uma vez que estes valores elevados de glicogénio ocorrem imediatamente antes e durante a proliferação de gâmetas (Barber & Blake, 1985; Ojea et al., 2004). Os níveis baixos de glicogénio podem ser explicados pela existência de uma variação também nos lípidos, uma vez que estes estão inversamente relacionados, devido à conversão do glicogénio em lípidos, biosintetizados durante a formação de gâmetas (Gabbott 1975). No entanto, não foi encontrada qualquer correlação significativa entre o glicogénio e os lípidos totais. Pela inexistência desta correlação, e sendo o glicogénio uma reserva metabólica primária nos bivalves, pode considerar-se que estavam sob algum fator de stress que pode ter levado à mortalidade, pois o glicogénio é considerado adequado como marcador fisiológico para avaliação da condição e saúde dos bivalves (Vodáková & Douda, 2019). As concentrações de glicogénio e tecidos moles são amplamente utilizadas para monitorizar os impactos do stress sob diferentes condições

(Anacleto et al., 2013; Cordeiro et al., 2016) em estudos ecotoxicológicos (Hazelton et al., 2014). O glicogénio é catabolizado para adicionar glicose à hemolinfa quando o nível diminui ou quando é mobilizado pela influência de algum fator de stress, o nível de glicogénio diminui muito antes de as mudanças nas taxas de crescimento e sobrevivência serem conhecidas (Sim-Smith & Jeffs, 2011).

O conteúdo de lípidos totais reflete também o processo de acumulação de energia e o seu consumo durante o desenvolvimento somático dos bivalves, como já foi relatado anteriormente por outros autores (Albentosa et al., 2007; Joaquim et al., 2011). No presente estudo, o teor lipídico não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, revelando um aumento ao longo do acondicionamento, atingindo o valor máximo em T2. Este facto poderá indicar que os reprodutores estavam num período pré-desova quando o ensaio terminou, uma vez que, os lípidos, fazem parte das reservas durante períodos de deficiência nutricional (Beninger & Lucas, 1984) e particularmente os fosfolípidos são um componente importante dos gâmetas (funções de reservas nos oócitos, funções estruturais nas membranas nos ovócitos e nos espermatozoides) dos bivalves (Matias et al., 2016). Por esse motivo, os seus níveis máximos associam-se ao período pré-desova. Sabe-se que existem diferenças na composição bioquímica (principalmente lipídica) entre machos e fêmeas durante o desenvolvimento gonadal (Delgado et al., 2004). Nesta análise, a proporção entre machos e fêmeas foi a mesma para ambos os tratamentos.

Quanto ao índice gonadal (IG) não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Comprova-se através da análise de IG que o acondicionamento foi iniciado numa fase em que alguns dos indivíduos já estavam maduros (40% fêmeas e 10% machos), 30% das fêmeas estavam em desova parcial e os restantes 20% de machos encontravam-se em gametogénese avançada. No decorrer do acondicionamento foi possível verificar que existe sincronismo no desenvolvimento das gónadas entre machos e fêmeas, embora a proporção M:F não tenha sido a mesma para todas as amostragens.

Em suma, neste estudo, o acondicionamento de *R. decussatus* com a utilização de substrato arenoso não mostrou diferenças no desenvolvimento gonadal dos indivíduos, comparativamente com o acondicionamento sem substrato. As diferenças no

acondicionamento, no sucesso da desova e na viabilidade larval dependem da condição inicial dos reprodutores e da fase da gametogénese em que os adultos se encontram quando começam o acondicionamento (Delgado et al., 2016; Matias, et al., 2009; Ojea et al., 2008). Neste estudo, os resultados do acondicionamento podem ainda estar associados às diferentes origens geográficas dos indivíduos utilizados (Matias, et al., 2009). É de notar que a grande maioria dos animais acondicionados poderiam estar debilitados pelo facto de estarem infetados com protozoários intracelulares branqueais, que influenciariam a respiração ou as taxas de ingestão alimentar e assim determinar a quantidade de energia assimilada pelos indivíduos para o crescimento somático e reprodutivo. No final do acondicionamento, visto que se obtiveram indivíduos sexualmente maduros em ambos os tratamentos (Com e Sem areia), teria sido relevante a indução da desova, de forma a entender se haveria diferenças no sucesso da desova, na fecundidade, na taxa de fertilização e no desenvolvimento de larvas D.

O substrato arenoso utilizado pode ter influenciado o acondicionamento dos reprodutores. A espécie *R. decussatus*, no seu meio natural pode ser encontrada em areia, cascalho enlameado ou até argila. De facto, a areia utilizada não teve proveniência de nenhuma origem dos indivíduos utilizados e isso pode ter sido um fator de stress. Para os bivalves escavadores, viver sob o sedimento é um comportamento arriscado, pois pode ser capturado por predadores (Zaklan & Ydenberg, 1997). No entanto, como a vida superficial está associada a uma maior ingestão de alimentos, quando a condição corporal é baixa, esse é um risco que vale a pena assumirem (Compton et al., 2016). Neste estudo, todos os bivalves acondicionados no substrato se encontravam enterrados na areia, com os sifões visíveis, o que leva a acreditar que se encontravam numa condição normal, não havendo a necessidade de se desenterrarem para capturar mais alimento. Sabe-se ainda que o substrato atua como um tampão térmico (Befus et al., 2013), uma vez que a temperatura nas camadas mais profundas do sedimento é mais baixa do que à superfície (Befus et al., 2013), fazendo com que, possivelmente, neste estudo a temperatura de acondicionamento para as amêijoas enterradas fosse um pouco inferior que no tratamento sem areia, ainda assim este não foi um fator avaliado.

Futuramente seria de grande interesse testar outro tipo de sedimento para o acondicionamento, como cascalho ou lama pois esta espécie pode habitar zonas de substrato muito distinto. Outra condição a ter em consideração será o aumento da

profundidade do sedimento, a profundidade utilizada foi de 4 centímetros e, *R. decussatus* pode ser encontrada até 12 centímetros de profundidade.

Anestesia

Um fator que limita fortemente o desenvolvimento de *R. decussatus* em maternidades é a obtenção de gametas férteis por remoção gonadal. As amêijoas, como a maioria das espécies de bivalves, apresenta fecundação externa. A remoção do tecido gonadal revela oócitos não desenvolvidos em estágios de maturação com a estrutura germinativa intacta (Lopes et al., 2023), isto acontece porque os oócitos de algumas espécies passam por um processo de maturação durante a passagem dos ovidutos antes de serem libertados (Colas & Dubé, 1998). A quebra da vesícula germinativa (GVBD) é um processo natural que ocorre no ambiente externo quando os oócitos em metáfase I são libertados. Este processo é considerado um sinal de maturação do oócito. Para continuar a fase de GVBD, os ovócitos podem passar por um período de hidratação no ambiente externo (Melo et al., 2015). Fatores ambientais como a salinidade afetam o tempo de incubação e a extrusão de corpos polares (Lopes et al., 2023). O conhecimento das variáveis ambientais na GVBD do oócito e no momento da libertação dos corpos polares é fundamental para aumentar o sucesso da fertilização em maternidades, alcançar maior controle nos estágios subsequente do desenvolvimento embrionário (Qin et al., 2018).

Na maioria dos moluscos bivalves o dimorfismo sexual raramente é observado, e por esta razão é difícil determinar o sexo e o estágio reprodutivo sem observação microscópica dos órgãos reprodutivos. O método convencional de determinar a proporção entre o sexo e o estágio de desenvolvimento de uma população envolve sacrificar indivíduos e fazer observações anatômicas grosseiras de gónadas ou mais precisamente, dissecar, seccionar e corar os órgãos reprodutivos para análise microscópica (Arcos et al., 2009; Lango-Reynoso et al., 2000). Este método fornece informações abrangentes sobre o desenvolvimento da gónada, mas é muito tedioso para ser realizado com regularidade numa maternidade comercial, requer o sacrifício de alguns indivíduos e não fornece informações sobre o sexo e o estágio de desenvolvimento sobre os que não são sacrificados, mas mantidos para desova. Além disso, o desenvolvimento da gónada segue um ciclo, sendo esta um órgão transitório não é possível determinar o sexo em estágios iniciais (fase de repouso ou desenvolvimento precoce). Adicionalmente, *R. decussatus*

tende a ter um desenvolvimento síncrono (Ojea et al., 2004) ao contrário de *V. corrugata* em que a gónada se desenvolve de forma assíncrona mostrando simultaneamente nos mesmos folículos gametogénicos, maduro e precoce na gónada (Cerviño Otero, 2012), fazendo com que seja mais difícil estimar a maturação numa população.

Alternativamente, cloreto de magnésio tem sido utilizado como anestésico com sucesso em muitos invertebrados, como no ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Arafa et al., 2007), cefalópodes (Messenger et al., 1985), vieiras *Pecten fumatus* (Heasman et al., 1995), rainha- das-conchas *Strombus gigas* (Acosta-Salmon & Davis, 2007), ostra pérola *Pinctada albina* (Norton et al., 1996), ostra plana *Ostrea edulis* (Culloty & Mulcahy, 1992), e ostra-do-pacífico *Magallana gigas* (Namba et al., 1995).

Neste estudo, a imersão das duas espécies de amêijoas, *V. corrugata* e *R. decussatus*, em cloreto de magnésio mostrou um efeito positivo na anestesia, com a mesma concentração de $MgCl_2$ (50g/L). A amêijoas *V. corrugata* demonstrou ser mais facilmente anestesiável, isto é, apenas com 1 hora de exposição ao anestésico observou-se que mais de 50% de indivíduos estavam anestesiados. No que diz respeito a *R. decussatus*, foram necessárias 12 horas de exposição, sendo que apenas 40% dos indivíduos ficou anestesiado.

Uma possível explicação para o efeito da anestesia diferir entre as espécies poderá ser o habitat. *R. decussatus* habita em zonas de maré baixa, e por isso, estão constantemente sujeitos a variações extremas de fatores abióticos e bióticos (Horn et al., 2021). A exposição a variações crónicas de temperatura, oxigénio, salinidade, pH, disponibilidade de alimentos e predação, pode ter impactos profundos na fisiologia e na capacidade de sobrevivência (Connell, 1972; Foster, 1988; Solan & Whiteley, 2016).

Isto pode ser explicado pela diferença quer no tamanho, quer na composição da estrutura dos dois músculos adutores de ambas as espécies (da Costa, 2012). Esses músculos realizam dois tipos de movimento, lento e contínuo, produzido pelas fibras musculares lisas, responsáveis por manter as valvas fechadas por várias horas e por contrações rápidas, fortes, mas de curta duração, geradas transversalmente ou por fibras duplas estriadas obliquamente (Castro-Claros et al., 2021). No músculo adutor de *C. gigas*, foi demonstrado que as partes lisas e estriadas do músculo adutor apresentam perfis enzimáticos diferentes, reforçando as funções fisiológicas distintas das duas partes do músculo (Guévelou et al., 2013). A amêijoia *R. decussatus* vive muito mais tempo fora de água comparativamente com *V. corrugata*, o que pode explicar o facto de conseguir permanecer mais tempo com as valvas fechadas, isto porque as amêijoas *V. corrugata* tendem a habitar na zona submareal e, logo, estão menos expostas às marés, por esse motivo os músculos adutores de *V. corrugata* poderão ter na sua composição menor percentagem de fibras musculares lisas fazendo com que não consiga permanecer com as valvas fechadas por muito tempo. Posto isto, a adição do cloreto de magnésio, proporciona um relaxamento mais fácil do músculo adutor e, portanto, uma anestesia mais rápida. O efeito de $MgCl_2$ envolve principalmente o bloqueio dos canais de cálcio na membrana dos terminais pré-sinápticos e consequentemente interfere na transdução do sinal elétrico (Azizan et al., 2021; Namba et al., 1995). O papel das correntes iónicas na fisiologia dos oócitos é descrito em várias espécies de animais (Tosti & Boni, 2004). Em particular, as correntes de cálcio mostram ser vitais na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos. O cálcio está envolvido na fisiologia do oócito desde a oogénese até à maturação e fertilização (Tosti, 2006). De acordo com Colas & Dubé, (1998) um influxo precoce de Ca^{2+} é um pré-requisito para permitir a ativação de oócitos bloqueados pela prófase I na maioria, senão em todas as espécies de protostómios. Em indivíduos do género *Ruditapes*, durante a maturação, os canais funcionais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são expressos entre a prófase e a metáfase I (Sousa, 2014). Por esse motivo o bloqueio destas correntes iónicas pelo uso de $MgCl_2$ terá certamente impacto na maturação e fertilização em *R. decussatus* e *V. corrugata*. Por esta razão, seria interessante ver se o uso de $MgCl_2$ poderia ter impacto no sucesso do condicionamento numa fase inicial. Se assim for, $MgCl_2$ pode não ser o melhor anestésico para realizar uma biópsia em animais maduros.

Neste estudo, houve uma desova espontânea no grupo de controlo de *V. corrugata*, e de acordo com Heasman et al. (1995) o cloreto de magnésio também é conhecido por prevenir a desova induzida por stress em bivalves. Por esse motivo, podemos dizer que as amêijoas expostas ao anestésico $MgCl_2$ poderiam estar sob stress, mas este evitou que tivessem desova espontânea, ao contrário das amêijoas do controlo. Contrariamente, estudos revelaram a ocorrência de desovas espontâneas com o uso de $MgCl_2$, em ostra de rocha de Sydney *S. glomerata* (Butt et al., 2008) e no ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Arafa et al., 2007) mas ainda não se sabe muito sobre este tipo de desova e se poderá afetar a qualidade dos gâmetas que são libertados.

A dose ideal de $MgCl_2$ para anestésiar *R. decussatus* será de 55g/L, uma vez que neste estudo foi a dose que resultou em maior percentagem de amêijoas anestesiadas em menos tempo. O aumento da dose (60g/L) em *R. decussatus* não resultou em maior percentagem de indivíduos anestesiados em menos tempo, pelo que, apenas ultrapassou a dose de 55g/L na 9ª hora de exposição a $MgCl_2$. Para *V. corrugata* a dose que resultou em maior percentagem de indivíduos anestesiados foi a de 50 g/L, sendo que as doses de 15 e 25 g/L de $MgCl_2$ não causaram efeito. A mortalidade motivada pelo efeito do anestésico $MgCl_2$ para ambas as espécies, foi mais elevada nos indivíduos que sofreram a biópsia, sendo que o valor mais elevado foi de 23,3 % de mortalidade para *R. decussatus* e de 20% para *V. corrugata*. Num estudo realizado com ostra plana (*Ostrea edulis*) (Suquet et al., 2010) as doses utilizadas de 50 g/L e 72 g/L não mostraram diferenças quer na percentagem de ostras anestesiadas, quer na mortalidade subsequente não ultrapassando os 7%, ainda assim o aumento da temperatura de 14,9 para 18,8°C mostrou efeito no número de ostras anestesiadas não afetando a mortalidade subsequente. O peso e o tamanho dos indivíduos não foram considerados neste estudo, de acordo com Suquet et al., (2010) o peso das ostras não revelou efeito significativo no número de ostras anestesiadas e na sua sobrevivência.

Ainda permanecem incertezas significativas sobre os efeitos moleculares, celulares e fisiológicos dos agentes anestésicos e relaxantes musculares em invertebrados (Armstrong et al., 2018, Lewbartt & Mosley, 2012). É importante também estudar os perfis metabólicos em cada espécie, pois fornecem informações sobre o que está a acontecer a nível metabólico e a nível fisiológico (Azzian et al., 2021).

Os bivalves exibem uma diversidade surpreendente de sistemas sexuais, com determinantes genéticos e ambientais do sexo, e possivelmente o único exemplo de genes mitocondriais que influenciam as vias de determinação sexual em animais (Capt et al., 2019). Os mecanismos genéticos de determinação do sexo em bivalves tem sido explorados com estudos citogenéticos e de razão sexual, identificação e isolamento de marcadores de DNA específicos do sexo usando análises de expressão diferencial e levantamento e comparação de genomas e/ou genes ou transcriptomas (Breton et al., 2018). Na ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) tem sido realizada uma análise sistemática de genes STAT (transdutor de sinal e ativadores da transcrição) (Ye et al., 2024) que permite traçar perfis de expressão em diferentes estágios de desenvolvimento e estágios gonadais, estudos como este, podem ser aplicados também para amêijoas para entender melhor os mecanismos moleculares da diferenciação sexual em moluscos.

Também o recurso a métodos não invasivos, em alternativa a biópsias para a recolha de material biológico adequado para análises de DNA tem sido estudado em vários moluscos incluindo a captura de muco em filtros Whatman em juvenis de *Haliotis midae* (Slabbert & Roodt-Wilding, 2006), limpeza do manto, vísceras e pé com escovas e/ou extração de hemolinfa usando uma seringa em duas espécies de mexilhões de água doce, *Quadrula pustulosa* (Henley et al., 2006), *M. margaritifera* (Karlsson et al., 2013).

5 Conclusão e perspectivas

Em conclusão, o acondicionamento de *R. decussatus* em substrato arenoso não revelou diferenças na sobrevivência e no desenvolvimento gonadal dos indivíduos.

Este estudo permitiu ainda desenvolver um método não letal para a avaliação do sexo em *R. decussatus* e *V. corrugata*. O protocolo de anestesia com $MgCl_2$ mostrou ser seguro para as duas espécies e com baixa mortalidade subsequente. A dose que melhor resultou em *V. corrugata* foi de 50g/L, enquanto para *R. decussatus* foi de 55g/L. A aplicação desta metodologia em aquacultura é uma ferramenta que pode eliminar as limitações da amostragem letal bem como a amostragem repetida de indivíduos.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A. S. A., El-Wazzan, E., Khafage, A. R., El-Sayed, A. F. M., & Abdel Razek, F. A. (2018). Influence of different microalgal diets on gonadal development of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* broodstock. *Aquaculture International*, 26(5). <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0284-9>
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U., & Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(2), 241–249. <https://doi.org/10.1016/J.CBPPB.2006.10.109>
- Aldrich, J. C., & Crowley, M. (1986). Condition and variability in *Mytilus edulis* (L.) from different habitats in Ireland. *Aquaculture*, 52(4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90370-4)
- Alipia, T. T., Mae, H., & Dunphy, B. J. (2014). A non-invasive anaesthetic method for accessing the brood chamber of the Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48(3). <https://doi.org/10.1080/00288330.2014.909505>
- Amaro, H. M., Rato, A., Matias, D., Joaquim, S., Machado, J., Gonçalves, J. F. M., Vaz-Pires, P., Ozorio, R. O. A., Pereira, L. F., Azevedo, I. C., Sousa-Pinto, I., & Catarina Guedes, A. (2019). Alga diet formulation – An attempt to reduce oxidative stress during broodstock conditioning of Pacific oysters. *Aquaculture*, 500. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.060>
- Anacleto, P., Maulvault, A. L., Barrento, S., Mendes, R., Nunes, M. L., Rosa, R., & Marques, A. (2013). Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture*, 408–409, 136–146. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.05.035>
- Aníbal, J., Esteves, E., & Rocha, C. (2011). Seasonal variations in gross biochemical composition, percent edibility, and condition index of the clam *Ruditapes decussatus* cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *Journal of Shellfish Research*, 30(1). <https://doi.org/10.2983/035.030.0104>
- Anjos, C., Baptista, T., Joaquim, S., Mendes, S., Matias, A. M., Moura, P., Simões, T., & Matias, D. (2017). Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquaculture Research*, 48(7), 3859–3878. <https://doi.org/10.1111/are.13213>
- Arafa, S., Sadok, S., & Abed, A. El. (2007). Assessment of magnesium chloride as an anaesthetic for adult sea urchins (*Paracentrotus lividus*): Incidence on mortality and spawning. *Aquaculture Research*, 38(15). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01842.x>
- Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Rodríguez-Jaramillo, M. D. C., García-Latorre, E. A., & Vazquez-Boucard, C. (2009). Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquaculture Research*, 40(6), 644–655. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2008.02138.X>

-
- Argüello-Guevara, W., Loor, A., & Sonnenholzner, S. (2013). Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825). *Journal of Shellfish Research*, 32(3). <https://doi.org/10.2983/035.032.0306>
- Asif, M. (1979). Hermaphroditism and sex reversal in the four common oviparous species of oysters from the coast of Karachi. *Hydrobiologia*, 66(1). <https://doi.org/10.1007/BF00019139>
- Azizan, A., Alfaro, A. C., Young, T., & Venter, L. (2021). Beyond relaxed: magnesium chloride anaesthesia alters the circulatory metabolome of a marine mollusc (*Perna canaliculus*). *Metabolomics*, 17(8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11306-021-01820-4/FIGURES/2>
- Barber, B. J., & Blake, N. J. (1981). Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 52(2–3). [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(81\)90031-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(81)90031-9)
- Barber, b. J., & Blake, n. J. (1985). Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (say), as indicated by ¹⁴c incorporation. *The biological bulletin*, 168(1). <https://doi.org/10.2307/1541172>
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., & Travers, M. A. (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 2–10. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.07.011>
- Bayne, B. L. (1976). Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In *Estuarine Processes*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-751801-5.50043-5>
- Bebianno, M. J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia-Barelli, M., & Rom eo, M. (2004). Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: A potential bioindicator species. In *Biomarkers* (Vol. 9, Issues 4–5, pp. 305–330). <https://doi.org/10.1080/13547500400017820>
- Befus, K. M., Cardenas, M. B., Erler, D. V., Santos, I. R., & Eyre, B. D. (2013). Heat transport dynamics at a sandy intertidal zone. *Water Resources Research*, 49(6). <https://doi.org/10.1002/wrcr.20325>
- Beninger, P. G., & Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 79(1), 19–37. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90028-5)
- Beukema, J. J., & Bruin, W. de. (1979). Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 37(1), 19–30. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(79\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(79)90023-6)
- Beukema, J. J., & De Bruin, W. (1977). Seasonal changes in dry weight and chemical composition of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* in the Dutch Wadden Sea. In *Netherlands Journal of Sea Research* (Vol. 11, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(77\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0077-7579(77)90020-5)
- Binias, C., Tu Do, V., Jude-Lemeilleur, F., Plus, M., Froidefond, J. M., & De Montaudouin, X. (2014). Environmental factors contributing to the development of brown muscle disease and perkinsosis in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) and trematodiasis in cockles (*Cerastoderma edule*) of Arcachon Bay. *Marine Ecology*, 35(SUPPL1), 67–77. <https://doi.org/10.1111/MAEC.12087>

-
- Boutet, I., Moraga, D., Marinovic, L., Obreque, J., & Chavez-Crooker, P. (2008). Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: Influence of maturation stage and sex on mRNA expression. *Gene*, *407*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.005>
- Breton, S., Capt, C., Guerra, D., & Stewart, D. (2018). Sex-Determining Mechanisms in Bivalves. In *Transitions Between Sexual Systems*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94139-4_6
- Butt, D., O'Connor, S. J., Kuchel, R., O'Connor, W. A., & Raftos, D. A. (2008). Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*, *275*(1–4). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.004>
- Camacho, A. P., Delgado, M., Fernández-Reiriz, M. J., & Labarta, U. (2003). Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Ecology Progress Series*, *258*. <https://doi.org/10.3354/meps258133>
- Capt, C., Renaut, S., Stewart, D. T., Johnson, N. A., & Breton, S. (2019). Putative Mitochondrial Sex Determination in the Bivalvia: Insights From a Hybrid Transcriptome Assembly in Freshwater Mussels. *Frontiers in Genetics*, *10*, 462247. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00840/BIBTEX>
- Casas, S. M., & Villalba, A. (2012). Study of perkinsosis in the grooved carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). III. The effects of *Perkinsus olseni* infection on clam reproduction. *Aquaculture*, *356–357*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.038>
- Castro, N. F., & de Vido de Mattio, N. (1987). Biochemical composition, condition index, and energy value of *Ostrea peulchana* (D'Orbigny): relationships with the reproductive cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *108*(2). [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(87\)80017-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(87)80017-5)
- Castro-Claros, J. D., Checa, A., Lucena, C., Pearson, J. R., & Salas, C. (2021). Shell-adductor muscle attachment and Ca²⁺ transport in the bivalves *Ostrea stentina* and *Anomia ephippium*. *Acta Biomaterialia*, *120*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.053>
- Cerviño Otero, A. (2012). Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/3645>
- Cheng, P., Zhou, C., Chu, R., Chang, T., Xu, J., Ruan, R., Chen, P., & Yan, X. (2020). Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. In *Algal Research* (Vol. 51). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102076>
- Chícharo, L., & Chícharo, M. A. (2001). Effects of environmental conditions on planktonic abundances, benthic recruitment and growth rates of the bivalve mollusc *Ruditapes decussatus* in a Portuguese coastal lagoon. *Fisheries Research*, *53*(3). [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(00\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00290-3)
- Colas, P., & Dubé, F. (1998). Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *9*(5). <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0248>
- Compton, T. J., Bodnar, W., Koolhaas, A., Dekinga, A., Holthuijsen, S., ten Horn, J., McSweeney, N., van Gils, J. A., & Piersma, T. (2016). Burrowing behavior of a deposit feeding bivalve predicts change in intertidal ecosystem state. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *4*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00019>

-
- Connell, J. H. (1972). Community Interactions on Marine Rocky Intertidal Shores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 3(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.es.03.110172.001125>
- Cordeiro, N. I. S., Andrade, J. T. M., Montresor, L. C., Luz, D. M. R., Martinez, C. B., Darrigran, G., Pinheiro, J., & Vidigal, T. H. D. A. (2016). Effect of starvation and subsequent feeding on glycogen concentration, behavior and mortality in the golden mussel *Limnoperna Fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Limnology*, 75(3), 618–625. <https://doi.org/10.4081/JLIMNOL.2016.1465>
- Coutteau, P., & Sorgeloos, P. (1992). The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. In *J.Shellfish Research* (Vol. 11).
- Acosta-Salmón, H., & Southgate, P. C. (2004). Short communication: Use of a biopsy technique to obtain gonad tissue from the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.).
- Cubero-Leon, E., Ciocan, C. M., Hill, E. M., Osada, M., Kishida, M., Itoh, N., Kondo, R., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2010). Estrogens disrupt serotonin receptor and cyclooxygenase mRNA expression in the gonads of mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, 98(2). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.007>
- Culloty, S. C., & Mulcahy, M. F. (1992). An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture*, 107(2–3). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90073-T](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90073-T)
- da Costa, F. (2012). Clam fisheries and aquaculture.
- da Costa, F., Aranda-Burgos, J., Cerviño-Otero, A., Fernández-Pardo, A., & Louzán, A. (2012). Clam hatchery and nurse culture. *Clam Fisheries and Aquaculture*, 217–253.
- da Costa, F., Cerviño-Otero, A., Iglesias, Ó., Cruz, A., & Guévelou, E. (2020). Hatchery culture of European clam species (family Veneridae). In *Aquaculture International* (Vol. 28, Issue 4, pp. 1675–1708). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00552-x>
- da Costa, F., Darriba, S., Martínez-Patiño, D., & Guerra, A. (2011). Culture possibilities of the razor clam *Ensis arcuatus* (Pharidae: Bivalvia). *Aquaculture Research*, 42(10). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02747.x>
- Dare, P. J., & Edwards, D. B. (1975). Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conwy Estuary, North Wales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 18(2). [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90066-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90066-0)
- De Montaudouin, X., Paul-Pont, I., Lambert, C., Gonzalez, P., Raymond, N., Jude, F., Legeay, A., Baudrimont, M., Dang, C., Le Grand, F., Le Goïc, N., Bourasseau, L., & Paillard, C. (2010). *Bivalve population health: Multistress to identify hot spots*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.011>
- Delgado, M., & Camacho, A. P. (2005). Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Scientia Marina*, 69(1). <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n187>
- Delgado, M., Oceanogr, A. C.-Bol. Inst. Esp., & 2002, undefined. (2002). Efectos de la ración de alimento en el desarrollo gonadal de la almeja *Ruditapes decussatus* (L., 1758). *Vliz.Be*, 18(4), 293–300. <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/358692.pdf>

-
- Delgado, M., & Pérez Camacho, A. (2002). Hermaphroditism in *Ruditapes decussatus* (L.) (Bivalvia) from the Galician coast (Spain). *Scientia Marina*, 66(2). <https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66n2183>
- Delgado, M., & Pérez Camacho, A. (2007). Influence of temperature on gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with special reference to ingested food and energy balance. *Aquaculture*, 264(1–4). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.009>
- Delgado, M., Pérez Camacho, A., Labarta, U., & Fernández-Reiriz, M. J. (2004). The role of lipids in the gonadal development of the clam *Ruditapes decussatus* (L.). *Aquaculture*, 241(1–4), 395–411. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.07.018>
- Delgado, M., Pérez-Larruscain, J., & Gairín, J. I. (2016). Broodstock conditioning and gonadal development of the smooth clam *Callista chione* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) on the Catalan coast (NE Spain). In *aadray acta adriat* (Vol. 57, Issue 1).
- Dellali, M. (2001). Utilisation d'indicateurs microbiologiques et biochimiques chez *Ruditapes decussatus* et *Mytilus galloprovincialis* dans la biosurveillance de la lagune de Bizerte : Validation de certains biomarqueurs. <https://theses.hal.science/tel-03462504>
- Devauchelle, n. (1990). Sviluppo sessuale e maturità di *Tapes philippinarum* sexual development and maturity of *tapes philippinarum*.
- Dittman, d. E., Ford, s. E., & Padillai, d. K. (2001). Effects of perkinsus marinus on reproduction and condition of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Depend on timing. *Journal of shellfish research*, 20(3), 1025–1034.
- Domínguez, L., Villalba, A., & Fuentes, J. (2010). Effects of photoperiod and the duration of conditioning on gametogenesis and spawning of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Aquaculture Research*, 41(11). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02601.x>
- Domínguez, R., Olabarria, C., Woodin, S. A., Wethey, D. S., Peteiro, L. G., Macho, G., & Vázquez, E. (2021). Contrasting responsiveness of four ecologically and economically important bivalves to simulated heat waves. *Marine Environmental Research*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105229>
- Dubert, J., Da Costa, F., Aranda-Burgos, J. A., Martínez-Patiño, D., Prado, S., & Barja, J. L. (2016). Beneficial effects of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) depuration during short periods of conditioning in shellfish hatchery: Role of the temperature and phytoplankton on reduction and diversity of vibrios. *Aquaculture*, 459. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.030>
- Estêvão, J., Osorio, H., Costas, B., Cruz, A., & Fernández-Boo, S. (2023). Search for new biomarkers of tolerance to *Perkinsus olseni* parasite infection in *Ruditapes decussatus* clams. *Fish & Shellfish Immunology*, 134, 108566. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2023.108566>
- FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Fernández-Boo, S., Duarte, C., Guévelou, E., Sousa, J., Freitas, R., Joaquim, S., Costas, B., Magalhães, L., Matias, D., & Cruz, A. (2023). Effect of the alveolate parasite *Perkinsus olseni* infection on sexual maturation and spawning efficiency of the clam *Ruditapes decussatus*. *Parasitology*, 150(4). <https://doi.org/10.1017/S0031182023000082>

-
- Folch, J., Lees, m., & Sloane Stanley, g. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Foster, M. S. (1988). Causes of spatial and temporal patterns in rocky intertidal communities of central and northern California. *Memoirs of the California Academy of Sciences*, 9.
- Gabbott, P.A. (1975). Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis, in: Barnes, H.B. (Ed.) Ninth European Marine Biology Symposium. pp. 191-211
- Gabbott, P. A. (1983). Developmental and Seasonal Metabolic Activities in Marine Molluscs. In *The Mollusca*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-751402-4.50012-1>
- Guévelou, E., Huvet, A., Sussarellu, R., Milan, M., Guo, X., Li, L., Zhang, G., Quillien, V., Daniel, J. Y., Quéré, C., Boudry, P., & Corporeau, C. (2013). Regulation of a truncated isoform of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* (Vol. 183, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0743-6>
- Guo, X., DeBrosse, G. A., & Allen, S. K. (1996). All-triploid pacific oysters (*Crassostrea gigas* thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142(3–4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01243-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01243-5)
- Hassan, M. M., Qin, J. G., & Li, X. (2018). Gametogenesis, sex ratio and energy metabolism in *Ostrea angasi*: implications for the reproductive strategy of spermcasting marine bivalves. *Journal of Molluscan Studies*, 84(1), 38–45. <https://doi.org/10.1093/MOLLUS/EYX041>
- Hazelton, P. D., Du, B., Haddad, S. P., Fritts, A. K., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., & Bringolf, R. B. (2014). Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 151, 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2013.12.019>
- Heasman, M. P., O'Connor, W. A., & Frazer, A. W. J. (1995). Induction of anaesthesia in the commercial scallop, *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*, 131(3–4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00360-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00360-Z)
- Helm, M. M., Bourne, N., & Lovatelli, A. (2004). Hatchery culture of bivalves. A practical manual. In *FAO Fisheries Technical Paper* (Vol. 471).
- Helm, M. M., Holland, D. L., & Stephenson, R. R. (1973). The Effect Of Supplementary Algal Feeding Of A Hatchery Breeding Stock Of *Ostrea Edulis* L. On Larval Vigour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(3). <https://doi.org/10.1017/S0025315400058872>
- Hintz, M., Gratz, K., Becker, B., Vadopalas, B., & Roberts, S. (2017). A Nonlethal Anesthesia Protocol for Accessing the Mantle Cavity of Olympia Oysters in the Laboratory or Field. *https://Doi.Org/10.2983/035.036.0207*, 36(2), 353–357. <https://doi.org/10.2983/035.036.0207>
- Horn, K. M., Fournet, M. E. H., Liautaud, K. A., Morton, L. N., Cyr, A. M., Handley, A. L., Dotterweich, M. M., Anderson, K. N., Zippay, M. L., & Hardy, K. M. (2021). Effects of intertidal position on metabolism and behavior in the acorn barnacle, *Balanus glandula*. *Integrative Organismal Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/iob/obab010>

-
- Huo, Z., Li, Y., Golam Rbbani, M., Wu, Q., & Yan, X. (2018). Temperature challenge on larvae and juveniles of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture Research*, 49(4), 1727–1731. <https://doi.org/10.1111/are.13600>
- Iglesias, D., Villalba, A., Mariño, C., No, E., & Carballal, M. J. (2023). Long-term survey discloses a shift in the dynamics pattern of an emerging disease of cockles *Cerastoderma edule*, marteiliosis, and raises hypotheses to explain it. *Journal of Invertebrate Pathology*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108021>
- INE. (n.d.). *EP_2021a (5)*. Retrieved October 26, 2022, from <https://www.ine.pt/xurl/pub/36828280>
- IPMA. (2019). *Lista de Espécies*. https://www.ipma.pt/pt/bivalves/docs/files/Lista_de_especies_em_29_05_2019.pdf
- Jacquet, J., Sebo, J., & Elder, M. (2017). Seafood in the Future: Bivalves Are Better. *Solutions*, 8(I).
- Joaquim, S., Matias, A. M., Moura, P., Trindade, B., Gaspar, M. B., Baptista, T., & Matias, D. (2023). Dynamics of the Reproductive Cycle of Two *Cerastoderma edule* Populations (Óbidos and Ria Formosa Lagoons) along with Their Nutrient Storage and Utilization Strategy. *Fishes*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/fishes8070353>
- Joaquim, S., Matias, D., Matias, A. M., Moura, P., Arnold, W. S., Chícharo, L., & Gaspar, M. B. (2011). Reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis enegalensis* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) from Ria de Aveiro (Northwestern coast of Portugal). *Scientia Marina*, 75(2). <https://doi.org/10.3989/scimar.2011.75n2217>
- Kaparapu, J. (2018). Application of Microalgae in Aquaculture. In *Phykos* (Vol. 48, Issue 1). <https://www.researchgate.net/publication/342096192>
- Kapranova, L. L., Nekhoroshev, M. V., Malakhova, L. V., Ryabushko, V. I., Kapranov, S. V., & Kuznetsova, T. V. (2020). Fatty Acid Composition of Gonads and Gametes in the Black Sea Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lam. at Different Stages of Sexual Maturation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2019 55:6, 55(6), 448–455. <https://doi.org/10.1134/S0022093019060024>
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., & Le Pennec, M. (2000). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190(1–2), 183–199. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00392-6)
- Lee, H. M., Kim, H. J., Park, K. Il, & Choi, K. S. (2020). Enhanced growth, gonad maturation, and low-level parasite infection in juvenile Manila clam *Ruditapes philippinarum* cultured in subtidal cages on the south coast of Korea. *Aquaculture*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735410>
- Lellis, W. A., Plerhoples, T. A., & Lellis, K. A. (2000). Evaluation of potential anesthetics for the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Journal of Shellfish Research*, 19(2).
- Lewbart, G. A., & Mosley, C. (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Invertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 59–70. <https://doi.org/10.1053/J.JEPM.2011.11.007>
- Liu, W., Li, Q., Yuan, Y., & Zhang, S. (2008). Seasonal variations in reproductive activity and biochemical composition of the cockle *Fulvia mutica* (Reeve) from the Eastern coast of China. *Journal of Shellfish Research*, 27(2). [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[405:SVIRAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[405:SVIRAA]2.0.CO;2)

-
- Loh, J.-Y., Soo, M. O.-Y., Gunasekaran, B., Cheras, K., Lumpur, M., & Andin, V. C. (2022). *Advances in Aquaculture*.
- Lopes, R. G. P. S., Rego, A. P., de Jesus Gomes, S. M., Ramos, T., Antonio, Í. G., & Coimbra, M. R. M. (2023). Effects of salinity on pre and post-fertilization developmental events in the clam *Anomalocardia flexuosa* (Linnaeus, 1767). *Animal Reproduction*, 20(2). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0005>
- Lubet. (1959). Recherche sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés. In *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* (Vol. 23, Issue 4).
- Mac Arthur, R. H., & Wilson, E. O. (1967). The theory of island biogeography. Monographs in Population Biology. In *The theory of island biogeography. Monographs in Population Biology*.
- Machado, D., Baptista, T., Joaquim, S., Anjos, C., Mendes, S., Matias, A. M., & Matias, D. (2018). Reproductive cycle of the european clam *Ruditapes decussatus* from Óbidos lagoon, Leiria, Portugal. *Invertebrate Reproduction and Development*, 62(4). <https://doi.org/10.1080/07924259.2018.1472671>
- Macho, G., Woodin, S. A., Wethey, D. S., & Vázquez, E. (2016). Impacts of Sublethal and Lethal High Temperatures on Clams Exploited in European Fisheries. *Journal of Shellfish Research*, 35(2). <https://doi.org/10.2983/035.035.0215>
- Magaña Carrasco, A., Brito Manzano, N. P., Gómez Vázquez, A., & Cruz-Hernández, A. (2018). Effects of temperature and salinity on inducing spawning in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) under laboratory conditions. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(14). <https://doi.org/10.19136/era.a5n14.1236>
- Mallet, A. L., & Carver, C. E. (2009). The effect of photoperiod on the reproductive development of the northern bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 374(2). <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.04.015>
- Maneiro, V., Santos, Y., Pazos, A. J., Silva, A., Torres-Corral, Y., Sánchez, J. L., & Pérez-Parallé, M. L. (2020a). Effects of food ration, water flow rate and bacteriological levels of broodstock on the reproductive conditioning of the European flat oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758). *Aquaculture Reports*, 18, 100412. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2020.100412>
- Maneiro, V., Santos, Y., Pazos, A. J., Silva, A., Torres-Corral, Y., Sánchez, J. L., & Pérez-Parallé, M. L. (2020b). Effects of food ration, water flow rate and bacteriological levels of broodstock on the reproductive conditioning of the European flat oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758). *Aquaculture Reports*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100412>
- Martínez, D., Rodríguez, E., & Arnaíz R. (1993). *Cultivo de Nuevas Especies de Moluscos Bivalvos de Interés en Hatcheries*,.
- Martínez-Pita I, Ruiz-Azcona P, Palanco I, & Moreno O. (2008). Análisis de sistemas de estabulación para *Callista chione* (L., 1758). In: *Abstracts of the IV Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico, Cartaya. (In Spanish)*.
- Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C., Prieto, E., & Moreno, O. (2011). The effect of diet on gonadal development of the smooth venus clam *Callista chione* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Shellfish Research*, 30(2), 295–301. <https://doi.org/10.2983/035.030.0215>

-
- Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C., Ruíz-Jarabo, I., Herrera, M., & Mancera, J. M. (2012). Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture*, 358–359, 274–283. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.06.003>
- Matias, D., Joaquim, S., Leitão, A., & Massapina, C. (2009). Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture International*, 17(3). <https://doi.org/10.1007/s10499-008-9197-3>
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A. M., & Leitão, A. (2016). Reproductive effort of the European clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): Influence of different diets and temperatures. *Invertebrate Reproduction and Development*, 60(1). <https://doi.org/10.1080/07924259.2015.1126537>
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A. M., Moura, P., de Sousa, J. T., Sobral, P., & Leitão, A. (2013). The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture*, 406–407, 52–61. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.04.030>
- Matias, D., Sandra, A. E., Ae, J., Ae, A. L., Massapina, C., Matias, D., Joaquim, Á. S., Leitão, Á. A., Massapina, Á. C., & Leitão, A. (2009). Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). 17, 257–271. <https://doi.org/10.1007/s10499-008-9197-3>
- Melo, E. M. C., Gomes, C. H. A. de M., da Silva, F. C., Sühnel, S., & de Melo, C. M. R. (2015). Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Boletim Do Instituto de Pesca*, 41(4).
- Messenger, J. B., Nixon, M., & Ryan, K. P. (1985). Magnesium Chloride as an anaesthetic for cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 82(1). [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90230-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90230-0)
- Mili, S., Ennouri, R., Fatnassi, M., Bejaoui, S., & Bejaoui, D. (2023). Fisheries activity in the Bizerta lagoon (South Mediterranean Sea) from the 18th to the 21st century. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.15406/jamb.2023.12.00355>
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., & Divanach, P. (2003). *Uses of Microalgae in Aquaculture*.
- Namba, K., Kobayashi, M., Aida, S., Uematsu, K., Yoshida, M., Kondo, Y., & Miyata, Y. (1995). Persistent Relaxation of the Adductor Muscle of Oyster *Crassostrea gigas* Induced by Magnesium Ion. *Fisheries Science*, 61(2). <https://doi.org/10.2331/fishsci.61.241>
- Narvarte, M., González, R., & Filippo, P. (2007). Artisanal mollusk fisheries in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina): An appraisal of the factors contributing to unsustainability. *Fisheries Research*, 87(1). <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.06.012>
- Nascimento-Schulze, J. C., Bean, T. P., Houston, R. D., Santos, E. M., Sanders, M. B., Lewis, C., & Ellis, R. P. (2021). Optimizing hatchery practices for genetic improvement of marine bivalves. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/raq.12568>

-
- Norton, J. H., Dashorst, M., Lansky, T. M., & Mayer, R. J. (1996). An evaluation of some relaxants for use with pearl oysters. *Aquaculture*, 144(1–3). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01289-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01289-6)
- Ojea, J., Pazos, A. J., Martínez, D., Novoa, S., García-Martínez, P., Sánchez, J. L., & Abad, M. (2008). Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research*, 27(5), 1093–1100. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1093>
- Ojea, J., Pazos, A. J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J. L., & Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, 238(1–4), 451–468. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2004.05.022>
- Oostlander, P. C., van Houcke, J., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture*, 525. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735310>
- Paine, R. T. (1971). *The measurement and application of the 4021 calorie to ecological problems*. www.annualreviews.org
- Park, K. Il, Figueras, A., & Choi, K. S. (2006). Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture*, 251(2–4). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.003>
- Peruzza, L., Tucci, C. F., Frizzo, R., Riello, T., Quagliariello, A., Martino, M. E., Manuzzi, A., Dalla Rovere, G., Bonsembiante, F., Gelain, M. E., Smits, M., Borgheresi, O., Camerani, F., Panin, M., Venier, P., Mammi, S., Hauton, C., Patarnello, T., Milan, M., & Bargelloni, L. (2023). Impaired reproduction, energy reserves and dysbiosis: The overlooked consequences of heatwaves in a bivalve mollusc. *Marine Pollution Bulletin*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115192>
- Pronker, A. E., Nevejan, N. M., Peene, F., Geijssen, P., & Sorgeloos, P. (2008). Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different microalgae mixtures on broodstock performance. *Aquaculture International*, 16(4). <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9143-9>
- Qin, Y., Xiao, S., Ma, H., Mo, R., Zhou, Z., Wu, X., Zhang, Y., & Yu, Z. (2018). Effects of salinity and temperature on the timing of germinal vesicle breakdown and polar body release in diploid and triploid Hong Kong oysters, *Crassostrea hongkongensis*, in relation to tetraploid induction. *Aquaculture Research*, 49(11). <https://doi.org/10.1111/are.13833>
- Rato, A., Joaquim, S., Matias, A. M., Roque, C., Marques, A., & Matias, D. (2022). The Impact of Climate Change on Bivalve Farming: Combined Effect of Temperature and Salinity on Survival and Feeding Behavior of Clams *Ruditapes decussatus*. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.932310>
- Rato, A., Joaquim, S., Tavares, T. G., Martins, Z. E., Guedes, A. C., Pereira, L. F., Machado, J., Matias, A. M., Gonçalves, J. F. M., Vaz-Pires, P., Magnoni, L. J., Ozório, R. O. A., & Matias, D. (2018). Viability of dietary substitution of live microalgae with dry *Ulva rigida* in broodstock conditioning of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*, 7(9). <https://doi.org/10.1242/bio.035923>

-
- Ray SM. (1966). A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 54, 55–69.
- Rocha, C. P., Cabral, H. N., Marques, J. C., & Gonçalves, A. M. M. (2022). A Global Overview of Aquaculture Food Production with a Focus on the Activity's Development in Transitional Systems—The Case Study of a South European Country (Portugal). In *Journal of Marine Science and Engineering* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/jmse10030417>
- Ruano, F., Batista, F. M., & Arcangeli, G. (2015). Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>
- Ruiz Azcona, M. P. (2013). Guía de cultivo de almeja en criadero.
- Samain, J. F., & McCombie, H. (2008). Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. *Versailles: Ed Quae*.
- Shakir, F. K., Audilet, D., Drake, A. J., & Shakir, K. M. M. (1994). A rapid protein determination by modification of the lowry procedure. *Analytical Biochemistry*, 216(1). <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1031>
- Sim-Smith, C. J., & Jeffs, A. G. (2011). A Novel Method for Determining the Nutritional Condition of Seed Green-Lipped Mussels, *Perna canaliculus*. <https://doi.org/10.2983/035.030.0102>, 30(1), 7–11. <https://doi.org/10.2983/035.030.0102>
- Solan, M., & Whiteley, N. (2016). Stressors in the Marine Environment. In *Stressors in the Marine Environment*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198718826.001.0001>
- Soon, T. K., & Zheng, H. (2020). Climate Change and Bivalve Mass Mortality in Temperate Regions. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 251, pp. 109–129). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/398_2019_31
- Soudant, P., E. Chu, F. L., & Volety, A. (2013). Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>
- Sousa, J. (2014). Study of broodstock conditioning and determination of markers of gamete quality in the european clam *Ruditapes decussatus*. <http://www.novapdf.com>
- Souza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., & Mancera, J. M. (2019). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. *Frontiers in Physiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.0078>
- Stearns, S. C. (1977). The Evolution of Life History Traits: A Critique of the Theory and a Review of the Data. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.es.08.110177.001045>
- Sugiura, y. (1962). Electrical induction of spawning in two marine invertebrates (*Urechis unicinctus*, hermaphroditic *Mytilus edulis*). *The Biological Bulletin*, 123(1). <https://doi.org/10.2307/1539515>

-
- Suquet, M., Kermoisan, G. De, Araya, R. G., Queau, I., Lebrun, L., Souchu, P. Le, & Mingant, C. (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 22(1), 29–34. <https://doi.org/10.1051/alr/2009006>
- Tan, K., Zhang, H., & Zheng, H. (2020). Selective breeding of edible bivalves and its implication of global climate change. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 12, Issue 4, pp. 2559–2572). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12458>
- The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. (2022). In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Tosti, E., & Boni, R. (2004). Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Human Reproduction Update*, 10(1), 53–65. doi:10.1093/humupd/dmh006
- Tosti, E. (2006). Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-26>
- Travers, M. A., Boettcher Miller, K., Roque, A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>
- Utting, S. D., & Millican, P. F. (1997a). Aquaculture Techniques for the hatchery conditioning broodstocks and the subsequent effect quality and larval viability of bivalve on egg. In *Aquaculture* (Vol. 155).
- Utting, S. D., & Millican, P. F. (1997b). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155(1–4), 45–54. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00108-7)
- Vázquez, E., Woodin, S. A., Wethey, D. S., Peteiro, L. G., & Olabarria, C. (2021). Reproduction Under Stress: Acute Effect of Low Salinities and Heat Waves on Reproductive Cycle of Four Ecologically and Commercially Important Bivalves. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.685282>
- Vélez-Henao, J. A., Weinland, F., & Reintjes, N. (n.d.). Life cycle assessment of aquaculture bivalve shellfish production — a critical review of methodological trends | Enhanced Reader.
- Viles, F. J., & Silverman, L. (1949). Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Analytical Chemistry*, 21(8). <https://doi.org/10.1021/ac60032a019>
- Villalba, A., Casas, S. M., López, C., & Carballal, M. J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(3), 257–267. <https://doi.org/10.3354/DAO065257>
- Villalba, A., Gestal, C., Casas, S. M., & Figueras, A. (2011). Perkinsosis en moluscos. In *Enfermedades de moluscos bilvalvos de interés en acuicultura*.
- Villalba, A., Iglesias, D., Ramilo, A., Darriba, S., Parada, J. M., No, E., Abollo, E., Molares, J., & Carballal, M. J. (2014). Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the ría de arousa (Galicia, nw Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochilli*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109(1). <https://doi.org/10.3354/dao02723>

-
- Villalba, A., Reece, K. S., Ordás, M. C., Casas, S. M., & Figueras, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17(4), 411–432. <https://doi.org/10.1051/ALR:2004050>
- Vodáková, B., & Douda, K. (2019). Variation in Glycogen Distribution among Freshwater Bivalve Tissues: Simplified Protocol and Implications. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 107–111. <https://doi.org/10.1002/AAH.10057>
- Walne, P. (1979). Culture of Bivalve Molluscs: 50 years experience at Conwy. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32(12). <https://doi.org/10.1139/f75-311>
- Walne, P. R., & Mann, R. (1975). Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In: Barnes, H. (Ed.), *Proc. 9th EMBS Aberdeen*.
- Wijsman, J. W. M., Troost, K., Fang, J., & Roncarati, A. (2019). *Goods and Services of Marine Bivalves*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_2
- Willer, D. F., & Aldridge, D. C. (2019). Microencapsulated diets to improve bivalve shellfish aquaculture for global food security. In *Global Food Security* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.04.007>
- Xu, Q., & Yang, H. (2007). Food sources of three bivalves living in two habitats of Jiaozhou Bay (Qingdao, China): Indicated by lipid biomarkers and stable isotope analysis. *Journal of Shellfish Research*, 26(2). [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[561:FSOTBL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[561:FSOTBL]2.0.CO;2)
- Ye, J., Zeng, J., Zheng, H., Zhang, C., Zhang, H., & Zheng, H. (2024). Genome-wide identification of STATs and analysis of their role in sex determination in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 270, 110933. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2023.110933>
- Zhao, Q., Huang, H., Zhu, Y., Cao, M., Zhao, L., Hong, X., & Chu, J. (2022). Analysing ecological carrying capacity of bivalve aquaculture within the Yellow River Estuary ecoregion through mass-balance modelling. *Aquaculture Environment Interactions*, 14. <https://doi.org/10.3354/aei00430>

Anexos

Abstract Title: IS SAND IMPROVING *Ruditapes decussatus* BROODSTOCK CONDITIONING?

Authors: *Telma Nunes*², *Carolina Tchobanov*¹, *Damiana Pires*¹, *Andreia Cruz*³, *Eric Guévelou*³, *Teresa Baptista*^{1,2}

1. MARE—Marine and Environmental Sciences Centre, Polytechnic of Leiria, Edifício CETEMARES, Av. Porto de Pesca, 2520-620 Peniche, Portugal;
2. School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic of Leiria, Campus 4—Rua do Conhecimento no 4, 2520-641 Peniche, Portugal
3. Oceano Fresco, Porto de Nazaré, 2450-075 Nazaré, Portugal

Abstract:

In Europe, in recent years, capture production of clams has decreased due to numerous factors such as overfishing, abiotic stress, diseases, and failure in recruitment. Seed production in hatcheries has become essential to ensure the sustainability of clams production. Thus, artificial broodstock conditioning allows hatcheries to extend their production season, reducing their reliance on the period of the year when wild beds become naturally mature. Also aims to achieve maximum fecundity whilst maintaining the quality and viability of the gametes. Most clam species have been demonstrated artificially conditioned without the need for substrate. However, in nature, clams tend to live buried in the substrate. This study aimed to evaluate the impact of the sand substrate on clams under artificial conditioning. Adult specimens of *R. decussatus* (39.2 mm ± 3.50 mm) were conditioned with and without sand at 19 ± 1°C in flow-through systems and fed with a diet of 3% meat dry weight per dry weight of algae. During conditioning, samples were collected at the beginning (T0) at after 41 days (T1) and after 73 days (T2 - end of the conditioning). To provide information regarding gonad development, condition index, histological analysis, and biochemical composition (glycogen, protein, and lipids) were performed at each sampling time. Results showed that the use of sand as a substrate didn't have any effect on gonadal maturity evolution. Mortality was 56% for the sandless treatment and 59% for the sand treatment. Regarding biochemical composition parameters, we observed an increase during the conditioning period. Between the conditions (sand/no sand) significant differences (*p*-value < 0,05) were observed in biochemical composition in the end of the conditioning period for the without sand. This work constitutes an important step in the improvement of broodstock conditioning in the hatchery.

Abstract Title: ANESTHESIA AND GONAD SAMPLING IN *RUDITAPES DECUSSATUS* AND *VENERUPIS CORRUGATA*

Authors: T. Nunes², C. Tchobanov,¹ D. Pires¹, A. Cruz³, E. Guévelou³, T. Baptista^{1,2}

1. MARE—Marine and Environmental Sciences Centre, Polytechnic of Leiria, Edifício CETEMARES, Av. Porto de Pesca, 2520-620 Peniche, Portugal;
2. School of Tourism and Maritime Technology, Polytechnic of Leiria, Campus 4—Rua do Conhecimento no 4, 2520-641 Peniche, Portugal
3. Oceano Fresco, Porto de Nazaré, 2450-075 Nazaré, Portugal

Introduction

In most bivalve molluscs, it is difficult to determine sex and reproductive stage non-lethally. Bivalves tightly close the valves inhibiting compression and dilation without removing the shell and sacrificing the individual. Some techniques have been developed that allow observation in a non-invasive way, such as the use of magnetic resonance imaging, which allows the visualization of soft tissues, but these techniques are very expensive, difficult to implement in the field and do not allow for the collection of samples. In bivalve aquaculture, sexual maturation must be monitored and understood to determine the best time to induce spawning events for seed production. Anesthesia is widely used in aquaculture to facilitate tissue biopsies and for gametogenesis studies (Suquet et al., 2009). In bivalves, tissue sampling often relies on lethal methods, as the shell must be removed to obtain tissue samples. Consequently, it is not possible to carry out successive samplings on a single individual. The main objective of this study is to develop an effective method to anesthetize adults of *Ruditapes decussatus* and *Venerupis corrugata* that allows sex determination.

Material and Methods

Experiment 1 determined the time required to anesthetize 60 individuals of each species were tested in this assay, in which 30 individuals of *R. decussatus* and another 30 of *V. corrugata* were exposed to the anesthetic Magnesium Chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; LabChem) with a concentration of (50g/L) and a control group for each species that were not exposed to the anesthetic. Individuals were placed in 2-litre containers in 3 replicate groups of 10 clams. Every hour, the number of anesthetized clams was evaluated to determine the percentage of anesthetized clams. Experiment 2, determining the ideal dose Based on the first test, 3 different doses of anaesthetic were chosen for each species, in this second test, 120 individuals of each species were needed to test 3 different concentrations, for *R. decussatus* (50g/L, 55g/L and 60 g/L) and for *V. corrugata* (15g/L, 25g/L and 50g/L). The experimental conditions were the same as in the first test. Additionally, individuals who anesthetized more quickly were submitted to a biopsy for gonad sampling for sex determination. Survival was monitored daily for 1 week after anesthetic exposure.

Results

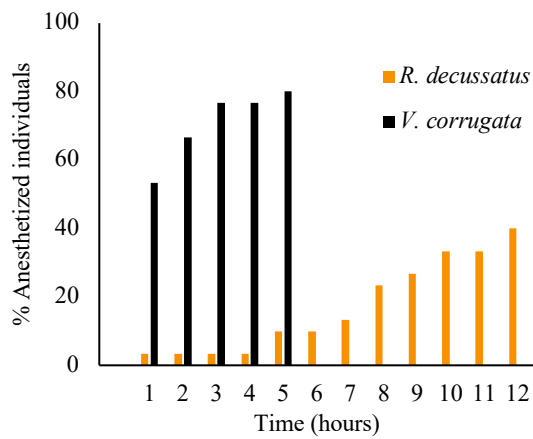


Figure 24- Effect of MgCl₂ anesthetization in concentration (50 g/L) on clams *Ruditapes decussatus* and *Venerupis corrugata* per hour.

References

- Suquet, M., Kermoyan, G. De, Araya, R. G., Queau, I., Lebrun, L., Souchu, P. Le, & Mingant, C. (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 22(1), 29–34. <https://doi.org/10.1051/alr/2009006>
