UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Reprodução e cultivo de bivalves límnicos ameaçados
de extinção: uma estratégia para a conservação do
gênero *Diplodon* (Spix, 1827) (Mollusca, Hyriidae)**

Ricardo Cunha Lima

Orientador: Prof. Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar

*Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em
Ciências, área: Biologia Comparada.*

Ribeirão Preto - SP

2010

Lima, Ricardo Cunha

Reprodução e cultivo de bivalves límnicos ameaçados de extinção: uma estratégia para a conservação do gênero *Diplodon* (Spix, 1827) (Mollusca, Hyriidae) / Ricardo Cunha Lima - Ribeirão Preto, 2010.

xiv, 138 p.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Avelar, Wagner Eustáquio Paiva

1. Hyriidae, 2. Reprodução, 3. Conservação
4. Biodiversidade, 5. Aquicultura

*“Ao falar de evolução,
Hoje, nunca está bom,
Amanhã, sempre será melhor”*

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar por sua insistência, paciência e colaboração.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, mesmo às vezes sem compreender o que faço.

A minha esposa, Cynthia, por seu apoio incondicional e por manter-me atento ao mundo real.

Às minhas meninas, Alicia, Bruna e Giovana, se não fosse por elas eu provavelmente terminaria a tese na metade do tempo, porém não seria um trabalho completo.

À Profa. Dra. Maria Hela Goldman, por ceder seu espaço físico e equipamentos, além de sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos por permitir a utilização de seu microscópio com câmera acoplada.

À Profa. Dra. Prof. Dra. Sonia Helena Sipaubá, e ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes do CAUNESP/UNESP, Jaboticabal, por ceder as cepas de microalgas e os peixes, respectivamente, necessários para a pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius pela sua contribuição na elaboração dos meios de culturas.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Lopes Simone do Museu de Zoologia (MZUSP), pela supervisão, conversa, troca de idéias e apoio.

À Nina pelo seu constante bom humor e preocupação, uma segunda mãe.

Ao técnico Álvaro S. Costa pelo auxílio nas coletas, pelas conversas e pelo apoio.

Ao técnico Paulo Rosa Jr, por seu lema “tudo a favor da pesquisa”.

A toda equipe do Departamento de Biologia e Secretaria do Programa de Biologia Comparada que direta e indiretamente me auxiliaram, principalmente o Prof. Dr. Fernando Mantelatto, por suas sugestões e conselhos.

Aos meus colegas do laboratório, Fernando Frachone Neves, Aline Matsushita, Daniel Cavalari, Elisa Troncon e Marina Vianna.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

E por último, porém não menos importante, aos meus amigos que acompanharam todo meu desenvolvimento, angústias e alegrias por que passei durante todo o percurso dos últimos quatro anos.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas	i
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
Introdução	01
Objetivos	34
Material e Métodos.....	36
Resultados	58
Discussão	96
Conclusão	114
Referências Bibliográficas.....	115
Anexos	135
Anexo A	135
Anexo B	138

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama das cinco categoriais de fusão do manto em sua porção posterior. Legenda: **i**, abertura inalante; **e**, abertura exalante; **sa**, abertura supranal.13
- Figura 2.** Anatomia dos Unioniformes. **A**, *Margaritifera margaritifera*; **B**, *Fusconaia rubiginosa*; **C**, *Anodontites patagonicus*; **D**, *Diplodon trifidus*; **E**, *Castalina nehringi*; **F**, *Spatha kamerunensis*. Legenda: **ai**, abertura inalante; **ae**, abertura exalante; **sa**, abertura supranal; **p**, pé; **o**, demibrânquia externa; **i**, demibrânquia interna; **h**, palpos; **t**, diafragma. Desenhos modificados de Ortmann (1912b, 1921).19
- Figura 3.** Fases da pesquisa e etapas do trabalho.....37
- Figura 4.** Metodologia para transporte dos espécimes coletados.39
- Figura 5.** Diagrama das características externas da concha de um bivalve de água doce hipotético. Legenda: **am**, margem anterior; **b**, bico (umbo); **bs**, escultura umbonal; **d**, disco; **dm**, margem dorsal; **gl**, linhas de crescimento; **pm**, margem posterior; **pr**, costela posterior; **ps**, depressão posterior; **rm**, linhas de crescimento; **ss**, escultura da concha; **vm**, margem ventral; **w**, asa. Modificado de McMichael e Hiscock (1958).40
- Figura 6.** Manutenção das cepas de microalgas, com luminosidade e aeração constante.....44
- Figura 7.** Esquema da unidade de manutenção, onde os espécimes de *Anodontites trapesialis* foram mantidos suspensos e enterrados. Foto com detalhe da bolsa de nylon com dois indivíduos.....46
- Figura 8.** Acondicionamento dos animais recém coletados, individualmente, para a observação da eliminação e coleta dos gloquídeos.....48

Figura 9. Conquiliometria da valva gloquidial. Legenda: a , altura; a° , ângulo; b , borda; c , comprimento; cld , comprimento da linha dorsal; dg , dente gloquidial; dpv , deslocamento da ponta ventral; pv , ponta ventral. Modificado de Mansur e Campos-Velho (1990).	50
Figura 10. Infestação artificial dos peixes, <i>Astyanax altiparanae</i> , com gloquídeos do gênero <i>Diplodon</i> (cultivo <i>in vivo</i>).	51
Figura 11. Manutenção dos gloquídeos, em incubadora, com o meio artificial de cultura com M 199, fonte protéica e antibióticos/antimicóticos (cultivo <i>in vitro</i>).	55
Figura 12. Cultivo de juvenis do gênero <i>Diplodon</i> . À esquerda em placas de Petri, e à direita em Becker com aeração.	56
Figura 13. Localização da Bacia Hidrográfica do rio Mogi Guaçu. Fonte: http://mapas.znc.com.br/sos_bacias_sp/index.php	58
Figura 14. Local onde foram realizadas as coletas (rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, SP, 21°50'36,1" S e 47°29'44,5" W). As fotos A e B foram tiradas na época de seca, e as fotos C e D em época de chuva.	60
Figura 15. Representação gráfica da variação dos parâmetros abióticos entre outubro/2007 a outubro/2008. Os valores referentes à vazão do rio correspondem a uma média de 10 anos (1996 a 2006).	62
Figura 16. Espécies coletadas no rio Mogi Guaçu, Porto Ferreira, SP (21°50'36,1" S e 47°29'44,5" W). A , <i>Diplodon expansus</i> ; B , <i>Diplodon rotundus gratus</i> ; C , <i>Diplodon fontainianus</i> ; D , <i>Diplodon martensi</i> ; E , <i>Diplodon</i> sp; F , <i>Castalia undosa undosa</i> ; G , <i>Anodontites trapezeus</i> ; H , <i>Fossula fossiculifera</i> . Escala — = 1 cm.	67
Figura 17. Foto da variação das conchas de <i>D. expansus</i> , coletadas no rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, São Paulo.	69

Figura 18. Detalhes dos dentes pseudocardinais das valvas do grupo 1 de <i>Diplodon expansus</i> . À esquerda o dente pseudocardinal da valva esquerda, e a direita o dente pseudocardinal valva direita.	71
Figura 19. Detalhes dos dentes pseudocardinais das valvas do grupo 2 de <i>Diplodon expansus</i> . À esquerda o dente pseudocardinal da valva esquerda, e a direita o dente pseudocardinal valva direita.	72
Figura 20. Características anatômicas dos três grupos de <i>Diplodon expansus</i>	73
Figura 21. Espécie de microalga isolada do rio Mogi Guaçu e cultivada em larga escala no laboratório (<i>Chlamydomonas</i> sp).	75
Figura 22. Crescimento da densidade populacional de <i>Chlamydomonas</i> sp cultivada em diferentes meios de cultivo.	76
Figura 23. Gloquídeos das espécies do gênero <i>Diplodon</i> que foram liberados em laboratório. Legenda: A , <i>Diplodon fontainianus</i> ; B , <i>Diplodon martensi</i> ; C , <i>Diplodon rotundus gratus</i> ; D , <i>Diplodon expansus</i> var. 1, var. 2 e var. 3. Escala — = 100 µm.	79
Figura 24. Fotos das culturas de gloquídeos contaminadas. A , incubação apenas com meio de cultura; B , incubação com meio de cultura e plasma de peixe.	87
Figura 25. Fotografias dos juvenis recém metamorfoseados. A , <i>Diplodon expansus</i> var. 1; B , <i>Diplodon expansus</i> var. 2; C , <i>Diplodon martensi</i> ; D , <i>Diplodon rotundus gratus</i> . Escala — = 200 µm.	91
Figura 26. Fotografias dos juvenis. A , <i>Diplodon expansus</i> var. 1 com 5 dias; B , <i>Diplodon expansus</i> var. 2 com 5 dias; C , <i>Diplodon martensi</i> com 5 dias; D , <i>Diplodon rotundus gratus</i> com 5 dias. As fotografias A, B e D foram tiradas com microscopia de epifluorescência. Escala — = 500 µm.	92

Figura 27. Fotografias dos juvenis. **A**, *Diplodon expansus* var. 1 com 15 dias; **B**, *Diplodon expansus* var. 2 com 10 dias; **C**, *Diplodon martensi* com 15 dias; **D**, *Diplodon rotundus gratus* com 15 dias. A fotografia A foi tirada com microscopia de epifluorescência. Escala — = 500 µm.....94

Figura 28. Fotografias dos juvenis. **A**, *Diplodon rotundus gratus* com 30 dias; **B**, *Diplodon martensi* com 30 dias; **C**, *Diplodon martensi* com 60 dias; **D**, *Diplodon martensi* com 90 dias. As fotografias A, B e D foram tiradas com microscopia de epifluorescência. Escala — = 500 µm.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localidades e coordenadas onde foram realizadas as coletas preliminares dos bivalves.....	38
Tabela 2. Concentrações (g/ml) de fósforo, potássio e nitrogênio em cada diluição testada para o cultivo de fitoplâncton.....	43
Tabela 3. Combinação de antibiótico e fungicida na formulação do produto da Invitrogen (Cod. prod. 15240-062).	53
Tabela 4. Bivalves límnicos nativos coletados do rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, São Paulo, Brasil, entre março/2008 e setembro/2009.....	68
Tabela 5. Peso, em gramas (médias e desvios padrão), dos espécimes de <i>Anodontites trapesialis</i> mantidos enterrados e suspensos.	77
Tabela 6. Espécies coletadas no rio Mogi Guaçu, no município de Porto Ferreira (21°50'36,10" S e 47°29'44,5" W) e número de indivíduos que desovaram no laboratório.	80
Tabela 7. Número de horas que a viabilidade dos gloquídeos de <i>Diplodon expansus</i> var. 2 permaneceu acima de 75 %. Períodos dentro de uma linha seguidos por letras diferentes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$)...	82
Tabela 8. Número de horas que a viabilidade dos gloquídeos de <i>Diplodon rotundus gratus</i> permaneceu acima de 75 %. Períodos dentro de uma linha seguidos por letras diferentes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$)...	82
Tabela 9. Medidas morfométricas das conchas dos gloquídeos de <i>Diplodon expansus</i> var. 1, <i>D. expansus</i> var. 2 e <i>D. rotundus gratus</i>	84

Tabela 10. Duração do período de infestação e porcentagem de metamorfose, em *Astyanax altiparanae*, de acordo com a espécie de bivalve e de temperatura do experimento.86

Tabela 11. Tempo de sobrevivência dos gloquídeos de *Diplodon fontainianus* e *D. expansus* var. 2 incubados a 18 °C com plasma de diferentes espécies de peixe como fontes protéicas na composição do meio de cultura.89

TABELA 12. Porcentagem de sobrevivência (e porcentagem de metamorfose) dos gloquídeos de *Diplodon rotundus gratus*, *D. expansus* var. 2 e *D. martensi* incubados a 18 °C com diferentes fontes protéicas na composição do meio de cultura.....89

Tabela 13. Sobrevivência dos juvenis pós-metamórficos do gênero *Diplodon*. Os valores de sobrevivência representam uma média entre as espécies testadas.90

Tabela 14. Sobrevivência dos juvenis com 5 dias após a metamorfose do gênero *Diplodon*. Os valores de sobrevivência representam uma média entre as espécies testadas.....92

Tabela 15. Sobrevivência dos juvenis com 15 dias após a metamorfose do gênero *Diplodon*. Os valores de sobrevivência representam uma média entre as espécies testadas.....93

RESUMO

Os bivalves límnicos, ou náíades da ordem Unionoida, representando a maior radiação dos bivalves na água doce, com seis famílias, 181 gêneros e 800 espécies, sendo encontrados em todos os continentes, e atualmente, representam o grupo de animais de água doce em maior risco de extinção. A causa mais dramática do declínio e extinção dos bivalves dulcícolas é a modificação e destruição do seu habitat, as mudanças climáticas globais e a introdução de animais aquáticos exóticos (não nativos)

Este táxon é o único membro da classe Bivalvia reconhecidos por apresentar um estágio larval parasita em seu ciclo de vida, o qual envolve uma relação obrigatória com um hospedeiro vertebrado, normalmente um peixe, e uma larva altamente modificada, o gloquídio ou lasídio. Esta característica do ciclo de vida é um componente principal de qualquer plano de conservação dos bivalves límnicos.

Com a finalidade de propagar as espécies que estão em perigo de extinção, pretendeu-se desenvolver técnicas viáveis para a obtenção de formas juvenis em laboratório, através do cultivo artificial (*in vitro*) dos gloquídeos.

Através da metodologia empregada foi possível obter indivíduos juvenis com mais de 30 dias das espécies *D. expansus*, *D. rotundus gratus* e *D. martensi*. Além desse resultado, o presente trabalho desenvolveu um novo meio de cultura para as larvas gloquidiais, baseado em um extrato liofilizado de peixe.

ABSTRACT

The freshwater mussels, or naides of the order Unionoida, representing the largest radiation of the bivalves in freshwater, with six families, 181 genera and 800 species, are found on all continents, and currently represent the group of freshwater animals in higher risk of extinction. The most dramatic decline and extinction of freshwater mussels are the modification and destruction of habitat, global climate change and the introduction of exotic aquatic animals (not native).

This taxon is the only member of the class Bivalvia recognized for having a parasitic larval stage in their life cycle, which involves a compulsory relationship with a vertebrate host, usually a fish, and a highly modified larva, the gloquíidium or lasíidium. This feature of the life cycle is a major component of any plan for the conservation of freshwater mussel.

In order to propagate the species that are endangered, we sought to develop viable techniques for obtaining juveniles in the laboratory by artificial cultivation (*in vitro*) of gloquíidios.

Through the methodology used was obtained juveniles over 30 days of the species *D. expansus*, *D. rotundus gratus* and *D. martensi*. Beyond this result, this study developed a new medium for the glochidias larvae, based on an extract of dried fish.

INTRODUÇÃO

Os Bivalvia, atualmente sob o grupo Diassoma, são moluscos sem uma região cefálica definida, com um pé simples aderido à massa visceral, dois pares de brânquias, e cada indivíduo apresenta duas valvas, compostas por carbonato de cálcio, ao redor do corpo. A classe inclui cerca de 20000 espécies vivas encontradas em ambientes marinhos e de água doce que, em sua maioria, possuem alimentação micrófaga ou suspensívora (Brusca e Brusca, 2007).

Apesar de existirem algumas incongruências entre os esquemas de classificação dos Bivalvia, a maioria dos arranjos é consistente com o táxon, dividido em dois subtáxons: Protobranchia e Autobranchia (=Isofilibranchia + Pteriomorpha + Anomalodesmata + Heterodonta + Palaeoheterodonta). Os Palaeoheterodonta atuais contemplam apenas um gênero marinho, Neotrigonia, e a superfamília Unionacea (Giribet e Wheeler, 2002; Graf e Cummings, 2006). A divisão entre os Autobranchia e a inclusão dos Unionoida entre os Palaeoheterodonta foi baseada, tradicionalmente, sobre a morfologia da charneira (Thiele, 1934), escultura umbonal (Modell, 1964), e morfologia do ctenídio (Newell, 1969).

Entre os Palaeoheterodonta existe um táxon muito peculiar, os bivalves límnicos, ou náíades da ordem Unionoida, representando a maior radiação dos bivalves na água doce. Esta assembléia diversa está dividida em seis famílias, 181 gêneros e 800 espécies (Graf e Cummings, 2006). Estas famílias são encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida (Haas, 1969), apesar de ter sido encontrado um fóssil paleozóico de bivalve límnico neste

continente (Anthracosioidea) (Bradshaw, 1984); e atualmente, representam o grupo de animais de água doce em maior risco de extinção (Bogan, 2008).

Esta radiação é única na classe Bivalvia, formando um táxon provavelmente monofilético, suportado pela restrição à água doce, ovoviviparidade, e um estágio larval parasita que deve infestar um hospedeiro apropriado, normalmente um peixe, para completar sua metamorfose (Boss, 1982; Kat, 1984; Schneider, 2001; Wachtler *et al.*, 2001). Existem exceções, tanto na incubação, com o gênero *Rhipidodonta* apresentando uma larva com desenvolvimento direto (Bonetto, 1962), como no parasitismo, com a espécie *Lampsilis cardium* parasitando uma espécie de salamandra (Watters e O'dee, 1998).

Baseado em várias escolas de taxonomia malacológica (Simpson, 1900, 1914; Ortmann, 1910, 1911, 1912, 1921; Frierson, 1927; Modell, 1942; Morrison, 1956, 1973; McMichael e Hiscock, 1958; Pain e Woodward, 1961; Parodiz e Bonetto, 1963; Haas, 1969; Heard e Guckert, 1971; Davis e Fuller, 1981; Boss, 1982; Korniushev, 1998) podemos afirmar que os Unionoida estão representados por seis famílias: Margaritiferidae, Unionidae, Hyriidae, Iridinidae, Mycetopodidae, e Etheriidae.

Segundo Parodiz e Bonetto (1963), as primeiras três destas famílias são reunidas sob a superfamília Unionoidea, e as últimas três pertencem à superfamília Etherioidea. Estas superfamílias foram agrupadas somente pelo tipo de larva que apresentam: os Unionoidea apresentam uma larva tipo gloquídeo e a os Etherioidea apresentam larva tipo lasídeo (Parodiz e Bonetto, 1963).

Graf (2000) testou a monofilia dos Etherioidea *sensu* Parodiz e Bonetto (1963) incluindo os Hyriidae entre os Unionoidea, codificando 38 caracteres da concha e anatomia das partes moles o que possibilitou inferir que o táxon Unionoidea não é monofilético e que o grupo dos Hyriidae é parte de um táxon natural quando incluído entre os Etherioidea. Graf e O'Foighil (2000) hipotetizaram uma filogenia semelhante utilizando análises moleculares. Portanto, Etherioidea *sensu* Graf (2000) e Graf e O'Foighil (2000) [= (Hyriidae + (Iridinidae + Etheriidae))] é sinonímia de Mutelidae de Ortmann (1912, 1921), Thiele (1934) e McMichael e Hiscock (1958).

Como reforço adicional desta separação existe a zoogeografia destes dois táxons, com os Unionoidea no hemisfério norte, e os Etherioidea apresentando uma distribuição Gondwânica (Ortmann, 1921).

A primeira aparição das náíades ocorreu no Triássico (Carniano / Rhaetiano) e Neógeno (Mioceno / Plioceno), após a extinção em massa no fim do Permiano (Graf, 2007). Em contrapartida, quase todas as outras famílias de bivalves que se originaram no Cretáceo (Aptiano / Cenomaniano) e Paleógeno (Daniano / Thanetiano) eram marinhas (Newell, 1969). Isto parece coincidir com o ciclo Wilson correspondendo à agregação (com formação de ambientes fluviais e lacustres de água doce) e separação continental (com formação de mares e oceanos jovens de água salgada). Ou seja, a agregação continental tende a produzir faunas de água salobra/doce, e a separação de continentes pode causar evolução da fauna marinha (Kondo e Sano, 2009).

As pesquisas sobre os bivalves límnicos revelaram alguns padrões macroevolucionários. Os Unioniformes são um grupo cosmopolita, antigo e estritamente continental. Dado que estes padrões são acurados e que a

separação geográfica contribui para a diversificação dos organismos (Mayr, 1963), será esperado que a biogeografia, a evolução dos caracteres, assim como a filogenia dos bivalves de água doce deve refletir a evolução das massas continentais durante o Mesozóico e Cenozóico.

Parodiz (1969) fez uma excelente revisão sobre a malacofauna terrestre fóssil da América do Sul, fornecendo uma lista de espécies para várias localidades, e resumindo a natureza dos registros geológicos de cada parte do continente. O registro fóssil descrito por Parodiz suporta a divisão de Pilsbry (1911) da fauna em três grupos: as espécies autóctones, as espécies que entraram a partir da América do Norte no Cretáceo tardio, e as formas antigas com distribuição global e de origem incerta (ex, Sphaeriidae).

A maioria dos fósseis recentes das áreas brasileiras apresenta afinidades com grupos africanos ou do Velho Mundo, e aqueles encontrados nas localidades austrais são de origem norte americana (Parodiz, 1982).

A interpretação destas introduções recentes não oferece problemas, porém a dualidade da origem de vários registros paleocênicos mostra uma aparente homogeneidade, característica da fauna Neotropical, devido ao completo isolamento da América do Sul durante quase todo o Terciário (Haas, 1969; Parodiz, 1982). A comunicação com a América do Norte foi descontinuada imediatamente após o início do Paleoceno, e não foi restabelecida até o final do Plioceno, por uma nova conexão através da América Central com o soerguimento do Istmo do Panamá (Rosen, 1978).

Durante a maioria do Eógeno (Oligoceno inferior) o escudo cristalino da América do Sul (chamado de Brasília por Ihering) estava separado das terras ao sul (região Patagônica) por um curso de mar conectando o recentemente

formado Oceano Atlântico com o que foi depois o Pacífico leste (Fitzgerald, 2002). A linha divisória do mar corria obliquamente no sentido noroeste a sudeste, desde o sul do Peru para baixo até a área conhecida como Pampas, e segundo Parodiz (1982), é em parte coincidente com a divisão fisiográfica atual do continente entre a zona tropical e a temperada. Esta massa austral de terra foi chamada por Ihering de Archiplata. A cicatriz ou sutura entre Brasília e Archiplata é visível na estrutura geológica da região entre os rios Colorado e Negro ao norte da Patagônia (Visconti *et al.*, 2003). A maioria das localidades paleocênicas onde os fósseis dos bivalves de água doce são encontrados estão nas formações ao longo do cordão Archiplata, mas completamente ausentes no lado oposto, a costa sul da Brasília oriental (Parodiz, 1982).

Portanto, a malacofauna que se desenvolveu em Brasília e Archiplata, não é apenas diferente em sua composição, mas também em sua origem. A maioria das espécies da Archiplata no Paleoceno, conhecida desde a Patagônia até o oeste da Bolívia, apresenta afinidades, e em alguns casos são do mesmo gênero que àquelas conhecidas na América do Norte, do período pré-Triássico. O grupo mais surpreendente são os Hyriidae, aparecendo, primeiramente no Triássico na Pensilvânia e embora tenha se tornado extinto nesta região reaparece repentinamente no Paleoceno na Patagônia (Parodiz e Bonetto, 1963; Parodiz, 1982).

Na América do Sul, à parte da grande Bacia Amazônica, com suas principais origens no oeste, e a drenagem do rio Orinoco, na Venezuela, ambas apresentando restrições distribucionais peculiares das espécies, os principais sistemas hidrográficos da parte centro-leste do continente são o rio São

Francisco, com suas nascentes no platô de Minas Gerais, e o sistema Paraná - La Plata, com seus vários tributários correndo ao sul (Parodiz, 1982).

Figueiredo *et al.* (2009), utilizando novos dados bioestratigráficos, concluíram que o rio Amazonas tornou-se um rio transcontinental cerca de 11 milhões de anos atrás e alcançou sua forma e tamanho atual durante o Plioceno tardio. Antes do Mioceno tardio existia uma plataforma continental que conduzia o curso dos rios para o Pacífico.

Os rios Paraná e São Francisco apresentam vários elementos em comum em seus inícios, porém a abundância e diferenciação dos gêneros e espécies aumentam enormemente em direção ao Uruguai e o rio La Plata. As famílias Hyriidae e Mycetopodidae, com ancestrais bem conhecidos desde o Paleoceno até o Mioceno, não apresentam nenhum registro fóssil de qualquer idade na região dos Pampas e a seção média inferior do rio Paraná contém apenas alguns poucos fósseis holocênicos (Parodiz, 1982). O sistema Paraná – Paraguai – Uruguai - La Plata não existia antes do final do Pleistoceno. E cerca de 11000 anos atrás ocorreu uma grande falha, correlacionada com a terceira fase da orogenia dos Andes. A margem oeste ficou vários metros mais baixa que o lado leste. Uma breve ingressão do mar foi seguida imediatamente pelos efluentes das correntes vindas do norte, através da depressão, formando um novo sistema de drenagem e, portanto o novo estuário (Martinez e Del Rio, 2002). Segundo Parodiz (1982), a fauna límnică introduzida nesta nova bacia sofreu uma rápida especiação. Consequentemente, na família Hyriidae, várias espécies reconhecidas taxonomicamente apresentam uma afinidade genética muito próxima, devido ao seu ancestral comum recente, formando grupos

equivalentes a superespécies. A hibridização, em tais casos, não só é possível como ocorre na realidade (Parodiz, 1973).

A invasão das espécies do norte, no sistema inferior do rio La Plata, provavelmente ocorreu recentemente, através da conexão dos tributários do rio Paraguai superior com os do rio Amazonas. Nenhuma espécie de Mycetopodidae é conhecida a oeste dos Andes, no Peru e Chile, uma área que é ocupada pelos Hyriidae do gênero *Diplodon* (Parodiz e Bonetto, 1963).

Os Hyriidae têm sua origem no Oligoceno na Colômbia e especialmente no Mioceno no Equador (Parodiz, 1982). Os mais antigos *Diplodon* conhecidos estão representados por várias espécies do Triássico na Pensilvânia e Texas. Outro grupo fóssil é encontrado no Paleoceno e Eoceno na América do Sul (sul da Argentina e Chile). Todos esses fósseis são geralmente menores que a maioria das espécies recentes, exceto pelas formas chilenas do Eoceno, que diferem muito pouco da espécie atual *Diplodon patagonicus*. Também são conhecidos outros fósseis de *Diplodon* do início do Terciário desde a Colômbia até o sul da Argentina (Parodiz e Bonetto, 1963).

Martinez *et al.* (1993) descrevem *Tacuarembóia*, um Unionoidea na Formação Tacuarembó, no Uruguai, em depósitos de idade Triássico-Jurássico. Morton e Herbst (2001) descrevem *Diplodon* na Formação La Matilde, do Jurássico Médio, na província de Santa Cruz na Argentina. A diversidade taxonômica dos Unionoidea no Cretáceo de Montana, EUA foi analisada por Scholz e Hartman (2007). Wesselingh *et al.* (2006) citam a ocorrência de *Castalia ambigua*, *Callonaia* sp e *D. longulus* nos rios Purus e Acre, Estado do Acre, Brasil, na Formação Solimões, do Mioceno tardio.

A comparação da distribuição das espécies de Hyriidae recentes e do Terciário mostra que a expansão ocorreu de oeste para leste (as formas mais antigas distribuídas ao longo dos Andes) e posteriormente, especialmente, do sudoeste ao nordeste entre o norte da Patagônia e os rios do sistema Paraná.

Os rios que atravessam a região dos Pampas, tributários do Paraná, apresentam uma maior concentração de sais que os tributários do leste, e de acordo com Bonetto (1961c) e Parodiz e Bonetto (1963), este é um fator que teria restringido a dispersão dos Hyriidae.

A superfamília Unionoidea (= Unionidae + Margaritiferidae) é diversa (686 sp) e está distribuída amplamente através do hemisfério norte; a superfamília Etherioidea (= Hyriidae + Etheriidae + Mycetopodidae + Iridinidae) é relativamente menos especiada (154 sp), e a diversidade das famílias dos Etheriidae está geralmente particionada entre os continentes ao sul.

O grupo irmão dos Unionidae, a família Margaritiferidae, compartilha uma distribuição Holártica similar, porém com uma diversidade significativamente menor (12 sp).

A assembléia de bivalves de água doce da região Afrotropical (85 sp) está composta por três famílias. Existem duas famílias dominantes, os Unionidae (41 sp) e os Iridinidae (43 sp), e uma simples espécie amplamente distribuída dos Etheriidae, *Etheria elliptica* (Graf e Cummings, 2007).

A região Indotropical é a segunda com maior diversidade, com 219 espécies de bivalves límnicos em três famílias. Apenas uma destas espécies, *Pseudomulleria dalyi* na Índia, representa os Etherioidea (Bogan e Hoeh, 2000; Graf e Cummings, 2006). O restante das espécies Indotropicais representam os Unionoidea e o hemisfério norte.

A maior família dos Etheriidae, os Hyriidae (71 sp) é conhecida atualmente apenas na Australásia e América do Sul (McMichael e Hiscock, 1958; Simone, 2006; Graf, 2007). Os Mycetopodidae (36 sp) e seu grupo irmão Iridinidae (43 sp) são conhecidos na região Neotropical e Afrotropical, respectivamente.

Estima-se em 43 espécies de unionídeos na região da Australásia. A diversidade nesta região é dominada pelos Hyriidae com oito gêneros e 28 espécies (Bogan, 2008). Os Hyriidae estão restritos à Austrália, Tasmânia, Nova Zelândia, Nova Guiné e Ilhas Solomon.

A fauna de bivalves límnicos sulamericanos é de origem Gondwânica (Graf, 2000), representando três famílias endêmicas aos fragmentos do super continente acima citado. Em geral, são reconhecidas 74 espécies da América do Sul (Haas, 1969; Simone, 2006), menos da metade (43%) do total da diversidade de espécies neotropicais reconhecidas. As duas famílias dominantes são os Mycetopodidae (32 sp) e os Hyriidae (40 sp), cada um provavelmente representando uma radiação monofilética a partir de um ancestral Gondwânico (Graf, 2007).

Autores mais antigos (Say, 1817; Rafinesque, 1820; Hupe, 1857; Adams e Adams, 1858; Pilsbry, 1911) classificaram as formas sulamericanas das náíades junto com os antigos gêneros coletivos, *Unio* e *Anodonta*. E a esse grupo juntavam *Monocondylaea*, *Hyria* e *Castalia*.

Ihering (1890) reconheceu que existem diferenças entre os espécimes do hemisfério norte e sul sob a sinonímia de *Anodonta*, e que este último grupo compartilhava características com os espécimes africanos (*Mutela* e *Spatha*). E

o denomina *Glabaris* Gray = *Anodontites* Bruguière. Porém o autor deixou as outras formas sob a denominação de *Unio*.

Simpson (1900) separa o grupo sob sinonímia de *Unio* e utiliza o nome *Diplodon* Spix para os espécimes do hemisfério sul, e os une com as náíades australianas.

Ortmann (1911) corroborou com a hipótese de Simpson indicando diferenças anatômicas entre *Diplodon* (assim como *Hyria* e *Castalia*) e os Unionidae do hemisfério norte associando-os a *Glabaris*, formando assim a família Mutelidae (=Etherioidea), subdividida em duas subfamílias, Hyriinae e Mutelinae.

O grupo mais primitivo, Hyriinae (Ortmann, 1921), é encontrado em toda América do Sul, tornando-se mais raro na região norte (Colômbia e Venezuela), não sendo encontrado na América Central, porém sendo encontrado na Austrália também.

Parodiz e Bonetto (1963) descrevem que, na América do Sul, as famílias Hyriidae e Mycetopodidae ocupam áreas sobrepostas, apesar de nas zonas marginais existirem apenas um grupo ou outro. Os Mycetopodidae são mais restritos em sua distribuição austral, ocupando áreas ao norte, leste e periféricas da região dos Pampas, e alguns tributários que cruzam esta região e deságuam no rio Paraná. Nos afluentes do lado esquerdo do rio Paraná, os Mycetopodidae apresentam um maior desenvolvimento que os Hyriidae. Na direção noroeste eles se distribuem até a América Central e México, onde os Hyriidae estão ausentes (Bonetto, 1961c).

Os Mycetopodidae, composto por quatro subfamílias endêmicas (Mycetopodinae, Monocondylaeinae, Leilinae, Anodontitinae), foram

recentemente hipotetizados como sendo grupo irmão dos Iridinidae afro tropicais (Graf e Cummings, 2006; Bogan e Hoeh, 2000). E as tribos endêmicas dos Hyriinae, Prionodontini, Diplodontini, e Castaliini formariam um clado irmão de Hyridellini, da Australásia, formando a família Hyriidae (Graf e O'Foighil, 2000). A distribuição atual da família Hyriidae, segundo Simone (2006) pode ser observada no anexo A.

Simpson (1900, 1914) foi o primeiro a propor um sistema de classificação para o gênero *Diplodon*, separando as formas arredondadas (*Cyclomya*) das demais. Porém foi Ortmann (1921), através de estudos anatômicos minuciosos e de um grande número de exemplares de cada tipo, que conseguiu separar o gênero em grupos, com características bem definidas. Mas o mesmo autor em seu trabalho admite que existam formas transitórias entre os grupos que são de difícil classificação.

Os autores Ortmann (1921), Bonetto (1960, 1961a, 1961b, 1962, 1964, 1965), Bonetto e Ezcurra (1963), Parodiz e Bonetto (1963) e Mansur (1973) citam que, além das características das conchas, algumas particularidades da morfologia do corpo, posição do marsúpio e a descrição do gloquídio seriam de grande utilidade para a identificação das espécies.

O manto é um órgão, similar a uma folha, que forma a parede dorsal do corpo, e na maioria dos moluscos cresce durante o desenvolvimento na forma de uma ou duas dobras que contêm camadas de músculo e canais hemocélicos. Este crescimento externo cria um espaço entre a dobra do manto e o corpo propriamente dito, a cavidade do manto ou palial. Os bivalves possuem uma grande cavidade do manto, com o pé e a massa visceral no centro. As dobras do manto seguem a borda das conchas lateralmente,

originando posteriormente a abertura inalante e exalante, através das quais a água entra e sai da cavidade do manto.

São reconhecidas cinco categoriais de fusão do manto em sua porção posterior, simplificado como Tipos I-V (Yonge, 1957) (figura 1).

O tipo I é a condição mais simples. Neste tipo o manto posterior é (de modo geral) não fundido, e o diafragma separando a câmara infrabranquial da suprabranquial é grosseiramente incompleto. A divisão da cavidade do manto é funcionalmente alcançada via sulcos paliais.

No Tipo II não há fusão do manto entre as aberturas inalantes e exalantes, mas os ctenídios são fundidos ao manto adjacente ao longo de seu comprimento, formando um diafragma levemente incompleto. As pregas internas do manto são fundidas por uma pequena extensão, dorsal a abertura exalante, e então re-abre para formar uma terceira abertura, a abertura supra-anal.

No tipo III as pregas internas do manto são fundidas entre as aberturas inalantes e exalantes. Enquanto que no Tipo IV, além da fusão entre as aberturas, também existe uma fusão das pregas internas do manto dorsal da abertura exalante, freqüentemente formando um sifão exalante. A principal distinção entre os tipos III e IV é que, no primeiro, as pregas internas não são unidas independentemente das pregas externas do manto acima da abertura exalante. Em certos gêneros com a fusão palial do tipo IV, há freqüentemente uma pequena associação das pregas ventrais internas com a abertura inalante. A presença desses pequenos anexos parece variar com as espécies, porém nunca está associado com o sinus palial.

O Tipo V é caracterizado por sífões inalante e exalante retráteis e um sinus palial. A abrangência completa de morfologia de aberturas leva à formação de sífões do Tipo A de Yonge (1957, 1982).

Figura 1. Diagrama das cinco categoriais de fusão do manto em sua porção posterior. Legenda: i, abertura inalante; e, abertura exalante; sa, abertura supranal.

A água que entra na cavidade palial pelas aberturas e/ou sífões inalantes, banha as brânquias, atinge a cavidade suprabranquial e sai pelas aberturas e/ou sífões exalantes. Neste trajeto, o material em suspensão que entra na cavidade palial é retido, ocorrem as trocas gasosas e os produtos de excreção, defecação e sexuais são eliminados.

Os cílios dos ctenídios geram a corrente de água, e o aumento da eficiência para a tomada de alimento foi alcançado através de várias modificações dos ctenídios. A modificação principal foi a conversão das placas pequenas e triangulares originais em filamentos em forma de V com extensões em ambos os lados. A lamela deste filamento em forma de V que está aderida ao eixo central do ctenídio é chamada de lamela descendente; a lamela formando a outra metade do V é a lamela ascendente. Normalmente, a lamela ascendente está conectada por contatos ciliares ou junções do tecido ao teto

do manto, ou à massa visceral. Tomados em conjunto, os dois filamentos em forma de V, com sua dupla linha de folhetos, formam uma estrutura em forma de W, quando observadas em uma secção transversal.

Conforme a água passa através dos espaços interfilamentares, as partículas em suspensão, presentes na água, são retidas na superfície dos filamentos. Uma vez sobre a superfície, as partículas são movidas em direção ao canal alimentar na borda livre do ctenídio, e depois anteriormente para os palpos labiais. Os palpos selecionam o material, passando-o para a boca. As partículas rejeitadas caem das brânquias ou palpos na cavidade do manto como pseudofezes.

O sistema natural das náíades expressa uma tendência de desenvolvimento e especialização de três características anatômicas principais, que por sua vez estão conectadas com certas funções. Estes são: a separação de uma câmara branquial simples original em duas câmaras, branquial e suprabranquial, pelo diafragma; a restrição das aberturas inalante e exalante para partes definidas da borda do manto, com uma tendência para formar sifões; e o desenvolvimento das brânquias em órgãos para carregar os ovos e larvas (marsúpio), e a especialização e adaptação das brânquias para esse propósito (Ortmann, 1912, 1921).

No desenvolvimento do diafragma três tipos podem ser distinguidos. O estado mais primitivo está representado por Margaritiferidae, onde o diafragma está formado pelo crescimento conjunto da lamela interna da demibrânquia interna em ambos os lados do corpo, e a fusão da lamela externa da demibrânquia externa com o manto. Mas aqui o diafragma ainda está incompleto, de forma que a extremidade posterior da lamela externa da

demibrânquia externa permanece livre, não se conectando com o manto em sua margem posterior (figura 2A). Em todos os outros casos o diafragma é completo, e se estende até ou próximo à margem posterior do manto, onde ele separa a abertura inalante da exalante. São reconhecidos dois tipos, Unionidae (América do Norte e Ásia) com o diafragma formado pelas brânquias sozinhas, e Etherioidea (América do Sul e África) com o diafragma formado anteriormente pelas brânquias, mas posteriormente pela união do próprio manto.

As bordas do manto são originalmente livres em toda volta. Mas uma tendência desenvolve-se para originar duas aberturas distintas, os sifões (Yonge, 1957). A condição mais primitiva é encontrada em Margaritiferidae, onde as duas aberturas são distinguidas apenas pelo desenvolvimento de papilas.

Mas a tendência geral, entre os Unionidae, é não apenas juntar as bordas do manto pelo diafragma, separando a abertura inalante e exalante. Mas também limitar acima da abertura exalante, pela junção das bordas do manto, formando uma abertura supranal, a qual apenas em casos raros torna se fechada (figura 2B). A abertura inalante nos Unionidae nunca está definida anteriormente por um crescimento conjunto das margens do manto (Ortmann, 1911, 1912).

Na outra superfamília, Etherioidea, as duas aberturas estão sempre separadas entre si por um diafragma completo, formado pelo manto (Ortmann, 1921). Em alguns casos as bordas do manto são livres do resto (ex., *Anodontites*) (figura 2C). Em outros casos a abertura exalante está definida acima por uma junção das margens do manto (ex., *Diplodon*), mas neste grupo uma abertura supranal nunca é formada (figura 2D). Além disso, foi encontrado

um passo a mais de desenvolvimento neste grupo, que consiste na demarcação anterior da abertura inalante, pelo crescimento conjunto das bordas do manto (ex., *Castalia*) (figura 2E).

A formação do marsúpio oferece uma variedade grande. É difícil dizer qual está relacionada com a condição primitiva, mas segundo Ortmann (1911), originalmente todas as quatro brânquias serviam como um receptáculo para os ovos.

Fora desta condição original estruturas mais avançadas se desenvolveram, as quais geralmente exibem a tendência de localizar o marsúpio em certas brânquias ou partes das brânquias, e dividir o espaço interlamelar em compartimentos (ovisacos e tubos aquíferos). Nos diferentes grupos este propósito foi alcançado de formas diferentes e em diferentes graus (Ortmann, 1921).

Em Margaritiferidae as brânquias não possuem partições e, aparentemente não são encontrados ovisacos e tubos aquíferos. Consequentemente são primitivas a este respeito.

Nos Unionidae mais primitivos (subfamília Unioninae), todas as quatro brânquias ainda servem como marsúpio, e preservaram, portanto, a condição original, ou somente a demibrânquia externa serve a esse propósito. Ainda nestes, o espaço interlamelar é dividido por septos, em compartimentos pouco regulares, dispostos verticalmente à borda das brânquias, e paralelos aos filamentos branquiais. Os mesmos caracteres fundamentais, restrição do marsúpio às demibrânquias externas e desenvolvimento de ovisacos e tubos aquíferos, são encontrados nos Unionidae mais altamente desenvolvidos (subfamílias Anodontinae e Lampsilinae), mas aqui as especializações

encontradas, podem estar principalmente ligadas a adaptações a um período reprodutivo prolongado, e a uma peculiar maneira de liberar os gloquídeos (Graf e O'Foighil, 2000).

No grupo Afro-Sulamericano das náíades (Etherioidea), os bivalves apresentam o marsúpio restrito às demibrânquias internas. Dois tipos principais podem ser distinguidos entre eles, segundo sua diferenciação interna da brânquia marsupial. Em um caso, a parte marsupial da demibrânquia interna está um pouco restrita à porção mediana, e tubos aqüíferos intercomunicantes bastante incompletos são formados por conexões interlamelares; no outro caso, septos fortes e completos formam tubos aqüíferos isolados. Em nenhum destes casos a estrutura da brânquia marsupial é idêntica àquela dos Unionidae, apesar dos septos e tubos aqüíferos mostrarem alguma analogia. Ortmann (1911) considera isso um caso de convergência da estrutura.

Os unioniformes norte americanos se diferenciam dos tipos Africanos e Sul Americano, na junção anterior das demibrânquias internas e o formato dos palpos. A diferença mais significativa entre Margaritiferidae e as demais formas de unionídeos norte americanos está na conformação das aberturas inalante e exalante. Na primeira, as aberturas inalante e exalante formam uma grande e ininterrupta abertura.

Anatomicamente, os unioniformes da América do Norte estão caracterizados por apresentar uma diminuição perceptível da largura da demibrânquia interna em direção a sua extremidade anterior; esta está mais ou menos à frente da extremidade anterior da demibrânquia externa, e está aderida, em distâncias maiores ou menores, na porção ascendente da linha de adesão do manto, mas está sempre separada distintamente da extremidade

posterior do palpo, geralmente por um intervalo considerável. O formato do palpo não é um caráter tão bem marcado, mas eles são mais ou menos falciforme, com a ponta unida posteriormente. A margem posterior dos dois palpos pode ser mais ou menos conectada ou quase livre (figura 2B).

As formas asiáticas se assemelham às norte-americanas no que diz respeito às aberturas inalante e exalante, o diafragma, os palpos e demibrânquias. A única diferença está na separação das aberturas anal e supranal, que é um pouco mais longa, na junção da lamela interna da demibrânquia interna com a massa visceral. Externamente, o principal caráter conchológico são as esculturas radiais.

As náíades africanas se diferenciam dos bivalves de água doce da América do Norte e Ásia pela junção da lamela ascendente da demibrânquia interna com a porção ascendente da linha de adesão do manto, sendo aderido ao longo de todo seu comprimento, fazendo contato entre sua extremidade anterior com a extremidade posterior dos palpos (figura 2F).

Os palpos são largos e curtos, com uma ponta bem insignificante atrás, e não totalmente falciformes; suas margens posteriores não estão conectadas.

As aberturas inalante e exalante estão bem separadas por uma ponte, formada pela união firme das bordas do manto, formando posteriormente um diafragma, com as brânquias não alcançando a margem posterior do manto.

A abertura exalante é fechada acima pela união da borda interna do manto sem deixar uma abertura supranal.

Os septos, dos bem desenvolvidos tubos aquíferos, são afastados um dos outros e fortes. Nas fêmeas apenas as demibrânquias internas são utilizadas como marsúpio, os septos se alargando.

Figura 2. Anatomia dos Unioniformes. **A**, *Margaritifera margaritifera*; **B**, *Fusconaia rubiginosa*; **C**, *Anodontites patagonicus*; **D**, *Diplodon trifidus*; **E**, *Castalina nehringi*; **F**, *Spatha kamerunensis*. Legenda: **ai**, abertura inalante; **ae**, abertura exalante; **sa**, abertura supranal; **p**, pé; **o**, demibrânquia externa; **i**, demibrânquia interna; **h**, palpos; **t**, diafragma. Desenhos modificados de Ortman (1912b, 1921).

As náíades sul-americanas da subfamília Hyriinae, estão dividida pelas características da concha, mas também pelas características da estrutura da brânquia e marsúpio, em três tribos Prisodontini, Castaliini e Diplodontini, incluindo oito gêneros.

A tribo Prisodontini está caracterizada por uma concha subbromboidal, bi-alada ou alada apenas atrás, porém sempre com uma grande expansão posterior. Escultura umbonal radial, bem forte, com coalescência conspícua das costelas verticais; raramente a escultura pode ser não conspícua. Sulco posterior bem marcado. A abertura inalante não está completamente fechada na frente, sendo contínua com a abertura podal. Gloquídios triangulares (isósceles), com dentes mais curtos e menos curvados que Diplodontini, terminando em 2-3 pontas agudas. Gênero *Prisodon*, *Paxyodon* e *Triplodon*.

A concha da tribo Castaliini é sólida, subquadrangular, com o umbo elevado e a cavidade umbonal profunda. Escultura do umbo com desenvolvimento variável, às vezes bastante obsoleta. Abertura inalante torna-se perfeitamente fechada na frente, exibindo a tendência de formar um sifão verdadeiro. Gloquídios subtriangulares (equiláterais ou isósceles), com dentes triangulares, retos e curtos, largos em sua base, mas não divididos na extremidade final, cirros agrupados em forma de tufo; sem filamento larval. Gênero *Castalia*, *Castaliella* e *Callonaia*.

A tribo Diplodontini é caracterizada por uma concha com formato regular, não alada, e sempre com costelas radiais na região umbonal, porém com crescimento variável. Um sulco posterior fracamente desenvolvido, com exceção de algumas formas mais alongadas e mais agudas posteriormente (ex., *D. parallelipedon* ou *D. parodizi*). Abertura inalante similar a Prisodontini.

Seus gloquídios são subtriangulares (escaleno), com dentes em forma de S, curvados e terminando em um par de espículas; apresentam um filamento larval longo; e 2-4 cirros sensitivos. Espécies com desenvolvimento direto não apresentam dentes ou ganchos na concha embrionária, mas uma, ou várias, bandas de crescimento marcadas. Gênero *Diplodon* e *Rhipidodonta*.

Na tribo Diplodontini as espécies apresentam uma variação individual e ecológica extraordinária (Parodiz, 1982), freqüentemente repetida ou mesclada entre as numerosas populações locais, porém sem valor taxonômico (Ortmann, 1921; Mansur, 1972; Parodiz e Bonetto, 1963). Divisões subgenéricas foram propostas baseadas somente em características transitórias das conchas. A separação mais convincente está baseada primariamente na condição parasítica ou não da larva; e em uma segunda etapa, grupos de espécies podem ser reconhecidos por caracteres conquiliológicos. Apesar disto, às vezes, apresentam sérias dificuldades de identificação devido às variações intermediárias que os grupos apresentam.

A biologia, ecologia, aspectos reprodutivos e sistemáticos dos bivalves de água doce da super família Etherioidea, principalmente no estado de São Paulo, são ainda escassos e em muitos aspectos desconhecidos. Assim, podemos citar: anatomia comparada de *Anodontites trapesialis* e *A. trapezeus* (Hebling, 1976), anatomia funcional de *D. rotundus gratus* (Hebling e Penteado, 1974), *Fossula fossiculifera* (Avelar, 1993), *Castalia undosa undosa* (Avelar e Santos, 1991), *D. rhombeus fontainianus* (Avelar e Cunha, 2009), ciclo gametogênico de *D. rotundus gratus* (Avelar e Mendonça, 1998).

Quanto às formas larvais vários autores, entre eles; Ortmann (1921), Bonetto (1959a, 1959b, 1960a, 1960b, 1961a, 1961b), Bonetto *et al.* (1962),

Mansur e Campos-Velho (1990), Mansur e Silva (1999) e Mansur e Campos-Velho (2000), estudaram alguns aspectos da biologia, anatomia e ou merísticos dos gloquídeos, das espécies de Hyriidae Sul-Americanas.

Segundo Mansur (1970) os trabalhos de cunho sistemático foram feitos com dados superficiais das conchas, originando um grande número de sinonímias e citações de espécies para um mesmo sítio, quando de fato, são variações ecológicas. Para Parodiz (1982), estas variações não existem, mas se duas ou mais formas de uma simples espécie considerada habitar o mesmo nicho ecológico, elas dificilmente poderão ser chamadas ecológicas. Uma visão taxonômica conhecida das espécies na área permitiria o reconhecimento de formas híbridas.

O gênero *Diplodon* é considerado por Bonetto e Ezcurra (1963) como sendo o mais primitivo, sendo que não existe ainda, uma classificação satisfatória para agrupar as espécies. A grande variabilidade na forma da concha e diferentes tipos de ambientes que eles ocupam na grande extensão da malha hidrográfica têm gerado discussões com relação ao número de espécies e as sinonímias (Bonetto, 1951, 1961a, 1961b, 1961c; Mansur e Anflor, 1981). Estudos de morfologia interna de estômago comparando exemplares-tipo a exemplares identificados com base apenas nas características conquiliológicas demonstram que o trabalho de determinação de espécies do gênero *Diplodon* pode ser equivocado (Mansur e Anflor, 1981).

De acordo com Bonetto, (1961a, 1961b), além de conhecer conquiliologia e caracteres morfológicos do adulto, o ideal para se estudar a sistemática do gênero *Diplodon* é conhecer as características morfológicas dos gloquídeos, fase parasitária de espécies do gênero, que necessita de um

hospedeiro intermediário para completar o ciclo reprodutivo. Segundo o autor, as características gloquidiais são sempre preservadas em qualquer que seja a distribuição geográfica e o meio em que as espécies vivem.

As características gloquidiais ajudam na identificação e classificação desse grupo de moluscos no qual indivíduos juvenis ou adultos freqüentemente não fornecem critérios diagnósticos interespecíficos (Mansur e Silva, 1999).

Outra forma de abordagem seria através de análises moleculares (Graf e O'Foighil, 2000; Graf, 2002; Graf e Cummings, 2006).

Para o Estado de São Paulo, não existe ainda, nenhuma contribuição no sentido de estudar profundamente as formas larvais das espécies nativas. O estudo dos gloquídeos, a posição e estrutura do marsúpio são caracteres de fácil distinção para muitas espécies (Bonetto, 1965).

Devido às inúmeras controvérsias taxonômicas envolvendo as espécies do gênero *Diplodon*, cuja identificação está relacionada em grande parte as características simples da concha, torna-se cada vez mais necessário agregar conhecimentos da morfologia e da biologia dos bivalves de água doce, justificando-se assim, o estudo para uma correta diagnose específica e para a preservação das espécies deste grupo tão interessante e ao mesmo tempo tão ameaçado.

O modo como os organismos se reproduzem e se dispersam podem provocar profundos efeitos sobre a estrutura genética e o processo demográfico das populações (Kat, 1984). Igualmente, a forma de reprodução e dispersão pode desempenhar um papel importante na longevidade das espécies, distribuição geográfica e taxa de especiação (Mayr, 1971; Kat, 1984; Graf, 1997; Wachtler *et al.*, 2001). Os bivalves límnicos da superfamília

Unionacea são os únicos membros da classe Bivalvia que são conhecidos por apresentar um estágio larval parasita em seu ciclo de vida, o qual envolve uma relação obrigatória com um hospedeiro vertebrado, normalmente um peixe, e uma larva altamente modificada, o gloquídio ou lasídio. Este parasitismo é considerado atípico, pois estes organismos apresentam apenas sua etapa larval parasita, enquanto que os adultos são de vida livre (Kat, 1984; Wachtler *et al.*, 2001).

Durante o período de desova, os machos maduros liberam grandes quantidades de gametas na água. Para que ocorra a fertilização, estes gametas devem passar pela abertura inalante de fêmeas, da mesma espécie, sexualmente maduras. Os gametas masculinos vão através da abertura até a câmara suprabranquial, onde são mantidos os óvulos. Os ovos fertilizados são transferidos para as câmaras brânquias. Tal câmara forma um saco incubador modificado, chamado marsúpio. Na formação do marsúpio, ambos ou apenas um par de brânquias pode estar envolvido. Durante sua permanência no marsúpio, os ovos fertilizados, desenvolvem-se em embriões e metamorfoseiam para uma forma larval (Mackie, 1984).

As larvas parasitárias podem ser de duas formas gerais. Enquanto Unionoidea possui somente gloquídio, Etherioidea *sensu* Ortmann apresenta tanto gloquídio como lasídio. Os gloquídeos são pequenos (70-350 µm), constituídos de um músculo adutor simples e células do manto fechados por duas valvas calcárea ligadas por uma charneira (Arey, 1932). Eles se aderem ao tecido hospedeiro fechando suas valvas sobre o epitélio exposto das brânquias ou nadadeiras. O tecido hospedeiro encista a larva do molusco, e é dentro deste cisto que o gloquídio se metamorfoseia em juvenil (Kat, 1984;

Graf, 1997). Os gloquídeos geralmente pertencem a uma das duas variedades: (1) subcircular a suboval e sem ganchos ou (2) subtriangular e com ganchos (Coker *et al.*, 1921; Hoggarth, 1999), embora exista variação dentro destes tipos (*Potamilus*; Roe e Lydeard, 1998). Os gloquídeos, também podem possuir uma estrutura similar a um longo fio de bisso (Mansur, 1999; Wachtler *et al.*, 2001). Os lasídios também são pequenos (85-150 μm , sem incluir o bisso larval), mas são larvas trilobadas com concha univalve e não calcificada. Assim como nos gloquídeos podem se apresentar sob duas formas: (1) tipo lasídio e (2) tipo haustório (Bonetto e Ezcurra, 1963). Embora diferentes em sua morfologia e tamanho, a distinção fundamental entre as duas variedades de lasídio é que enquanto o primeiro adere ao hospedeiro através da formação de cistos, o tipo haustório se adere por apêndices tubulares (Fryer, 1954, 1961; Parodiz e Bonetto, 1963; Wächtler *et al.*, 2001).

Os gloquídeos podem ser liberados após algumas semanas, ou os gloquídeos maduros são mantidos no marsúpio por meses, dependendo da espécie (Kat, 1984; Mackie, 1984).

A liberação dos gloquídeos pode ocorrer de formas diferentes, o que reflete os vários graus de adaptação envolvidos tanto na atração do peixe hospedeiro como no aumento da probabilidade de aderir-se (Kat, 1984). Na maioria das espécies, o gloquídeo passa do marsúpio para o canal suprabranquial, e é liberado através da abertura exalante. Quando liberado desta forma, os gloquídeos estão mais ou menos agrupados por uma capa de muco, a qual ou se dissolve logo após a liberação ou mantêm os gloquídeos nos chamados conglutinados, que podem ser de várias formas e cores (Ortmann, 1910; Arey, 1932; Graf, 1997; Pillow *et al.*, 2008). Entre algumas

espécies de Lampsilinae, os gloquídeos são liberados em massas irregulares através de aberturas especiais na base do marsúpio, e são liberados através da abertura inalante por uma rápida adução das valvas (Ortmann, 1910; Graf, 2000).

Após sua liberação, os gloquídeos devem entrar em contato com seus hospedeiros, os peixes. E depois de um período de incubação, que é variável segundo a espécie, os gloquídeos sofrem uma metamorfose transformando-se em juvenis de vida sésil, similar ao modo de vida dos bivalves adultos.

A fauna de bivalves límnicos tem mostrado um declínio acentuado durante o último século (Watters, 1996; Cosgrove e Hastie, 2001; Villella *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2004; Bogan, 2008), o mesmo vem ocorrendo com a fauna nativa do Brasil (Beasley *et al.*, 2000; Beasley, 2001; Almeida, 2006). O consenso é que a causa mais dramática do declínio e extinção dos bivalves dulcícolas é a modificação e destruição do seu habitat. Isto pode ocorrer devido aos efeitos das barragens, canalização, mudanças da profundidade da água (dragagem dos rios), devido a mudanças no fluxo de água ou mudanças na deposição de partículas finas (silte e areia). Estas modificações afetam não apenas os bivalves, mas também os peixes que são utilizados durante a fase parasítica dos bivalves límnicos. Como impactos adicionais, podemos incluir a utilização da água para a indústria e irrigação, a poluição; a criação de áreas impermeabilizadas, sem percolamento, devido à urbanização e construção de estradas (Bogan, 2008) e as mudanças climáticas globais (Hastie *et al.*, 2003).

A introdução de animais aquáticos exóticos (não nativos) também compõe um grande perigo para os moluscos de água doce nativos. As espécies introduzidas se reproduzem rapidamente, competindo com os

moluscos nativos por alimento e espaço. Um exemplo bem conhecido é a invasão dos rios e lagos da América do Norte pelo mexilhão zebra, *Dreissena polymorpha* (Ricciardi *et al.*, 1998), e a recente introdução, no Brasil, das espécies *Limnoperna fortunei* (Mansur *et al.*, 2003) e *Corbicula fluminea* (Beasley *et al.*, 2003).

Uma alternativa seria utilizar o cultivo destes moluscos para manter os estoques naturais. A aquicultura pode auxiliar na preservação da biodiversidade quando, como uma atividade econômica com êxito, ela puder prover assistência local para a pressão nas espécies aquáticas comumente exploradas (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2004). Para que a atividade da aquicultura seja sustentável ela deve atender a alguns requisitos básicos, tais como, sempre produzir mudanças não negativas nos estoques de recursos naturais e na qualidade ambiental (Sachs, 1993; Assad e Bursztyn, 2000).

Com esse propósito, alguns pesquisadores, na Europa e América do Norte, iniciaram uma série de pesquisas com o intuito de reproduzir estes bivalves de água doce e mantê-los em laboratório para posterior liberação no meio ambiente (Young e Williams, 1984; Buddensiek, 1995; Gatenby *et al.*, 1997; Kirk e Layzer, 1997; O'Beirn *et al.*, 1998; Tankersley e Butz, 1998; Neves, 1999; Beck, 2001; Henley, 2002; Zimmerman e Neves, 2002; Mummert, 2006). Contudo, tais trabalhos implicam no conhecimento do peixe hospedeiro para a obtenção das formas juvenis dos bivalves.

Ao contrário dos bivalves marinhos, as náíades necessitam, geralmente, de um peixe hospedeiro com o propósito de completar seu ciclo de vida. Como parasitas, uma parcela da sua nutrição é derivada do hospedeiro (Fisher e

Dimock, 2002), mas a maioria dos unionídeos não cresce durante o encistamento (Lefevre e Curtis, 1912). A fixação dos gloquídeos não causa nenhum prejuízo aos peixes hospedeiros (Henley e Neves, 2001), entretanto, se o parasitismo ocorrer em grandes quantidades pode levar o hospedeiro à morte (Silva-Souza e Eiras, 2002).

Caso o gloquídeo se fixe em um peixe hospedeiro compatível, o tecido epitelial de células hospedeiras do peixe migra sobre a larva, encapsulando-a em um cisto, dentro do qual ocorre o desenvolvimento e metamorfose da larva em juvenil. A larva permanece encistada por dias a meses, dependendo da espécie e da temperatura, e se transforma em indivíduos juvenis, desenvolvendo um coração verdadeiro, trato digestivo, e um pé musculoso. Quando a metamorfose está completa, o juvenil se desprende e inicia uma vida sésil independente, tornando-se suspensívoros bentônicos (Arey, 1932; Young e Williams, 1984a; Mansur, 1999).

Os gloquídeos que se fixam às espécies incompatíveis (não hospedeiras) são destacados dentro de poucos dias após a fixação porque eles ou falham ao ser encistados ou são subsequentemente desprendidos do hospedeiro antes que a transformação se complete (Rogers-Lowery *et al.*, 2007).

Kirk e Layzer (1997) e Henley e Neves (2001) mostraram que existe uma resposta imunológica do peixe ao encistamento do gloquídeo. E que este, quando não se adere à espécie hospedeira específica, não completa seu desenvolvimento satisfatoriamente. Esta mesma resposta espécie-específica entre as larvas de bivalves e seus peixes hospedeiros também foi encontrada por outros autores, como Zale e Neves (1982), Young e Williams (1984b), Kat (1984), Williams *et al.* (1993) e Wächtler *et al.* (2001).

A especificidade do hospedeiro, do ponto de vista imunológico, envolve a adaptação dos gloquídeos a sobreviver às respostas defensivas inatas do peixe hospedeiro. Respostas imunes inatas são aquelas que não necessitam uma exposição prévia do indivíduo hospedeiro aos antígenos parasita. Os peixes também podem adquirir uma imunidade aos gloquídeos via uma resposta imune adaptativa, incluindo a produção de anticorpos. Entretanto, a produção de anticorpos e a imunidade adaptativa desenvolvem-se lentamente no peixe e aparentemente afetam os gloquídeos geralmente depois de múltiplas infestações (Meyers *et al.*, 1980; Bauer e Vogel, 1987; Rogers e Dimock, 2003; Dodd *et al.* 2005, 2006).

Uma resposta inata do hospedeiro é a encapsulação dos parasitas fixados pelas células epiteliais, chamadas queratócitos (Arey, 1932; Rogers-Lowery e Dimock, 2006). Esse processo é essencial para o êxito do parasitismo pelos gloquídeos, mas paradoxalmente, a encapsulação parece ser uma resposta anti-ectoparasita e anti-ferida. Após a encapsulação, as defesas celulares como os granulócitos e fagócitos são concentrados na cápsula e podem matar os gloquídeos incompatíveis. Os gloquídeos incompatíveis também são liberados quando a cápsula se degenera ou se desgruda como uma pequena massa de tecido (Arey, 1932; Meyers *et al.*, 1980; Waller e Mitchell, 1989).

As náíades exibem vários graus de especificidade de hospedeiros. A proporção de gloquídeos que sofre metamorfose com sucesso pode variar bastante entre as espécies hospedeiras. A maioria das espécies de unioniformes não é capaz de utilizar uma ampla variedade de espécies de peixes. Em geral, poucas espécies bem relacionadas de hospedeiros, ou

populações dentro de espécies, irão suportar o desenvolvimento dos gloquídeos de várias espécies (Zale e Neves, 1982; Neves *et al.*, 1985; Yeager e Neves, 1986).

Vários estudos foram feitos para identificar as espécies hospedeiras específicas desses bivalves (Hoggarth, 1992; Watters e O'Dee, 1996; Haag e Warren, 2003). Em contato com bons hospedeiros, 90% dos gloquídeos fixados podem metamorfosear-se com sucesso em juvenis, enquanto que apenas uma pequena porção terá êxito em espécies hospedeiras marginais (Bigham, 2002; Barnhart *et al.*, 2008).

Durante o seu ciclo de desenvolvimento natural, a taxa de mortalidade das larvas é muito alta devido à necessidade de encontrar um peixe hospedeiro, predação, remoção para hábitat inapropriado pelas correntes, doenças bacterianas e fungais durante parasitismo no peixe e finalmente assentamento em sedimentos não apropriados para o bivalve juvenil. Young e Williams (1984a), na Escócia, estimaram em acima de 99% a mortalidade de larvas gloquídias, na natureza, do bivalve perlífero *Margaritifera margaritifera* entre a incubação na fêmea e encistamento no peixe e entre desprendimento do peixe e assentamento no fundo do rio.

Esta característica do ciclo de vida é um componente principal de qualquer plano de conservação dos bivalves límnicos, mas os peixes hospedeiros de várias espécies não são conhecidos ou não foram totalmente investigados (Zale e Neves, 1982; Watters, 1996; Watters e O'Dee, 1998).

Uma forma de contornar o problema encontrado seria o cultivo artificial (*in vitro*) das larvas dos bivalves límnicos (Lefevre e Curtis, 1912; Isom e Hudson, 1982; Hudson e Isom, 1984; Young e Williams, 1984b; Keller e Zam,

1990; Hudson e Shelbourne, 1990; Uthaiwan *et al.*, 2001, 2002, 2003). O cultivo artificial de bivalves de água doce tem sido largamente ignorado. Os poucos estudos que foram feitos não obtiveram êxito ou são proibitivos do ponto de vista de metodologia e consumo de tempo (Isom e Hudson, 1982; Keller e Zam, 1990). O grau de sucesso obtido, atualmente, indica que a produção de quantidades suficientes de indivíduos viáveis para a preservação e uma exploração comercial, em potencial, é possível (Uthaiwan *et al.*, 2001, 2002, 2003).

Apesar das pesquisas com meios artificiais terem iniciado com a mistura de componentes a partir da concentração de componentes encontrados no plasma do peixe como guia; Isom e Hudson (1982) também reportaram êxito utilizando meios de culturas celulares disponíveis comercialmente (Eagles e meio M 199), meios estes que contem praticamente todos os aminoácidos em concentrações tão altas ou até maiores que aquelas encontradas no plasma do peixe.

Heard e Hendrix (1964) constataram que o fechamento da valva em três espécies de Lampsilinae era afetado pelo sangue e por aminoácidos de várias espécies de peixes. Young e Williams (1984b) observaram que o movimento de abertura e fechamento das valvas dos gloquídeos de *M. margaritifera* aumentava consideravelmente quando estes eram postos em contato com o muco, sangue, brânquias ou tecido das nadadeiras do seu hospedeiro, a truta marrom, *Salmo trutta*. O meio original foi elaborado a partir de uma solução de Ringer para Unionídeos com os aminoácidos essenciais e não-essenciais de Eagles contendo NaHCO_3 para o controle do pH, vitaminas, antibióticos, e glicose como a porção artificial, e o plasma do peixe como fonte natural de

proteína, em uma relação final de dois terços de meio artificial para um terço de plasma (Isom e Hudson, 1982). Outras formulações foram testadas por Hudson e Shelbourne (1990) em um esforço para melhorar os resultados em mais espécies de bivalves, resultando em uma comparação de 64 combinações de diferentes meios. Keller e Zam (1990) reportaram a transformação de gloquídeos em juvenis em um meio de cultura *in vitro* que incluía apenas soro. Hudson e Shelbourne (1990) mostraram que a taxa de transformação para os gloquídeos aumentou com a inclusão do plasma do peixe. Hudson e Isom (1984) relataram a importância de adicionar plasma de peixe a um meio artificial, assim como demonstraram que a transformação dos gloquídeos poderia ocorrer em um meio artificial com o plasma de espécies de peixes não confirmadas como hospedeira. Uthaiwan *et al.* (2001, 2002, 2003) desenvolveram uma técnica simples de cultura de gloquídeos em meio artificial, que resultou em uma alta taxa de metamorfose, trabalhando com *Hyriopsis myersiana*. Resultados semelhantes foram obtidos com a espécie européia *Anodonta cygnea*, que apresentaram uma sobrevivência larval de 34,3%, enquanto que a proporção de larvas que sofreram metamorfose foi de 60,8% (Lima *et al.*, 2006).

O trabalho de Tankersley (2000) indica que os níveis de lipídios nos gloquídeos e juvenis variam conforme cada *pool* de reprodutores, sendo, portanto, influenciado pelo estado nutricional parental. Além disso, ele indica que o tipo do meio de cultura utilizado no cultivo *in vitro* influencia o conteúdo lipídico dos gloquídeos e subseqüentes juvenis. Em *Utterbackia imbecillis*, Fisher e Dimock (2006) encontraram que as larvas aderidas ao peixe

hospedeiro acumularam lipídios e glicogênio nas células do manto larval, enquanto que as larvas cultivadas *in vitro* não apresentaram este acúmulo.

Os projetos de recuperação para as espécies de bivalves em perigo recomendam a propagação e a reintrodução como forma de conservar as populações (Mummert, 2006). Devido à complexidade do ciclo de vida das náíades, o cultivo artificial (*in vitro*) poderia oferecer meios de contornar os obstáculos presentes no ciclo de vida natural desses animais, contribuindo desta forma para a manutenção da biodiversidade nos ambientes límnicos.

OBJETIVOS

No Brasil, a fauna de bivalves indígenas vem sofrendo, atualmente, impactos antropogênicos e competições interespecíficas devido à invasão das espécies exóticas, *Corbicula fluminea* e *Limnoperna fortunei*. Tais bivalves, de origem asiática, competem tanto pelo habitat como pelo alimento. Além disso, seus mecanismos reprodutivos, que não envolvem uma espécie hospedeira e são contínuos ao longo do ano, favorecem as espécies invasoras em detrimento das nativas.

Com a finalidade de propagar as espécies que estão em perigo de extinção, pretende-se desenvolver técnicas viáveis para a obtenção de formas juvenis em laboratório, através do cultivo artificial (*in vitro*) dos gloquídeos, denominação das formas larvais, do gênero *Diplodon*. Concluída esta etapa, estaremos fornecendo à comunidade científica parâmetros para futuras pesquisas voltadas para ações preservacionistas, em uma tentativa de reconstituir a fauna de bivalves característica de cada uma das bacias hidrográficas.

Para alcançar o objetivo de realizar a reprodução *in vitro* das náíades do gênero *Diplodon*, foram levantadas as seguintes hipóteses:

- 1) H_0 : a manutenção dos bivalves adultos do gênero *Diplodon* em laboratório não interfere na liberação das larvas gloquidiais.
- 2) H_0 : a viabilidade dos gloquídeos, em laboratório, antes do processo de encistamento no peixe hospedeiro é maior se o muco for removido.

- 3) H_0 : existe uma especificidade entre a espécie de bivalve e o hospedeiro.
- 4) H_0 : os gloquídeos sofrem metamorfose quando incubados em meio artificial, assim como quando colocados artificialmente na presença dos peixes hospedeiros.
- 5) H_0 : a substituição da fonte protéica do meio de cultura artificial, plasma de peixe por extrato liofilizado de peixe, fornece um meio adequado para que ocorra o desenvolvimento e metamorfose dos gloquídeos.
- 6) H_0 : é possível cultivar os juvenis do gênero *Diplodon* obtidos através do cultivo *in vitro* dos gloquídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Fases da Pesquisa

A figura 3 ilustra as etapas da pesquisa. A primeira fase, a definição do local de coleta, consistiu de várias coletas preliminares nos rios próximos a Ribeirão Preto, com o objetivo de identificar uma população de bivalves que fosse de fácil acesso e de bom tamanho. Após a definição do local de estudo passou-se a realizar um levantamento bibliográfico sobre a região, assim como sobre as citações sobre a ocorrência das espécies do gênero *Diplodon*.

A partir deste ponto, durante a segunda fase, a pesquisa apresentou duas vertentes: uma priorizando a identificação dos espécimes adultos, e outra voltada para a propagação das espécies em laboratório.

Para a identificação dos exemplares coletados foram buscados os trabalhos com as descrições originais das espécies, criando-se, desta forma, um banco de dados com a literatura consultada, porém nem sempre citada.

Devido à falta de informação sobre o grupo de estudo, tanto bioecológica como para o manejo destes bivalves em laboratório, na América do Sul, foi necessário desenvolver um protocolo com novas metodologias para lograr o êxito na reprodução deste grupo sob condições artificiais. Com esta informação em mente, a metodologia foi sistematizada de uma forma cronológica. Nem todas as variáveis testadas puderam ser aplicadas simultaneamente. Com a finalidade de obter um protocolo, sempre o tratamento que resultava em maior êxito, e que fornecia a melhor sobrevivência dos semaforantes, era mantido. Não sendo assim possível verificar as interações entre as variáveis simultaneamente.

Em uma última etapa, foram gerados os resultados, representados por gráficos, tabelas e imagens, bem como a interpretação dos mesmos, com a finalidade de agregar um pouco mais de conhecimento sobre a fauna de bivalves límnicos da família Hyriidae do Estado de São Paulo.

Figura 3. Fases da pesquisa e etapas do trabalho.

2. Coleta

Com o objetivo de localizar uma comunidade de bivalves estabelecida foi realizada uma série de coletas preliminares nos rios Mogi Guaçu, Pardo e Sapucaí, em um reservatório e em um lago. As coordenadas dos pontos de coleta estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Localidades e coordenadas onde foram realizadas as coletas dos bivalves.

LOCALIDADE	MUNICÍPIO	COORDENADAS
rio Mogi Guaçu	Pirassununga	21°55'14,4" S e 47°23'05,1" W
		21°55'39,1" S e 47°22'44,0" W
		21°55'41,3" S e 47°22'31,3" W
		21°55'41,3" S e 47°22'22,1" W
	Luiz Antonio	21°36'45,2" S e 47°49'09,6" W
	Porto Ferreira*	21°50'36,1" S e 47°29'44,5" W
		21°49'62,1" S e 47°30'06,1" W
córrego Beija Flor	Luiz Antonio	21°36'54,1" S e 47°48'52,4" W
		21°36'50,1" S e 47°49'01,2" W
rio Pardo	Serrana	21°10'44,9" S e 47°34'30,5" W
	Jardinópolis	21°04'02,4" S e 47°49'27,2" W
	Ribeirão Preto	21°07' S e 47°45' W
rio Sapucaí	São Joaquim da Barra	20°31'34,8" S e 47°49'42,9" W
Reservatório Galo Bravo	Ribeirão Preto	21°07'06,9" S e 47°49'32,1" W
Lago Monte Alegre (USP)		21°11' S e 47°43' W

* coordenadas onde o estudo foi realizado

As coletas foram realizadas com permissão concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (# 10207/2007).

Dos pontos amostrados foi escolhido como local de estudo o rio Mogi Guaçu, no município de Porto Ferreira, estado de São Paulo, Brasil.

No local de coleta foram realizadas as medidas dos fatores abióticos: condutividade da água com auxílio de um Condutivímetro – YSI Model 30 Handheld Salinity, Conductivity e Temperature System; Oxigênio dissolvido e Temperatura com o auxílio de um oxímetro YSI Model 52 D.O. Meter; e turbidez com auxílio de um Turbidímetro portátil modelo 2100P. Os dados sobre a vazão do rio Mogi Guaçu, no ponto de coleta, foram extraídos do banco de dados da Agência Nacional das Águas (ANA).

Os bivalves foram coletados tateando o fundo do rio com as mãos e pés, e quando necessário com auxílio de equipamento de mergulho uma vez que, vivem enterrados no sedimento e existe uma grande variação da coluna de água do rio principalmente nas épocas de intensa precipitação.

Os espécimes coletados foram acondicionados, individualmente, em frascos com boca larga de 200 ml, colocados em uma caixa térmica com gelo e transportados para o Laboratório de Malacologia, do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP (figura 4), onde foram mantidos vivos, individualmente, em aquários a uma temperatura constante. Em um primeiro momento, devido a falta de equipamento apropriado para a aclimação dos animais, a temperatura variou entre 22 °C e 26 °C, porém após a melhoria do sistema de ar condicionado foi possível manter uma temperatura de 20 °C.

Figura 4. Metodologia para transporte dos espécimes coletados.

3. Identificação

A triagem de todo o material coletado foi feita em laboratório; alguns exemplares foram fixados em álcool a 70 % (concha e partes moles) enquanto para outros, apenas a concha foi preservada. Todos os animais foram medidos e fotografados e, quando possível, identificados até o nível de espécie utilizando como referência os trabalhos de Ortmann (1921), Mansur et al. (1987) e Simone (2006).

A identificação do material coletado foi feita, primeiramente, separando os bivalves por caracteres conquiliológicos, isto é, morfologia e formato da concha, escultura externa e escultura umbonal (figura 5).

Figura 5. Diagrama das características externas da concha de um bivalve de água doce hipotético. Legenda: **am**, margem anterior; **b**, bico (umbo); **bs**, escultura umbonal; **d**, disco; **dm**, margem dorsal; **gl**, linhas de crescimento; **pm**, margem posterior; **pr**, costela posterior; **ps**, depressão posterior; **rm**, linhas de crescimento; **ss**, escultura da concha; **vm**, margem ventral; **w**, asa. Modificado de McMichael e Hiscock (1958).

Em uma segunda etapa, alguns exemplares foram dissecados para observação de algumas características anatômicas macroscópicas, tais como a abertura inalante e exalante, brânquias e palpos.

A identificação dos espécimes, coletados no rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, foi confirmada através de visitas ao acervo malacológico do Museu de Zoologia (MZUSP), sob supervisão do Prof. Dr. Luiz Ricardo Lopes Simone, e consulta ao acervo do projeto BIOTA/FAPESP existente no laboratório de Malacologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Os espécimes devidamente identificados serão depositados no Museu de Zoologia (MZUSP) e na coleção da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

4. Propagação de bivalves em laboratório

4.1. Produção de fitoplâncton

4.1.1. Isolamento de cepas de microalgas

Amostras do fitoplâncton foram coletadas no rio Mogi-Guaçu (21°50'36,10" S e 47°29'44,5" W), no Reservatório Galo Bravo (21°07'06,9" S, 47°49'32,1" W) e no Lago Monte Alegre, no Campus de Ribeirão Preto/USP, com o auxílio de uma rede de plâncton de malha de 30 µm de diâmetro. As amostras foram colocadas em meio de cultivo com finalidade de identificar a composição fitoplanctônica e assim selecionar possíveis espécies passíveis de cultivo e que fizessem parte da dieta alimentar dos bivalves. Através de diluições repetidas e com auxílio de uma micropipeta foram selecionadas as cepas para cultivo dos seguintes gêneros: *Chlamydomonas* sp, *Chaetoceros*

sp, *Monoraphium* sp, *Chlorella* sp, *Nitzschia* sp, *Phaeodactylum* sp e *Scenedesmus* sp.

As cepas das espécies de microalgas foram repicadas a cada 4-5 dias, sempre respeitando a concentração inicial de 1/5 de inoculo para o volume final (por exemplo, 1 litro de inoculo/4 litros de meio de cultivo). O meio de cultivo utilizado para a manutenção das cepas foi autoclavado (20 minutos a 120 °C) antes de ser utilizado, enquanto que o meio de cultivo da produção massiva (volume > 5 litros) não sofreu nenhum tratamento.

4.1.2. Meio de cultura para cultivo de microalga

Foram testados dois fertilizantes, como meio de cultivo: esterco bovino e um inorgânico (NPK), (fertilizante agrícola Sempre Verde®, doado pela empresa Bonigo Ltda), com concentrações de nitrogênio: fósforo: potássio de 12:6:6.

O meio de cultivo orgânico foi preparado utilizando o esterco seco e curtido. Este foi peneirado utilizando uma malha de 125 µm, e colocado em uma estufa a 80 °C durante 24 horas. Após este período o esterco era diluído em água destilada (45 gramas de esterco/ 5 litros de água) e submetido à aeração constante durante 24 horas. O meio de cultivo, então, era filtrado em malha de 100 µm de abertura e utilizado para o cultivo das microalgas.

O meio de cultivo enriquecido com adubo inorgânico foi elaborado em diferentes diluições com água destilada: 0,5/200; 1/200; 5/200; 10/200 e 20/200 (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações (g/ml) de fósforo, potássio e nitrogênio em cada diluição testada para o cultivo de fitoplâncton.

Proporção	Concentração (g/ml)		
	N	P	K
0,5/200	$0,18 \times 10^{-4}$	$0,09 \times 10^{-4}$	$0,09 \times 10^{-4}$
1/200	$0,36 \times 10^{-4}$	$0,18 \times 10^{-4}$	$0,18 \times 10^{-4}$
5/200	$1,8 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$
10/200	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$
20/200	$7,2 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$

Legenda: **N**, nitrogênio; **P**, fósforo; **K**, potássio.

Após o preparo do meio de cultivo, foi adicionada cepa de microalgas na quantidade de 20 ml em erlenmeyer de 250 ml. Os cultivos permaneceram expostos à luz fluorescente (04 lâmpadas luz branca 36 W), ininterrupta, com aeração constante.

As análises das culturas foram realizadas diariamente, durante oito dias, sendo retirada uma alíquota de 5 ml de cada cultivo e adicionada uma gota de lugol (4 %) com objetivo de fixar as microalgas. Para cada alíquota foram feitas oito leituras, utilizando-se um hematocímetro com câmara de Neubauer. O resultado diário da densidade celular foi determinado pela média aritmética das oito contagens celulares, obtidas através da fórmula:

$$DC = cel \times 10^4 \times \text{Fator de Diluição},$$

onde **DC** corresponde a densidade celular (células/mililitro) e **cel** corresponde ao número de células contadas.

Os valores de densidade celular para cada tratamento foram comparados através do período experimental de oito dias por uma Análise de Variância (ANOVA), seguida por um teste de Tukey, a um nível de significância de 95%. As transformações matemáticas, quando necessárias, e a ANOVA foram feitas com o programa Statistica (StatSoft, Inc., 1998).

4.1.3. Manutenção da microalga

A manutenção do cultivo de microalgas foi feita em frascos de 10 (dez) litros, mantidos em sala climatizada com temperatura de 20 °C, com aeração e intensidade luminosa constante (04 lâmpadas fluorescentes luz branca 36 W), sem fotoperíodo, em condições não axênicas (figura 6). As cepas das algas foram repicadas a cada 07 dias tendo sido utilizado o fertilizante inorgânico, com concentrações de nitrogênio: fósforo: potássio de 12:6:6, em uma proporção de 1/200.

Figura 6. Manutenção das cepas de microalgas, com luminosidade e aeração constante.

Foram mantidas colônias fitoplanctônicas em crescimento das espécies *Chlamydomonas* sp, originária do rio Mogi Guaçu e isolada em laboratório; e *Ankistrodesmus* sp, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Sonia Helena Sipaubá, do CAUNESP/UNESP, Jaboticabal, e cultivada segundo a metodologia já descrita.

4.2. Manutenção dos bivalves adultos em laboratório

4.2.1. Experimentos preliminares

Para desenvolver uma metodologia para a manutenção dos bivalves adultos em laboratório foi utilizada a espécie *A. trapesialis*, que habita lagos e tanques em abundância, não ocasionando, desta forma, aumento da pressão já existente sobre as espécies ameaçadas do gênero *Diplodon*.

Espécimes de *A. trapesialis* foram coletados na região marginal da lagoa do Galo Bravo (21°07'06,9" S e 47°49'32,1" W), no município de Ribeirão Preto, SP. Os espécimes foram acondicionados em uma caixa térmica, com água do local suficiente para cobri-los, e transportados ao laboratório de Malacologia, do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP.

Os bivalves foram submetidos a dois tratamentos. Um grupo (N=50) foi colocado em bolsas de nylon com 32x28 cm (abertura da malha de 10x3 mm), com três animais cada. As bolsas foram mantidas suspensas em uma caixa de fibro-cimento de 250 l com água da mina e aeração constante. Outro grupo (N=50) foi colocado em outra caixa de fibro-cimento de 250 l, com uma camada de 10 cm de sedimento (areia fina) (figura 7).

Figura 7. Esquema da unidade de manutenção, onde os espécimes de *Anodontites trapesialis* foram mantidos suspensos e enterrados. Foto com detalhe da bolsa de nylon com dois indivíduos

Diariamente foi oferecida uma dieta de microalgas (*Chlamydomonas* sp) *ad libitum*, e semanalmente era efetuada a troca total da água das caixas. Mensalmente os animais foram retirados da água e pesados, em uma balança eletrônica Gehaka BG 400, com precisão de 0.01 g.

Na análise estatística, a mortalidade dos dois grupos foi comparada pelo teste qui-quadrado de Pearson. Para avaliar o crescimento, em peso, foi utilizado um modelo ANOVA com medidas repetidas considerando dois fatores: grupo com 2 níveis (enterrado e suspenso) e momento de avaliação com 5 níveis (inicial, 1º, 2º, 3º e 4º mês). As comparações entre grupos e intra-grupo foram avaliadas por contrastes ortogonais. O nível de significância adotado foi 0,05. O programa estatístico utilizado foi o SAS, versão 9.0.

4.2.2. Manutenção dos bivalves coletados do gênero *Diplodon*

Os exemplares transportados para o laboratório que não liberaram gloquídeos, após cinco dias, foram suspensos em bolsas de nylon com 32x28

cm (abertura da malha de 10x3 mm), com dois animais cada, em intervalos de 15 cm entre as bolsas, a 50 cm do fundo da unidade de manutenção. A unidade consiste de uma caixa de fibro-cimento de 250 litros, com um sistema de fluxo contínuo de água (fluxo médio de 10,0 L/min), localizada em um ambiente com temperatura constante (20 °C) e um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Para promover a suspensão das algas fitoplanctônicas na coluna de água foram usados dois difusores de ar de 5,0 cm.

Os bivalves foram alimentados com as algas verdes unicelulares *Chlamydomonas* sp e *Ankistrodesmus* sp (na proporção 1:1), em uma densidade de 400.000 células/ml, uma vez ao dia, e mensalmente a água foi trocada e os animais limpos. A escolha em utilizar estas espécies de microalgas foi devido a seu fácil manejo e crescimento rápido em nosso laboratório. Além disso, ambas apresentam um tamanho apropriado para larvas e adultos.

A água utilizada para o cultivo de fitoplâncton e para a unidade de manutenção deriva de um sistema de minas do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

4.3. Obtenção dos gloquídeos

4.3.1. Liberação

Os animais, recém coletados e previamente aclimatados, foram acondicionados, ainda individualmente, em um aquário de 50 l, com água da mina e aeração constante, em temperatura ambiente de 20 °C (figura 8). Quando observada a eliminação das larvas os animais foram separados e os gloquídeos eliminados, envolvidos em muco, foram retirados com o auxílio de

uma pipeta, colocados em Becker de 100 ml para posterior utilização. Os animais que liberaram as larvas foram preservados em álcool a 70 %, para correta identificação e aqueles que não estavam grávidos, foram mantidos no laboratório e posteriormente devolvidos ao local de coleta.

Figura 8. Acondicionamento dos animais recém coletados, individualmente, para a observação da eliminação e coleta dos gloquídeos.

4.3.2. Viabilidade dos gloquídeos

A viabilidade dos gloquídeos foi testada, utilizando-se uma solução de cloreto de sódio em uma sub-amostra de gloquídeos de cada tratamento (Lefevre e Curtis, 1912). Os gloquídeos quando viáveis ficam posicionados com as valvas abertas, porém quando expostos a uma solução salina contraem o músculo adutor fechando suas valvas. A partir da sub-amostra, uma contagem inicial de 25 gloquídeos foi feita. Após a adição da solução salina, e após 10-20 segundos, os 25 gloquídeos foram recontados e o número de indivíduos abertos e fechados anotados. Os animais que permaneceram abertos após a adição do cloreto de sódio foram considerados como sendo funcionalmente mortos.

A sobrevivência dos gloquídeos (vivo/morto) foi modelada por uma análise de regressão logística, não sendo necessária nenhuma correlação, pois novos gloquídeos foram usados em cada amostragem (Zimmerman e Neves,

2002). Três réplicas, em Becker de 100 ml, foram usadas para cada temperatura e para cada tratamento dos gloquídeos.

Os gloquídeos de cada tratamento foram submetidos a diferentes temperaturas: em uma incubadora a 18 °C, em uma sala com temperatura controlada a 22 °C e em temperatura ambiente 25 ± 1 °C.

Os modos de exposição incluíram um tratamento com muco, no qual os gloquídeos foram utilizados diretamente após a liberação natural; e um tratamento sem muco, que se refere àqueles gloquídeos que foram expelidos e depois processados para a retirada do muco.

Um dos processos utilizados foi a lavagem dos gloquídeos recém coletados, através de cuidadosas e repetidas trocas da água do Becker. Foram utilizadas água da mina autoclavada, água destilada e água deionizada. Outro processo foi realizar esta lavagem sobre uma rede de nylon com abertura de malha de 50 µm. Como tratamento final, os gloquídeos eram lavados com uma solução de antibiótico e fungicida da Invitrogen® (Cod. prod. 15240-062).

4.3.3. Conquiliometria dos Gloquídeos

Para a medição dos gloquídeos, após a separação do muco através de repetidas lavagens com água destilada, foram preparadas lâminas permanentes segundo metodologia de Mansur e Campos-Velho (1990), que consiste em eliminar os tecidos do gloquídeo com oito gotas de hipoclorito de sódio comercial 5 % NaOC para 10 ml de água destilada durante cinco minutos após o que o material era lavado com trocas sucessivas de água destilada.

Após desidratar rapidamente por uma série de álcool etílico de 50 %, 60%, 70 %, 80 %, 90 % até 96 %, o material foi submetido a dois banhos de

álcool isopropílico, e finalmente as valvas foram pipetadas sobre laminas e montadas com Entelan e cobertas com lamínulas.

Os gloquídeos foram observados e fotografados. O procedimento de captura de imagem foi realizado no Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas, do Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, utilizando-se um sistema constituído por uma câmera digital colorida da Leica (DFC300 FX) conectada a um microscópio de (DM 5000 B, Leica Microsytems – Alemanha) e a um computador. O programa Q-Win (Leica Microsytems – Alemanha) foi utilizado para medir os gloquídeos. As medidas foram feitas segundo Bonetto (1959b), onde são traçados transectos sobre a imagem dos gloquídeos a fim de medir o comprimento maior, a altura, o comprimento da linha dorsal, o deslocamento da ponta ventral em relação ao centro da linha dorsal, e o ângulo de obliquidade. Este último é a medida entre a reta que une a ponta ventral ao meio da linha dorsal e a perpendicular que sai desta linha em direção a ponta ventral (figura 9). Utilizaram-se 40 gloquídeos de cada fêmea desovada.

Figura 9. Conquiliometria da valva gloquidial. Legenda: **a**, altura; **a°**, ângulo; **b**, borda; **c**, comprimento; **cld**, comprimento da linha dorsal; **dg**, dente gloquidial; **dpv**, deslocamento da ponta ventral; **pv**, ponta ventral. Modificado de Mansur e Campos-Velho (1990).

4.4. Cultivo “in vivo” de gloquídeos

Como os gloquídeos são parasitas de peixes, experimentos de laboratório foram realizados no sentido de encontrar hospedeiros potencialmente passíveis de serem infestados pelas larvas das espécies dos bivalves coletados, do gênero *Diplodon*. A maioria dos peixes foi coletada no rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, São Paulo, Brasil. São elas: *Astyanax altiparanae*, *Gymnotos* sp, *Randia queli*, *Hyphessobrycon eques*, *Cheirodon* sp, *Geophagus brasiliensis*, *Poecilia* sp e *Papiliochrommis ramirezi*. Também foi utilizada a espécie exótica *Oreochromis niloticus*. O tamanho dos exemplares de peixes variou entre 3 a 7 cm.

Os gloquídeos liberados naturalmente foram removidos com uma pipeta e lavados para a retirada do muco e outros resíduos.

A infestação artificial foi feita utilizando, quando possível, três peixes de cada espécie. Para tal, foram colocados em contato com os peixes cerca de 200 gloquídeos/peixe em aquários medindo (40,00 x 20,00 x 15,00 cm) com 10 l de água de mina, devidamente arejado, em temperatura ambiente controlada de 20, 22 e 24 °C (figura 10). A cada dois dias o fundo do aquário era sifonado para detectar a presença de juvenis, sendo feita a troca de 2/3 da água do aquário, e os peixes eram alimentados com ração comercial.

Figura 10. Infestação artificial dos peixes, *Astyanax altiparanae*, com gloquídeos do gênero *Diplodon* (cultivo *in vivo*).

4.5. Cultivo “in vitro” de gloquídeos

4.5.1. meio cultura (M 199 + antibiótico/fungicida)

Para fazer 1 litro de solução de meio de cultura M 199, um pacote de M 199 em pó (Invitrogen[®], Cod. prod. 31100-035) foi colocado em um Becker de 1 litro com água deionizada em um agitador. Foram adicionadas dois gramas de NaHCO₃ e o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,8, valor encontrado no ponto de coleta dos bivalves, utilizando NaOH 1,25 M ou HCl 1 M (Keller e Zam, 1990). Depois do pH ajustado, a solução foi filtrada, com filtro de celulose de 0,45 e 0,22 µm, respectivamente. A solução é viável por semanas, desde que mantida sob refrigeração (6-8 °C) e condições assépticas.

Nos experimentos da temporada de 2008, foi adicionada ao meio de cultura, antes da filtragem, uma solução tampão de HEPES em uma concentração de 5960 mg/l, pois sua utilização elimina a necessidade de uma atmosfera enriquecida com CO₂ (Prof. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, comunicação pessoal). Porém, em 2009, após um intercâmbio com pesquisadores norte americanos, o HEPES foi abolido da formulação, pois segundo Lee e Mora (2005) e Owen *et al.* (2009) esta solução tampão tem um efeito tóxico sobre os gloquídeos.

Foi utilizada uma combinação de antibiótico e fungicida, para inibir a contaminação dos cultivos, da Invitrogen[®], listada na tabela 3. A solução foi congelada em alíquotas de 2 ml, e somente a quantidade necessária era descongelada na hora da sua utilização.

Tabela 3. Combinação de antibiótico e fungicida na formulação do produto da Invitrogen (Cod. prod. 15240-062).

Composto	Concentração (µg/ml)
<i>Antibióticos</i>	
Penicilina G (UI)	10000
Sulfato de estreptomicina	10000
<i>Antimicóticos</i>	
Anfotericina B	25

4.5.2. Fonte protéica

4.5.2.1. Plasma de peixe

Foram testados plasmas de espécimes de peixes de ocorrência no local de coleta dos bivalves e de espécies exóticas. As espécies *Oreochromis* sp, *Colossoma* sp e *Cyprinus* sp foram gentilmente cedidas pelo CAUNESP/UNESP de Jaboticabal, através do Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes. Os espécimes de ocorrência regional, *Astyanax altiparanae*, foram adquiridos em uma loja que comercializa iscas vivas.

Para obtenção do plasma, o sangue dos peixes foi retirado com auxílio de uma seringa com agulha nº 22 (0,70x25), da veia caudal, e colocado em tubos, previamente lavados com heparina sódica (2000 UI). O sangue foi transportado em caixas térmicas com gelo até o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, onde foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, depois passado para outro tubo e

centrifugado novamente a 3000 rpm por 10 minutos. A porção do plasma foi separada e filtrada em filtro de celulose de 0,45 e 0,22 μm , respectivamente, sendo congelada para utilização posterior.

4.5.2.2. Extrato liofilizado de peixe

Foram macerados três espécimes de *A. altiparanae* (tamanho médio de 5 cm). Posteriormente o material foi liofilizado a -40°C , e guardado para uso posterior em refrigerador ($6-8^{\circ}\text{C}$). Uma alíquota de 0,6 mg do material liofilizado (0,3 % do extrato liofilizado de peixe após a filtragem) foi ressuscitado em 1000 ml de água deionizada e agitada em vortex por 4 horas. A suspensão foi filtrada em filtro de celulose de 0,45 e 0,22 μm , respectivamente, e guardada no refrigerador até seu uso.

4.5.2.3. Plasma bovino

O sangue de boi, oriundo do frigorífico Oranges (Município de Sertãozinho, SP), foi colocado em frascos previamente lavados com uma solução de heparina sódica. O sangue foi transportado em caixas térmicas com gelo até o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, onde foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, depois passado para outro tubo e centrifugado novamente a 4000 rpm por 10 minutos. A porção do plasma foi separada e filtrada em filtro de celulose de 0,45 e 0,22 μm , respectivamente, sendo congelada para utilização posterior.

4.5.3. Cultivo dos gloquídeos

Os gloquídeos foram separados do muco através de repetidas lavagens com água destilada e sua viabilidade foi testada sob microscopia ótica (100x),

pela observação da abertura/fechamento das valvas. Cerca de 50-100 gloquídeos foram colocados em placas de Petri (60 X 15 mm), sob condições estéreis, com meio de cultivo constituído de solução M 199 (Sigma®), fonte protéica e antibiótico/antimicótico, na proporção de 2:1:0,5.

As placas de Petri foram mantidas em incubadora (figura 11) com temperatura controlada até a transformação em juvenis (observação da distensão do pé para fora da concha é um indicador), com uma troca do meio de cultivo a cada 06 dias, e adição de 1 ml de água destilada 24 horas antes da metamorfose (Uthaiwan et al., 2002, 2003; Lima et al, 2006). Foram feitos experimentos nas temperaturas de 18, 20 e 23 °C.

Figura 11. Manutenção dos gloquídeos, em incubadora, com o meio de cultura artificial com M 199, fonte protéica e antibióticos/antimicóticos (cultivo *in vitro*).

Quando possível foi utilizado um arranjo completamente aleatório entre os tratamentos e oito réplicas foram utilizadas. A análise dos dados foi feita usando uma Análise de Variância (ANOVA), seguido por um teste de Tukey, a um nível de significância de 95%. As transformações matemáticas, quando necessárias, e a ANOVA foram feitas com o programa Statistica (StatSoft, Inc., 1998).

4.6. Cultivo de juvenis

Após a metamorfose dos gloquídeos, incubados por 18-22 dias, os juvenis recém metamorfoseados foram removidos do meio de cultura, lavados com uma mistura de água da mina autoclavada e M 199, e submetidos a diversos tratamentos em placas de Petri (60x15 mm) e Beckers, de 150 ml, com aeração (figura 12).

Figura 12. Cultivo de juvenis do gênero *Diplodon*. À esquerda em placas de Petri, e à direita em Becker com aeração.

Os juvenis foram mantidos em água da mina autoclavada, sem receber uma complementação alimentar; com adição de 15.000 células/ml da microalga *Chlamydomonas* sp em dias alternados; com uma camada de 1 mm de sedimento arenoso fino (partículas < 125 μ m); e em um último tratamento, com o sedimento e alimento.

Em dias alternados, os juvenis eram observados em lupa estereoscópica, os indivíduos mortos eram retirados e contados. A porcentagem de sobrevivência dos juvenis foi transformada matematicamente e os tratamentos foram comparados através de um test T.

4.6.1. Juvenis pós-metamórficos

Os juvenis recém metamorfoseados foram submetidos aos tratamentos, citados acima, imediatamente após a metamorfose. O número de indivíduos em cada tratamento foi estipulado dividindo-se o número total de juvenis metamorfoseados (cultivo *in vivo* e *in vitro*) pelo número de tratamentos. Quando houve pouca disponibilidade de juvenis metamorfoseados, foi testado apenas um tratamento (alimento ou sedimento, placa de Petri ou Becker) de cada vez, com cada lote.

4.6.2. Juvenis com 5 dias

Nas liberações subseqüentes de gloquídeos, foi mantido o tratamento que apresentou a maior taxa de sobrevivência anterior e após cinco dias os tratamentos foram repetidos (adição de alimento, presença de sedimento e tipo de recipiente).

4.6.3. Juvenis com 15 dias

Idem item anterior, porém iniciando os tratamentos após 15 dias.

4.6.4. Juvenis com 30 dias ou mais

Os juvenis com 30 dias foram mantidos em Becker, de 150 ml, com 1 mm de sedimento arenoso, com aeração constante, fotoperíodo natural e temperatura de 20 °C. A cada dois dias foi feita a troca de 2/3 da água do Becker, com a adição de microalga.

A concentração do alimento variou de 15.000 a 90.000 células/ml, conforme os juvenis foram crescendo. A partir dos 60 dias acrescentou-se à dieta a espécie *Ankistrodesmus* sp, oferecida na proporção de 1:1 com a outra microalga.

O rio Mogi Guaçu nasce no município de Bom Repouso (22°28'15" S, 46°8'42" W), ao sul do Estado de Minas Gerais, Brasil, e sua bacia hidrográfica possui uma área de drenagem total de 18938 km² (CORHI, 1999). Sua nascente esta localizada no Monte Curvado, 1700 metros acima do mar. Seu curso tem 473 km de extensão, percorrendo 95,5 km no Estado de Minas Gerais, através de uma garganta na Serra da Mantiqueira, a uma altitude média de 825 metros acima do mar. Para posteriormente percorrer mais 377,5 km no Estado de São Paulo, desaguando no rio Pardo, a 490 metros acima do mar, no município de Pontal (21°1'22" S, 48°2'13" W). Seus principais afluentes pela margem direita são os rios: Onça, Itupeva, Claro e Jaguari Mirim; pela margem esquerda, os rios: Eleutério, do Peixe, do Roque, Bonito, Araras e Mogi Mirim.

O compartimento com maior densidade de área de drenagem é o do rio do Peixe, seguido do compartimento do rio Jaguari Mirim, ambos localizados nas partes altas em áreas de relevo ondulado a forte ondulado do Planalto Atlântico. A menor densidade de área de drenagem é justamente na área do compartimento Baixo Mogi, região de relevo suave ondulado na sua maioria, intensamente utilizado para a agricultura.

O ponto de coleta escolhido apresenta suas margens, em parte preservadas, porém, em sua grande maioria bem degradada com a colocação de pneus, canos de PVC de deságües clandestinos e lixo (figura 14).

Figura 14. Local onde foram realizadas as coletas (rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, SP, 21°50'36,1" S e 47°29'44,5" W). As fotos **A** e **B** foram tiradas na época de seca, e as fotos **C** e **D** em época de chuva.

1.2. Ação Antrópica na bacia Mogiana:

Chegada do Tupi-Guarani na Bacia Mogiana, entre os séculos XVI-XVII, principalmente, na região de Cachoeira de Emas, onde permaneceu até por volta de 1880.

O primeiro mapeamento do rio Mogi Guaçu data de 1766 e o documento original se encontra no MZUSP, em São Paulo. O segundo mapeamento do Mogi é do ano de 1773 e o documento original se encontra no Arquivo Histórico Colonial, Torre do Tombo, Lisboa, Portugal.

A região de Pirassununga começou a ser povoada, pelos pioneiros brancos, a partir de 1809. No início da ocupação, a região apresentava uma cobertura vegetal de 2/3 de mata atlântica e 1/3 de campo cerrado. No ano de

1999, com cerca de 65000 habitantes na região, restaram apenas 1/3 da cobertura vegetal original.

Desde o século XIX, o cultivo de café na região impulsionou as derrubadas das matas nativas. Em 1878, ocorre a chegada da estrada de ferro e com isso novas derrubadas de matas (para a lenha como combustível da locomotiva, dormentes, assentamento dos trilhos, etc.),

A partir de 1883 e até 1917, em um trecho de 200 km, entre Porto Ferreira e Pontal, na foz do Mogi Guaçu, começou a haver navegação fluvial. Ao longo desse trecho foram construídos 15 portos fluviais, chegando a existir, no auge da sua atividade, 11 vapores e 54 chatas para o transporte de passageiros e de cargas de mercadorias.

Na atualidade, o rio Mogi Guaçu está caracterizado pela ausência de atividade de indústria e mineração capaz de alterar a dinâmica hidrossedimentológica. Porém sua mata ciliar se encontra comprometida com a alocação irregular de ranchos (Neves, 2005).

1.3. Fatores abióticos

Os parâmetros abióticos medidos, condutividade, temperatura, oxigênio dissolvido e turbidez, mostram uma variação bem marcada dependendo da época do ano (anexo B). Sendo possível visualizar o período das cheias, não somente pelo aumento da vazão do rio (figura 15).

Figura 15. Representação gráfica da variação dos parâmetros abióticos entre outubro/2007 a outubro/2008. Os valores referentes à vazão do rio correspondem a uma média de 10 anos (1996 a 2006).

1.4. Ocorrência do gênero *Diplodon* no rio Mogi Guaçu

Ihering (1893) descreveu a ocorrência de *D. fontainianus*, *D. caipira* e *D. paulista*, em Piracicaba; e *D. martensi* no Estado de São Paulo, porém sem precisar qual bacia hidrográfica. Também descreveu uma nova espécie, *D. greeffeanus*, na localidade tipo de Campinas e Piracicaba. Simpson (1914) descreveu *D. trivialis* para a região de Jaboticabal. Para a mesma localidade, Ortmann (1921) descreveu uma nova espécie, *D. mogymirim*.

Ortmann (1921) estendeu a ocorrência de *D. paulista* e *D. fontainianus* para as bacias hidrográficas do norte do Estado de São Paulo.

Bonetto (1959, 1961) estudando os espécimes de *Diplodon* da mesma bacia na região de Pirassununga, SP, encontrou as mesmas espécies citadas por Ortmann e estendeu a distribuição de *D. expansus* (Küster, 1856) de ocorrência no rio Conigo, Nova Friburgo (RJ), para a região de Pirassununga. Chama a

atenção também para a ocorrência de *D. paulista* e *D. fontainianus*, descritos inicialmente para a região de Piracicaba, na Cachoeira das Emas, Pirassununga.

Parodiz (1973) relata a existência de uma grande abundância de *D. expansus* na região de Piracicaba, Pirassununga, e o sul de Minas Gerais. E cita a ocorrência de *D. paulista* no rio Mogi Mirim, um tributário do rio Mogi Guaçu.

O projeto BIOTA/FAPESP coletou, entre os anos de 2000 e 2002, várias espécies da família Hyriidae no rio Mogi Guaçu. Entre as espécies do gênero *Diplodon* foi citado a ocorrência de *D. fontainianus*, *D. greeffeanus*, *D. rotundus gratus* e *D. mogymirim*.

2. Identificação dos bivalves coletados

Um total de 510 espécimes vivos pertencentes a duas famílias e oito espécies (tabela 4) foi coletado do rio Mogi Guaçu, entre o mês de março de 2008 e setembro 2009. A riqueza de espécies de cada família na região central da bacia do Mogi Guaçu esta representada pelos Hyriidae (cinco espécies) e Mycetopodidae (duas espécies).

Dentre as espécies coletadas foram identificados *D. fontainianus*, *D. expansus*, *D. rotundus gratus*, *D. martensi*, *Diplodon* sp, *C. undosa undosa*, *F. fossiculifera*, e *A. trapezeus*. Os caracteres conquiliológicos de cada espécie são listados abaixo.

Diplodon expansus (Küster, 1856) (figura 16A)

Diagnóstico: Concha elíptica, equivalve, com a margem anterior, normalmente, arredondada a partir do final de uma lúnula muito curta até a margem ventral. Valva esquerda com dentes pseudocardinais divididos em duas peças, a

anterior maior com a borda crenulada, e o posterior sendo um dente com uma ponta aguda; e com dois dentes laterais paralelos e arqueados, dos quais o inferior é mais largo. A valva direita apresenta seus dentes pseudocardinais bifurcados em uma direção longitudinal oblíqua. A cor do perióstraco é marrom, mas torna-se bastante escura próxima às margens.

Diplodon rotundus gratus (Lea, 1860) (figura 16B)

Diagnóstico: Concha subovalada, equívale e eqüilateral, com as bordas dorsal e posterior retas. Charneira com aparência frágil, com os dentes não tão desenvolvidos, com um dente pseudocardinal e dois laterais na valva esquerda e dois pseudocardinais e dois laterais na valva direita. Tamanho máximo de 4,50 cm. O perióstraco é de cor escura, marrom esverdeado. A superfície interna é lisa e esbranquiçada, com certa iridiscência púrpura.

Diplodon fontainianus (Orbigny, 1835) (figura 16C)

Diagnóstico: Concha ovalada a subtrapezoidal, quase circular, com o maior diâmetro na porção mediana da concha. Linha dorsal fortemente curvada, linha dorsal curvada atrás do umbo. Valva esquerda com um ou dois pseudocardinais e com dois dentes laterais curvos; valva direita com dois dentes pseudocardinais alongados, o inferior sendo maior, e um dente lateral. Perióstraco castanho escuro a preto, e superfície interna nacarada de cor branca azulada.

Diplodon martensi (Ihering, 1893) (figura 16D)

Diagnóstico: Concha em forma elíptica retangulóide, com região anterior curta e levemente mais baixa que a posterior. Borda dorsal regularmente arqueada e

ventral reta ou levemente arqueada. Dentes pseudocardinais lamelares e curtos, sendo o posterior levemente reforçado. Perióstraco castanho-escuro.

Diplodon sp (figura 16E)

Diagnóstico: Concha retangulóide, equivalve, com a região anterior arredondada, e com o umbo posicionado no primeiro terço. Borda ventral reta, com um bico na região posterior, e com um espessamento na região anterior. Dentição robusta, a valva esquerda apresenta dois dentes laterais longos, e um dente pseudocardinal, serrilhado no sentido oblíquo, que termina abruptamente na cicatriz do músculo adutor anterior. A valva direita apresenta um dente lateral e dois dentes pseudocardinais, sendo o mais dorsal pequeno e o mais ventral bem desenvolvido. Perióstraco de coloração marrom dourado e superfície interna nacarada, com manchas de cor amarela iridiscente.

Castalia undosa undosa (Martens, 1827) (figura 16F)

Diagnóstico: Concha subtriangular, equivalve e inequilateral, com uma carena proeminente que é truncada na região posterior. Lúnula facilmente visível. Charneira bem desenvolvida, com dois dentes cardinais em cada valva. O dente cardinal anterior é maior que o posterior, com várias cúspides bem desenvolvidas. A superfície interna e externa do dente cardinal da valva esquerda é crenulada, enquanto que na valva direita as crenulações estão presentes apenas na superfície interna. Na valva direita existe um dente lateral com ambas as superfícies apresentando crenulações, e na valva esquerda existe um lado de igual tamanho cuja superfície interna é crenulada.

Anodontites trapezeus (Spix, 1827) (figura 16G)

Diagnóstico: Concha subcircular, equivalve e eqüilateral, com as bordas dorsal e traseira quase reta. Duas costelas não proeminentes partem do umbo em direção a região posterior, das quais a mais dorsal termina na região do diafragma, entre as duas aberturas. As valvas são infladas, tocando-se ao longo de toda borda externa, e a junção não apresenta dentes. O umbo é distendido, partindo de acima da linha de junção.

Fossula fossiculifera (Orbigny, 1835) (figura 16H)

Diagnóstico: Concha com contorno subcircular, equivalve e inequilateral, com uma borda posterior alada partindo acima do umbo. Duas costelas levemente marcadas se originam no umbo e estendem-se até a região ventral, sendo que a posicionada mais dorsalmente termina na região do diafragma. Charneira bem desenvolvida, com um dente pseudocardinal na valva esquerda e dois dentes pseudocardinais na valva direita. Cavidade umbonal rasa.

Figura 16. Espécies coletadas no rio Mogi Guaçu, Porto Ferreira, SP (21°50'36,1" S e 47°29'44,5" W). **A**, *Diplodon expansus*; **B**, *Diplodon rotundus gratus*; **C**, *Diplodon fontainianus*; **D**, *Diplodon martensi*; **E**, *Diplodon* sp; **F**, *Castalia undosa undosa*; **G**, *Anodontites trapezeus*; **H**, *Fossula fossiculifera*. Escala — = 1 cm.

Tabela 4. Bivalves límnicos nativos coletados do rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, São Paulo, Brasil, entre março/2008 e setembro/2009.

Ordem	Família	Espécie	Quantidade
Unionoida	Hyriidae	<i>Diplodon expansus</i>	129
		<i>Diplodon martensi</i>	5
		<i>Diplodon fontainianus</i>	27
		<i>Diplodon rotundus gratus</i>	13
		<i>Diplodon</i> sp	2
		<i>Castalia undosa undosa</i>	286
	Mycetopodidae	<i>Anodontites trapezeus</i>	27
		<i>Fossula fossiculifera</i>	21

Deve ser citado que em algumas regiões da área de estudo *Corbicula fluminea*, uma espécie exótica, representou quase 90 % dos bivalves coletados. Apesar disso, a estrutura da comunidade nativa pode ser descrita como 90,6 % pertencendo a família Hyriidae, principalmente *C. undosa undosa* (61,9 %) e *D. expansus* (27,9 %). Entre os Mycetopodidae coletados foi encontrado um equilíbrio numérico entre as espécies.

Em nossas coletas foi observado que os representantes da espécie *D. expansus*, apresentavam uma grande plasticidade da concha, sendo possível diferenciar dois grupos, com suas formas intermediárias (figura 17).

Figura 17. Foto da variação das conchas de *D. expansus*, coletadas no rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, São Paulo.

Para a identificação utilizamos tanto caracteres conquiliológicos como anatômicos.

Os caracteres conquiliológicos que definiram um grupo foram:

Concha é equivalve, inequilateral, com a margem dorsal reta, sendo ovalada na região anterior e subquadrada na região posterior, apresentando um ligamento anfidélico forte. Valvas achatadas (platicúrticas). Umbo localizado no primeiro terço da região anterior, sendo pouco proeminente e com o perióstraco desgastado. Com uma lúnula estreita, sendo que em exemplares maiores a lúnula é mais larga. Perióstraco com coloração castanho-amarronzada, com tons que variam do marrom tendendo ao preto, conforme as conchas apresentam um maior tamanho. A superfície interna é lisa, esbranquiçada. Linha palial bem marcada, com início na região posteroventral do músculo adutor posterior e terminando na região ventral do músculo adutor anterior.

Partindo do umbo em direção posterior até a margem da concha existe um sulco pouco acentuado que se alarga até a região da abertura anal. Apresenta uma costela a partir do lado posterior do umbo até a margem da concha na região do diafragma. E uma segunda ornamentação, mais sutil, superior à primeira até região mediana da concha. Linhas de crescimento concêntricas ao umbo, terminando em uma linha reta na região anterior.

Charneira curta, delicada, posterior ao umbo, do tipo esquizodonte. Comprimento do ligamento vai desde o istmo ligamental, anteriormente, até o fim do dente pseudocardinal.

A valva esquerda apresenta um dente pseudocardinal lamelar, estriado obliquamente em direção anterior, tanto externa como internamente. Segundo dente pseudocardinal subdesenvolvido, com vários dentículos na borda. Porém nunca sobrepassando a metade do primeiro dente pseudocardinal, mais dorsal. E dois dentes laterais lamelares. A superfície interna do dente lateral ventral lisa, e a superfície voltada para a região interdentum estriada. Dente lateral dorsal com superfície interna e externa lisa, menor que o dente lateral ventral.

A valva direita apresenta dois dentes pseudocardinais. Um dorsal, de estrutura lamelar, estriado obliquamente em direção anterior, com sua superfície externa lisa, e com pequenas crenulações na borda. E um ventral também é estriado obliquamente em direção anterior, com a superfície externa lisa e com borda crenulada, sendo este dente mais espesso que o dente pseudocardinal dorsal. O dente lateral inicia-se no umbo posteriormente e vai até a região dorsal do músculo adutor posterior, sendo levemente estriado na porção superior terminal, com a superfície externa lisa e a superfície interna rugosa na porção terminal (borda do dente).

Figura 18. Detalhes dos dentes pseudocardinais das valvas do grupo 1 de *Diplodon expansus*. À esquerda o dente pseudocardinal da valva esquerda, e a direita o dente pseudocardinal valva direita.

E o segundo grupo foi definido pelos exemplares com:

A concha equivalve, inequilateral, com região anterior arredondada e região posterior subquadrada, apresentando um ligamento anfidélico forte. Região dorsal praticamente reta e com a região posterior mais larga que a anterior. Valvas um pouco infladas, com região umbonal não muito elevada, normalmente erodida. Lúnula, nem sempre observada. Perióstraco castanho escuro e camada nacarada lisa, esbranquiçada, com raios azulados. Concha espessa. Na superfície externa das valvas existe um sulco iniciando no umbo em direção a região posteroventral, terminando próximo da região das aberturas inalantes e exalantes, as linhas de crescimento são concêntricas bem marcadas.

Valva esquerda com um dente pseudocardinal com estriações, mais grosseiras na face interna, e um segundo dente pseudocardinal quase vestigial. Início do dente pseudocardinal logo após o umbo, terminando acima do

músculo adutor anterior. Apresenta dois dentes laterais lamelares. O dente lateral interno, externamente é liso e internamente estriado apenas na região terminal. O dente lateral exterior é liso tanto externo como internamente. O dente lateral interno é levemente maior que o externo, deixando aparecer apenas a porção terminal evidenciando suas estrias, ele é mais comprido, porém com a mesma altura do dente externo.

Valva direita com dois dentes pseudocardinais e um dente lateral. O dente pseudocardinal dorsal é curto e robusto, com estriações em ambas as faces. O ventral é lamelar, estriado obliquamente em direção anterior, na face voltada para interdentum, a outra face é lisa.

Figura 19. Detalhes dos dentes pseudocardinais das valvas do grupo 2 de *Diplodon expansus*. À esquerda o dente pseudocardinal da valva esquerda, e a direita o dente pseudocardinal valva direita.

Quando foram utilizados os caracteres anatômicos e comparados com aqueles conquiliológicos foi possível identifica um terceiro grupo.

Figura 20. Características anatômicas dos três grupos de *Diplodon expansus*.

Anatomia grupo 1:

Abertura exalante em forma de fenda, com sua porção acima fechada. Abertura exalante tão comprida quanto à inalante, separada dela por uma conexão do manto sólida. Abertura inalante com papilas distintas. Palpo moderado, subtriangular, margem posterior conectada por cerca de um terço do seu comprimento.

Demibrânquia interna subtrapezoidal, mais alta e mais larga que a externa, com sua porção anterior conectada ao palpo e com sua margem ventral arredondada. Demibrânquia externa subtriangular, com ocupando 4/6 da interna. Porção posterior mais alongada que a demibrânquia interna e região anterior bem afilada, deixando a demibrânquia interna totalmente exposta. Lamela interna da brânquia interna totalmente conectada com o saco abdominal.

Anatomia grupo 2:

Manto delgado, bem pigmentado na borda, salmão alaranjado, pigmentação mais evidente na região das aberturas. A borda da região das

aberturas é cor marrom escuro tendendo a preto, e a borda do manto é mais grossa que o meio. Abertura inalante inteira aberta, com pequenas papilas, abertura exalante separada da inalante por um diafragma forte, de cor preta.

Palpo arredondado na região anterior e um pouco afilado na região posterior, pigmentação laranja bem forte. A parte externa palpo apresenta pregas na borda desde a região anterior até a região posterior, a parte mais dorsal do palpo não apresenta pregas, apenas a parte ventral pregueada. A parte interna do palpo inteira pregueada, não apenas na borda. As pregas da parte interna do palpo vão desde a abertura da boca até a borda posterior do palpo. A pigmentação e do lado externo do palpo, a borda dorsal do palpo é um pouco mais espessa que a borda ventral do palpo.

Demibrânquia interna e externa com formato subtrapezoidal, ambas apresentam a margem ventral reta. Demibrânquia externa levemente menor na região anterior, porém com a mesma altura na região posterior, cobrindo totalmente a interna.

Anatomia grupo 3:

Manto delgado, não muito pigmentado, com um espessamento na borda. Abertura inalante e exalante de tamanho similar, porém a inalante apresenta uma série de papilas na região próxima ao diafragma. Pé de coloração escura.

Palpo subtriangular com pregas na borda, mais compridos que largos. Demibrânquia interna e externa subtriangular, com a mesma altura. Demibrânquia externa um pouco maior na região posterior, apresentando uma espécie de franjeado em sua porção posteroventral.

Convencionou-se, então, denominar os exemplares como *D. expansus* var. 1, *D. expansus* var. 2 e *D. expansus* var. 3, para fins de identificação para os experimentos de propagação.

3. Propagação de bivalves em laboratório

3.1. Isolamento, cultivo e manutenção de microalgas

Dentre as várias espécies de algas coletadas a espécie mais representativa e que teve um desenvolvimento mais acentuado no laboratório foi *Chlamydomonas* SP (figura 21). Sendo bem aceita pelos bivalves, e com uma maior resistência às contaminações bacterianas e/ou por protozoários nas culturas, portanto sendo selecionada para a produção massiva.

Figura 21. Espécie de microalga isolada do rio Mogi Guaçu e cultivada em larga escala no laboratório (*Chlamydomonas* sp).

O meio de cultura com fertilizante inorgânico na concentração de 20/200 alcançou sua maior densidade celular no quarto dia, enquanto que todos os outros tratamentos apresentaram o pico populacional entre o sétimo e oitavo dia ($p < 0,05$) (figura 22).

As densidades celulares mais elevadas foram observadas em cultivos com fertilizante inorgânico (na proporção 1/200 e 5/200) e esterco de vaca, com valores de 1230, 1170 e 1380 x 10⁴ células/ml, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre eles ($p < 0,05$).

As outras concentrações, 0,5/200, 10/200 e 20/200, permitiram que a densidade populacional dos cultivos alcançasse valores menores, de 710, 420 e 239 x 10⁴ células/ml, respectivamente.

Figura 22. Crescimento da densidade populacional de *Chlamydomonas* sp cultivada em diferentes meios de cultivo.

Tanto o meio de cultivo como os procedimentos empregados na produção de microalgas propiciaram uma produção de 500 litros mensais de alimento.

3.2. Manutenção dos bivalves adultos em laboratório

3.2.1. Experimentos preliminares

O grupo dos animais mantidos suspensos apresentou uma maior sobrevivência em relação aos enterrados ($p < 0,05$), com a morte de apenas

dois animais (4%) no período de 120 dias. Os bivalves enterrados terminaram o período experimental com 22% de mortalidade (11 animais).

Apesar da alocação aleatória, os animais enterrados eram, em média, mais pesados que os suspensos desde o início do período de observação (diferença média de 26,8 g, I.C. (95%) = [11,5; 42,1], $p = 0,0005$).

No modelo ANOVA, o efeito de interação foi significativo ($p < 0,001$) indicando que o crescimento dos animais é diferente nos dois grupos. No grupo de animais suspensos, houve uma perda de peso no 1º mês ($p < 0,001$) e a partir disso o ganho de peso foi gradativo com todas as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$). No grupo de enterrados, houve uma perda de peso significativa no 1º e no 2º mês ($p < 0,001$), no entanto não houve diferença entre o 2º e 3º mês ($p=0,1226$), nem entre o 3º e 4º mês ($p=0,6963$). Em todos os momentos de avaliação, a média de peso no grupo enterrado foi maior que no grupo suspenso ($p < 0,01$) (tabela 5).

Tabela 5. Peso, em gramas (médias e desvios padrão), dos espécimes de *Anodontites trapesialis* mantidos enterrados e suspensos.

	Momento de avaliação				
	Inicial	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês
Enterrado	140,1 (44,3)	138,5 (44,4)	133,4 (41,0)	136,2 (41,2)	134,2 (40,5)
Suspenso	113,3 (31,8)	111,6 (31,9)	113,5 (32,2)	114,4 (32,1)	115,7 (31,8)

Em resumo, em ambos os grupos há uma perda de peso no 1º mês. Os animais suspensos conseguem recuperar o peso gradativamente enquanto que os animais enterrados, além da perda ser maior, o peso se mantém baixo (inferior ao peso inicial).

Em valores percentuais, comparando os pesos medidos no início e no final do período de observação, foi observado um ganho médio de 2,1% no grupo suspenso e uma perda média de 1,4% no grupo enterrado.

3.2.2. Manutenção dos bivalves coletados

Tanto a metodologia empregada como a dieta propiciada pelas espécies de microalga cultivadas se mostrou eficiente para a manutenção dos exemplares dos bivalves, mantidos em laboratório. O peso dos animais se manteve constante durante o período em foram alimentados com a dieta oferecida (*Chlamydomonas* sp e *Ankistrodesmus* sp). Foi possível manter *C. undosa undosa*, *D. rotundus gratus*, *D. expansus*, *D. fontainianus*, *D. martensi*, *F. fossiculifera* e *A. trapezeus*, com uma mortalidade inferior a 5%.

Foi observado que a espécie *C. undosa undosa* apresentava uma maior sobrevivência com um fluxo mais constante de água, enquanto que as espécies, pertencentes à família Mycetopodidae, *F. fossiculifera* e *A. trapezeus*, não apresentaram uma diferença na sobrevivência em condições de água parada.

3.3. Obtenção dos gloquídio

3.3.1. Liberação de gloquídeos

Dos indivíduos coletados da espécie *D. fontainianus* apenas 12 animais (44,44%) liberaram gloquídeos (figura 23A) em laboratório, sendo que o maior número de liberações foi registrado no mês de agosto (tabela 6).

Dois exemplares de *D. martensi* (40%) liberaram seus gloquídeos (figura 23B), naturalmente, no mês de setembro (tabela 6).

A liberação dos gloquídeos de 46,15% dos espécimes coletados de *D. rotundus gratus* (figura 23C), ocorreu nos meses de junho e julho (tabela 6).

Como identificação das variedades de *D. expansus* foi possível apenas através da observação da anatomia interna, faz-se difícil precisar a porcentagem de indivíduos que liberaram seus gloquídeos no laboratório. Sendo possível apenas apresentar o número absoluto dos animais que liberaram gloquídeos, foi observado que 7, 14 e 8 exemplares de *D. expansus* var. 1, 2 e 3 liberam seus gloquídeos (figura 23D) entre julho a setembro (tabela 6).

Figura 23. Gloquídeos das espécies do gênero *Diplodon* que foram liberados em laboratório. Legenda: **A**, *Diplodon fontainianus*; **B**, *Diplodon martensi*; **C**, *Diplodon rotundus gratus*; **D**, *Diplodon expansus* var. 1; **E**, *Diplodon expansus* var. 2; **F**, *Diplodon expansus* var. 3. Escala — = 100 μ .

A liberação de 26,57% dos indivíduos de *C. undosa undosa* coletados ocorreu entre os meses de outubro e novembro (tabela 7).

As espécies de *Diplodon* cujos gloquídeos estavam aptos a serem liberados ou em via de liberação dos marsúpios, iniciaram a eliminação entre 12 e 48 horas depois de acondicionados em laboratório. A maneira pela qual as espécies liberam os gloquídeos mostrou comportamento diferente; *D. rotundus*

gratus a liberação é contínua e ocorre através da abertura exalante em forma de fita mucosa com duração de cerca de 10 a 12 horas. Em *D. expansus* a liberação ocorre, também via abertura exalante, em pulsos regulares que duraram mais de 24 horas.

Tabela 6. Espécies coletadas no rio Mogi Guaçu, no município de Porto Ferreira (21°50'36,10" S e 47°29'44,5" W) e número de indivíduos que desovaram no laboratório.

espécie	coletados desovados	
<i>D. expansus</i> var. 1		7
<i>D. expansus</i> var. 2	129	14
<i>D. expansus</i> var. 3		8
<i>D. fontainianus</i>	27	12
<i>D. martensi</i>	5	2
<i>D. rotundus gratus</i>	13	6
<i>C. undosa undosa</i>	286	76
<i>A. trapezeus</i>	27	3
<i>F. fossiculifera</i>	21	10

3.3.2. Viabilidade dos gloquídeos

A viabilidade dos gloquídeos, de *D. expansus* var. 2 e *D. rotundus gratus*, ao longo do tempo foi similar e consistente. Para a comparação dos tratamentos e espécies, foi selecionado como umbral inferior o valor de 75 % de viabilidade. Apesar de arbitrário, valores inferiores, segundo Zimmerman e Neves (2002), negariam qualquer benefício quando comparado com a

viabilidade *in situ* dos gloquídeos. Em todos os casos, os tratamentos submetidos a temperaturas mais baixas resultaram em uma maior sobrevivência que àqueles submetidos a temperaturas mais elevadas (tabela 7 e 8).

Os tratamentos com água destilada e deionizada não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as temperaturas testadas com *D. expansus* (tabela 7). Já nos experimentos com *D. rotundus gratus* apenas na temperatura de 18 °C a utilização de água deionizada proporcionou uma maior viabilidade das larvas ($p < 0,05$) (tabela 9).

A utilização de uma solução de antibiótico/fungicida, após o processo de lavagem fez com que a viabilidade dos gloquídeos perdurasse por um maior período de tempo. E que tal lavagem prévia dos gloquídeos impedia a ocorrência de fungos durante o período de incubação, aumentando desta forma a sobrevivência das larvas.

Aqueles gloquídeos que não sofreram nenhum tipo de processo (com muco) apresentaram uma baixa viabilidade decorrente de uma forte contaminação bacteriana logo nas primeiras 24 horas. Outro tratamento que se mostrou ineficaz foi a utilização de uma tela de 50 μm , que ocasionou a mortalidade total dos gloquídeos, provavelmente devido ao choque mecânico que as larvas sofreram durante a processo.

Tabela 7. Número de horas que a viabilidade dos gloquídeos de *D. expansus* var. 2 permaneceu acima de 75 %. Períodos dentro de uma linha seguidos por letras diferentes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tratamento dos gloquídeos	Temperaturas (°C)		
	18	22	24
Com muco	32 ^a	28 ^a	26 ^a
Água da mina autoclavada	148 ^a	96 ^b	72 ^b
Água destilada	175 ^a	132 ^b	108 ^c
Água deionizada	178 ^a	140 ^b	108 ^c
Tela 50 µm	48 ^a	44 ^a	44 ^a
Solução antibiótico/antimicótico	196 ^a	175 ^b	157 ^c

Tabela 8. Número de horas que a viabilidade dos gloquídeos de *D. rotundus gratus* permaneceu acima de 75 %. Períodos dentro de uma linha seguidos por letras diferentes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tratamento dos gloquídeos	Temperaturas (°C)		
	18	22	24
Com muco	32 ^a	28 ^a	26 ^a
Água da mina autoclavada	122 ^a	96 ^a	64 ^c
Água destilada	158 ^a	128 ^b	100 ^c
Água deionizada	164 ^a	130 ^b	104 ^c
Tela 50 µm	52 ^a	48 ^a	44 ^a
Solução antibiótico/antimicótico	187 ^a	146 ^b	122 ^b

3.3.3. Conquiliometria dos Gloquídeos

O gloquídeo de *D. rotundus gratus* apresentou as maiores médias das medidas tomadas, com exceção do ângulo de obliquidade, com valores de comprimento de 294,2 µm, altura de 240,35 µm, comprimento da linha dorsal de 215,35 µm, deslocamento da ponta ventral de 38,47 µm e um ângulo de obliquidade de 16°. Os gloquídeos de *D. expansus* var.1 e var.2 apresentaram valores médios de comprimento de 279,72 µm e 276,46 µm, de altura de 224,76 µm e 226,6 µm, do comprimento da linha dorsal de 192,55 µm e 193,3 µm, do deslocamento da ponta ventral de 26,55 µm e 18,3 µm, e do ângulo de obliquidade de 18,41° e 18,5°, respectivamente (tabela 9).

Tabela 9. Medidas morfométricas das conchas dos gloquídeos de *D. expansus* var. 1, *D. expansus* var. 2 e *D. rotundus gratus*.

<i>Diplodon expansus</i> var. 1					
n = 40	variação	moda	média	desvio padrão	cv %
Comprimento	263,3 - 300	273,3	279,72	1,65	0,5898
Altura	206,6 – 253,3	226,6	224,76	3,3	1,4682
CDC	140 - 220	193,3	192,55	13,35	6,9333
DPV	6,6 – 66,6	13,3	26,55	13,35	50,2872
A°	12 – 23,5	17	18,41	2,5	13,5777
<i>Diplodon expansus</i> var. 2					
n = 40	variação	moda	média	desvio padrão	cv %
Comprimento	260 – 293,3	280	276,46	7,56	2,7359
Altura	210 – 246,6	226,6	226,6	0	0
CDC	180 – 213,3	200	193,3	6,7	3,4661
DPV	6,6- 60	26,6	18,3	1,7	9,2896
A°	10 - 23	18	18,5	2,96	16,0161
<i>Diplodon rotundus gratus</i>					
n = 40	variação	moda	média	desvio padrão	cv %
Comprimento	276,9 – 311,5	290,4	294,83	16,91	5,7367
Altura	226,9 – 253,8	238,5	243,07	3,07	1,2650
CDC	176,9 – 253,8	207,7	219,24	3,86	1,7606
DPV	15,4 – 61,54	30,8	42,31	11,54	27,2749
A°	12 - 20	15	16,25	2,85	12,9161

Legenda: **CDC**, comprimento dorsal da concha; **DPV**, deslocamento do ponto ventral; **A°**, ângulo de obliquidade; **cv**, coeficiente de variação.

3.4. Cultivo “in vivo” de gloquídeos

Entre as espécies coletadas de peixes, no rio Mogi Guaçu, *Geophagus brasiliensis*, *Hyphessobrycon eques*, *Cheirodon* sp e *Papiliochrommis ramirezi* não se mostraram como hospedeiras para as náíades das espécies de *D. rotundus gratus*, *D. expansus* var. 1, *D. expansus* var. 2 e *D. martensi*, já que, independentemente da temperatura utilizada, não apresentaram nenhum gloquídeo aderido ao corpo. O mesmo ocorrendo com a espécie exótica *Oreochromis niloticus*.

Já as espécies *Gymnotos* sp e *Randia queli*, quando expostas aos gloquídeos de *D. expansus* var. 2 na temperatura de 24 °C, apresentaram os cistos 24 horas após a infestação artificial. Os gloquídeos se aderiram à nadadeira caudal e aos barbilhões de *Gymnotos* sp e *Randia queli*, respectivamente. A primeira espécie citada, após cinco dias, com os cistos rasgou sua própria nadadeira, eliminando os gloquídeos. Já a segunda espécie apresentou algum tipo de resposta imunológica e os gloquídeos se soltaram dos barbilhões após quatro dias.

As espécies que se apresentaram como hospedeiras em potencial para as espécies do gênero *Diplodon* coletadas e testadas foram *Astianax altiparanae* e *Poecilia* sp. Esta última por apresentar tamanho muito reduzido (1-2,5 cm) não suportou o desenvolvimento das larvas até a metamorfose, vindo a perecer após 7-10 dias.

A porcentagem de gloquídeos metamorfoseados das diferentes espécies testadas e o tempo de incubação das mesmas, quando postas em contato com *A. altiparanae*, pode ser visualizada na tabela 10.

Tabela 10. Duração do período de infestação e porcentagem de metamorfose, em *Astyanax altiparanae*, de acordo com a espécie de bivalve e de temperatura do experimento.

Espécie bivalve	Temperatura (°C)	Período infestação (dias)	Metamorfose (%)
<i>D. rotundus gratus</i>	20	15	5,3
	22	13	3,6
<i>D. expansus</i> var. 1	22	12	1,2
	24	9	0,8
<i>D. expansus</i> var. 2	20	15	1,8
	24	10	1,0
<i>D. martensi</i>	20	18	2,4

3.5. Cultivo “in vitro” de gloquídeos

3.5.1. Meio de cultura (M 199 + antibiótico/fungicida)

Os gloquídeos que foram cultivados com o meio de cultura que apresentava a solução tampão HEPES tiveram uma morte súbita durante seu desenvolvimento (resultados nas tabelas referentes ao cultivo de gloquídeo, subitem 3.5.3.), independentemente da espécie, temperatura ou fonte protéica utilizada. Com a retirada da solução supra mencionada, foi obtido êxito no cultivo *in vitro* dos bivalves límnicos do gênero *Diplodon*.

A utilização da combinação antibiótico/fungicida não impediu a formação de colônias de fungos e o aparecimento de protozoários nas culturas, mesmo quando foi utilizado apenas o meio, sem a inclusão do plasma de peixe (figura 24).

Figura 24. Fotos das culturas de gloquídeos contaminadas. **A**, incubação apenas com meio de cultura; **B**, incubação com meio de cultura e plasma de peixe.

3.5.2. Fonte protéica

3.5.2.1. Plasma de peixe

A extração de sangue a partir da veia caudal foi satisfatória, já que foi possível obter sangue de espécies de grande e pequeno porte (ex, *Colossoma* sp e *A. altiparanae*, respectivamente) e ao mesmo tempo manter os peixes vivos para utilizá-los novamente. Foi obtida uma média de 7 ml de sangue/kg de peixe. A porcentagem de plasma, após a centrifugação do sangue, variou entre 65 a 30 %, dependendo da espécie utilizada.

3.5.2.2. Extrato liofilizado de peixe

A preparação do extrato liofilizado de peixe é extremamente simples, sendo que a manutenção/conservação deste extrato é bem menos trabalhosa quando comparado com o preparo e conservação do plasma de peixe.

3.5.2.3. Plasma bovino

A obtenção do sangue bovino foi feita pelos funcionários do frigorífico e as condições de assepsia não foram controladas. Após a obtenção do plasma, este se mostrou viável (em contaminação ou coagulação) por um período muito curto, de 15 dias, mesmo estando congelado.

3.5.3. Cultivo dos gloquídeos

Os gloquídeos incubados tanto a 24 °C como a 20 °C apresentaram uma forte contaminação bacteriana, com mortalidade total no quarto dia de cultivo. Já com a incubação dos gloquídeos feita a 18 °C foi possível cultivá-los até a metamorfose.

A utilização do plasma de *Colossoma* sp, *Oreochromis* sp e *Cyprinus* sp, como fonte protéica para o meio de cultura, permitiu que os gloquídeos de *D. fontainianus* e *D. expansus* var. 2 se desenvolvessem até no máximo seis dias, ocorrendo a mortalidade total após este período (tabela 11). Quando foi utilizado o plasma de *A. altiparanae*, extrato liofilizado de *A. altiparanae* e plasma bovino, como fonte protéica, os gloquídeos de *Diplodon martensi*, *D. rotundus gratus* e *D. expansus* var. 2 se desenvolveram até a metamorfose (tabela 12). Com a utilização do extrato liofilizado de *A. altiparanae*, para o cultivo de *D. rotundus gratus* a taxa de sobrevivência e metamorfose foi, respectivamente, de 40 % e 20 %. Para *D. expansus* var. 2 a taxa de sobrevivência foi de 50 % com 15 % de indivíduos metamorfoseados.

Nos gloquídeos de *D. rotundus gratus* e *D. expansus* var. 2 percebeu-se uma extrusão celular a partir do dia 12, a qual permaneceu até o dia 20, sendo posteriormente substituída pelo aparecimento do manto. Já nos gloquídeos aderidos ao peixe hospedeiro foi verificada que também ocorria uma extrusão celular, porém apenas 1-2 dias após a metamorfose. O aparecimento dos arcos branquiais foi notado nos gloquídeos cultivados *in vitro* no dia 19-21. E os gloquídeos apresentaram um pé ciliado no dia 22 do cultivo, indicando a metamorfose para a fase juvenil.

TABELA 11. Tempo de sobrevivência dos gloquídeos de *Diplodon fontainianus* e *D. expansus* var. 2 incubados a 18 °C com plasma de diferentes espécies de peixe como fontes protéicas na composição do meio de cultura.

Plasma da espécie	<i>D. fontainianus</i>	<i>D. expansus</i> var. 2
	tempo de sobrevivência	tempo de sobrevivência
	(horas)	(horas)
<i>Colossoma</i> sp	36	36
<i>Oreochromis</i> sp	144	120
<i>Cyprinus</i> sp	144	120
<i>A. altiparanae</i>	nt	528

Legenda: **nt**, não testado.

TABELA 12. Porcentagem de sobrevivência (e porcentagem de metamorfose) dos gloquídeos de *Diplodon rotundus gratus*, *D. expansus* var. 2 e *D. martensi* incubados a 18 °C com diferentes fontes protéicas na composição do meio de cultura.

Fonte protéica	<i>D. rotundus</i>	<i>D. expansus</i>	<i>D. martensi</i>
	<i>gratus</i>	var. 2	
<i>Plasma bovino</i>	1 (0,1)	1 (0,08)	nt
<i>Extrato liofilizado</i>	40 (20)	50 (15)	40 (35)
<i>Plasma A. altiparanae</i>	nt	50 (5)	nt

Legenda: **nt**, não testado.

3.6. Cultivo de juvenis

As espécies cultivadas, *D. rotundus gratus*, *D. expansus* var. 1 e var. 2, e *D. martensi*, apresentaram o mesmo comportamento durante seu crescimento, permitindo, desta forma, criar um protocolo para o cultivo de juvenis do gênero

Diplodon. Foi verificada a necessidade de utilizar diferentes sistemas de cultivo para cada etapa do desenvolvimento, e este foi dividido em cultivo de juvenis pós-metamórficos, juvenis com cinco dias, juvenis com 15 dias, e juvenis com mais de 30 dias. As tabelas com os resultados da sobrevivência dos juvenis submetidos aos diversos tratamentos foram elaboradas com as médias de sobrevivência das diferentes espécies testadas.

3.6.1. Juvenis pós-metamórficos (figura 25)

Os juvenis pós-metamórficos que foram mantidos nas placas de Petri apresentaram uma melhor sobrevivência quando comparados com aqueles mantidos nos Beckers (tabela 13). Quando comparados os tipos de tratamentos aos quais os gloquídeos foram submetidos, os melhores resultados foram obtidos nos tratamento sem adição de alimento, independente do recipiente utilizado. Já aqueles gloquídeos que foram colocados em contato com o sedimento apresentaram uma mortalidade significativamente maior.

Tabela 13. Sobrevivência dos juvenis pós-metamórficos do gênero *Diplodon*. Os valores de sobrevivência representam uma média entre as espécies testadas.

DIA	placa de Petri				Becker			
	SAL	MIC	SED	MIC+SED	SAL	MIC	SED	MIC+SED
0	20	20	15	15	15	15	15	15
2	19	10	10	5	13	7	10	7
4	19	10	7	0	12	5	4	0
6	15	0	3	0	10	0	2	0

Legenda: **SAL**, sem alimento; **MIC**, adição de microalga; **SED**, presença de sedimento; **MIC+SED**, com alimento e sedimento.

Figura 25. Fotografias dos juvenis pós metamórficos. **A**, *Diplodon expansus* var. 1; **B**, *Diplodon expansus* var. 2; **C**, *Diplodon martensi*; **D**, *Diplodon rotundus gratus*. Escala — = 200 μ .

3.6.2. Juvenis com 5 dias (figura 26)

Os juvenis que foram mantidos nas placas de Petri com a adição de 30000 células/ml da microalga *Chlamydomonas* sp, apresentaram uma maior sobrevivência, porém sem apresentar uma diferença significativa com aqueles que foram mantidos nas placas de Petri com a adição de sedimento, mantendo uma sobrevivência de 80 %, 72 % e 80 %, nos tratamentos com adição de alimento, apenas com sedimento e com adição de alimento e sedimento, respectivamente (tabela 14).

Os indivíduos com mais de cinco dias que foram mantidos em Becker com aeração apresentaram uma alta taxa de mortalidade. Sendo que o tratamento com sedimento mostrou-se significativamente mais viável, com uma sobrevivência de 66,66 %, após doze dias de experimentação.

Tabela 14. Sobrevivência dos juvenis pós-metamórficos do gênero *Diplodon*. Os valores de sobrevivência representam uma média entre as espécies testadas.

DIA	placa de Petri				Becker			
	SAL	MIC	SED	MIC+SED	SAL	MIC	SED	MIC+SED
0	10	25	25	25	10	15	15	15
2	7	24	22	22	5	11	14	14
4	5	24	20	22	5	11	13	13
6	2	23	20	22	0	7	10	11
8	2	20	19	20	0	7	10	11
10	0	20	19	20	0	4	10	11
12	0	20	18	20	0	4	10	10

Legenda: **SAL**, sem alimento; **MIC**, adição de microalga; **SED**, presença de sedimento; **MIC+SED**, com alimento e sedimento.

Figura 26. Fotografias dos juvenis. **A**, *Diplodon expansus* var. 1 com 5 dias; **B**, *Diplodon expansus* var. 2 com 5 dias; **C**, *Diplodon martensi* com 5 dias; **D**, *Diplodon rotundus gratus* com 5 dias. As fotografias A, B e D foram tiradas com microscopia de epifluorescência. Escala — = 500 μ .

3.6.3. *Juvenis com 15 dias* (figura 27)

Os juvenis após 15 dias de cultivo apresentaram um comportamento diferente, com uma maior sobrevivência daqueles que foram mantidos em Beckers com aeração (tabela 15). Entre os tratamentos testados aquele que apresentou o melhor resultado foi o com a adição de microalga e sedimento, com uma sobrevivência de 85 %, sendo significativamente maior que os demais, onde a sobrevivência não ultrapassou os 40 %.

Tabela 15. Sobrevivência dos juvenis com 15 dias após a metamorfose do gênero *Diplodon*. Os valores de sobrevivência representam uma média entre as espécies testadas.

DIA	Placa de Petri				Becker			
	SAL	MIC	SED	MIC+SED	SAL	MIC	SED	MIC+SED
0	10	15	20	20	10	15	20	20
2	10	15	20	20	9	15	18	20
4	8	15	18	17	5	11	18	19
6	3	14	14	17	2	11	17	19
8	0	11	14	17	1	11	17	17
10	0	4	8	14	1	8	11	17
12	0	4	8	14	0	8	11	17
14	0	1	8	12	0	8	8	17
16	0	1	7	5	0	8	8	17

Legenda: **SAL**, sem alimento; **MIC**, adição de microalga; **SED**, presença de sedimento; **MIC+SED**, com alimento e sedimento.

Figura 27. Fotografias dos juvenis. **A**, *Diplodon expansus* var. 1 com 15 dias; **B**, *Diplodon expansus* var. 2 com 10 dias; **C**, *Diplodon martensi* com 15 dias; **D**, *Diplodon rotundus gratus* com 15 dias. A fotografia A foi tirada com microscopia de epifluorescência. Escala — = 500 μ .

3.6.4. Juvenis com 30 dias ou mais (figura 28)

Seguindo o protocolo de trabalho, os gloquídeos recém metamorfoseados foram mantidos em Placas de Petri (60x15 mm) com água da mina autoclavada, previamente agitada com difusores de ar, em uma densidade máxima de 20 juvenis/placa. A partir do quarto dia de cultivo foi feita a adição, em dias alternados, de *Chlamydomonas* sp. Antes de alimentar os juvenis, eram trocados 2/3 da água em cada Placa de Petri.

No 12º dia, os juvenis foram transferidos para Placas de Petri com uma camada de 1 mm de sedimento arenoso (partículas < 125 μ m), recebendo alimento em dias alternados, com a troca de 2/3 da água a cada adição de microalga. E no 20º dia os juvenis foram colocados em um Becker, de 150 ml (densidade máxima de 50 juvenis/Becker), com 1 mm de sedimento, e difusores de ar para manter as microalgas na coluna de água e oxigenar o meio. Os recipientes eram lavados e o sedimento trocado quinzenalmente.

Com a metodologia empregada foi possível obter juvenis com mais de 30 dias para as espécies *D. rotundus gratus*, *D. martensi* e *D. expansus* var. 2. Os juvenis de *D. martensi* apresentaram uma taxa de mortalidade de 65 % até os 100 dias de cultivo, *D. expansus* var. 2 foi cultivado até os 65 dias com uma mortalidade de 40 %. E os juvenis de *D. rotundus gratus* permaneceram vivos até os 62 dias de cultivo.

Figura 28. Fotografias dos juvenis. **A**, *Diplodon rotundus gratus* com 30 dias; **B**, *Diplodon martensi* com 30 dias; **C**, *Diplodon martensi* com 60 dias; **D**, *Diplodon martensi* com 90 dias. As fotografias A, B e D foram tiradas com microscopia de epifluorescência. Escala — = 200 μ .

DISCUSSÃO

A reintrodução é uma ferramenta para a recuperação dos ambientes degradados (Neves e Zale, 1982; Watters, 2000). Porém a capacidade de produção de bivalves juvenis em laboratório será de pouco valor para a conservação da biodiversidade se estes indivíduos não sobreviverem após o lançamento (Zimmerman, 2003). A chave para esta questão é a identificação de locais adequados para a liberação. Atualmente existem muitos locais onde as populações são extremamente baixas ou foram extintas, mas que podem mais uma vez apoiar populações viáveis através do aumento ou reintrodução dos bivalves (Henley e Neves, 1999).

A preocupação com a depressão e a perda de alelos raros alimentou a oposição à introdução de juvenis criados em cativeiro (Hoeh *et al.*, 2009, Rogers, 1999). Além disso, uma vez que a degradação do habitat e má qualidade da água são duas das principais razões para o declínio inicial, não é certo que os indivíduos propagados poderiam sobreviver e se reproduzir. Questões de genética da conservação e qualidade do habitat, no entanto, devem ser ponderadas contra a urgência da recuperação e da ameaça de extinção. As reintroduções de espécies em locais históricos podem aumentar o número de populações saudáveis e, assim, reduzir a possibilidade da extinção de espécies perante um evento estocástico (McMahon e Bogan, 2001). Os objetivos de restauração em longo prazo devem incluir medidas de proteção para evitar o declínio da população, além de medidas que incluam a restauração de habitats, a variedade de espécies de peixes que co-habitam com as

populações de bivalves e a propagação dos juvenis para reintrodução (Zimmerman, 2003).

A propagação das náíades nos Estados Unidos começou no início de 1900 com a utilização de técnicas muito semelhantes às utilizadas hoje. Esta experiência forneceu aos cientistas uma base para o entendimento para pelo menos os requisitos básicos deste complexo grupo de invertebrados. Os esforços de propagação estão atualmente limitados a técnicas *in vivo*, que incluem o peixe hospedeiro (Lefevre e Curtis, 1912) e outra, *in vitro*, usando meios de cultura artificiais (Isom e Hudson, 1982). No entanto, a utilização de meios de cultura artificial pode ser a única maneira para que alguns bivalves sobrevivam à extinção (Ahlstedt, 1981; Neves *et al.*, 1997). Compreender a história de vida deste grupo exclusivo de invertebrados também nos obriga a analisar a história de vida, fisiologia, bioquímica e imunoquímica dos peixes hospedeiros. Essa compreensão da fisiologia dos peixes hospedeiros foi um pré-requisito para o desenvolvimento dos meios de cultura artificial (técnica *in vitro*) no início de 1980, fornecendo informações sobre os requisitos específicos de nutrientes para o suporte do desenvolvimento e crescimento dos gloquídeos (Farris e Van Hassel, 2006).

Técnicas para a determinação dos peixes hospedeiros têm sido relatadas e utilizadas por diversos pesquisadores ao longo de décadas (Howard, 1915; Coker *et al.*, 1921; Penn, 1939; Cope, 1959; Giusti *et al.*, 1975; Jenkinson, 1982; Hove e Neves, 1991; Hoggarth, 1992; Watters e O'Dee, 1996; Haag e Warren, 2003), enquanto alguns hospedeiros não convencionais (por exemplo, anfíbios) também têm sido identificados como apoio à metamorfose dos gloquídeos (Seshaiya, 1969; Watters e O'dee, 1998). Algumas espécies

têm mostrado um grau de sucesso relativamente bom no uso de técnicas de peixes hospedeiros, enquanto outros têm provado ser mais difícil (Jones *et al.*, 2006).

Através da infestação das espécies de peixes coletadas no rio Mogi Guaçu, *Geophagus brasiliensis*, *Hyphessobrycon eques*, *Cheirodon* sp e *Papiliochrommis ramirezi* não foram obtidos juvenis de *Diplodon rotundus gratus*, *D. expansus* var. 1, *D. expansus* var. 2 e *D. martensi*, pois os cistos se desprendiam dos peixes antes de completarem a metamorfose. Esse resultado pode ser indicativo de que há uma especificidade entre o gloquídio e o peixe. Zale e Neves (1982), Kat (1984), Watters e O'Dee (1996) e O'Connel e Neves (1999) afirmaram que a especificidade da associação gloquídio / peixe varia com a espécie de bivalve. Assim, se um gloquídio se fixa a um peixe não-hospedeiro, um cisto anormal se forma e cai após poucos dias de infestação. Esse processo é atribuído a uma imunidade natural do peixe não-hospedeiro às espécies de bivalve (Arey, 1932; Meyers *et al.*, 1980; Waller e Mitchell, 1989; Kirk e Layzer, 1997). Entretanto, Dudgeon e Morton (1984) ao estudarem a intensidade de parasitismo, em larvas de *Anodonta woodiana*, encontraram uma incidência maior em peixes exóticos do que em espécies nativas.

Técnicas para determinar a viabilidade de peixes hospedeiros incluem o uso de tanques com aeração, a colocação direta na brânquia, bem como a utilização de anestésicos para reduzir o estresse sobre o peixe (Zale e Neves, 1982; Henley e Neves, 1999; Zimmerman, 2003). Apesar de modificações nessas técnicas terem sido relatadas por vários pesquisadores, a abordagem fundamental é a mesma. Tanques com aeração são freqüentemente utilizados quando há gloquídeos viáveis, e são utilizadas várias espécies de peixes com

escalões etários. No entanto, se os gloquídeos são limitados e / ou os peixes são de menor tamanho ou têm brânquias de pequeno porte, a colocação direta na brânquia, utilizando pipetas, é uma alternativa viável às técnicas com tanques com ar para fixação dos gloquídeos. Anestesiá-los antes do encistamento é incerto, uma vez que os possíveis efeitos do anestésico podem inadvertidamente, danificar a adesão dos gloquídeos e sua posterior metamorfose.

O encistamento dos gloquídeos pode variar de alguns dias a vários meses, dependendo da espécie de bivalve, da saúde dos peixes (se o indivíduo está estressado ou doente devido a outros fatores ambientais), da temperatura da água, e talvez de outras variáveis atualmente desconhecidas (Mansur, 1999; Zimmerman e Neves, 2002; Zimmerman, 2003).

Em nosso estudo, os gloquídeos de *D. rotundus gratus* e *D. martensi*, *D. expansus* var.1 e *D. expansus* var. 2 permaneceram encistados por 9-18 dias em *Astyanax altiparanae* (tabela 11). *D. charruanus*, segundo Bonetto (1954), permaneceu encistado por um período de 10 a 20 dias em *Hoplias malabaricus*. No entanto, Bonetto e Ezcurra (1963) encontraram um período parasitário mais longo para *D. delodontus delodontus*, de 25 a 30 dias. Mansur (1999) infestou espécimes de *Gymnogeophagus gymnogenys* com gloquídeos de *D. martensi*, os quais permaneceram encistados por 30 dias.

Foi possível observar que existe uma relação entre a temperatura e o período de incubação, assim, em temperaturas mais baixas, o período de infestação é relativamente maior (tabela 11). Nos experimentos de Bonetto (1954) e Bonetto e Ezcurra (1963) não houve menção quanto às temperaturas em que foram realizadas as infestações. Dudgeon e Morton (1984) realizaram

infestações com gloquídeos de *Anodonta woodiana* e encontraram períodos de infestação que variam de 14 a 25 dias em 15 °C; de 8 a 12 dias em 22 °C; e de 6 a 11 dias em 27 °C. Tompa (1979) em infestações realizadas em *Poecilia reticulata* com larvas de *Lasmigona compressa* a 20 °C obteve um período de 10 a 12 dias de parasitismo. Zale e Neves (1982) utilizaram gloquídeos de *Villosa nebulosa* a 24,7 °C e encontraram um período de infestação que variou de 10 a 21 dias. O período de parasitismo mais longo, 40 a 50 dias, foi obtido por Telda e Fernando (1969) que usaram larvas de *Lampsilis radiata siliquoidea* a 15°C.

Alternativamente, a sobrevivência dos peixes pode ser comprometida pela infestação excessiva dos gloquídeos resultando na limitação das trocas gasosas através das lamelas branquiais. Enquanto a relação de 50-100 gloquídeos por brânquia para peixes com 15-25 cm de comprimento, tem sido relatada como adequada (Hove *et al.*, 2000), em nosso estudo foi utilizada uma relação de 200 gloquídeos por peixe (com tamanho médio de 5 cm). Porém, outros autores têm infestado os peixes hospedeiros com milhares de gloquídeos e conseguido sucesso na metamorfose e mantido a viabilidade dos peixes, uma vez removidos dos tanques (Milam *et al.*, 2000; Winterringer, 2004).

A quantidade de indivíduos metamorfoseados utilizando-se as técnicas *in vivo* de cultivo normalmente é muito baixa. No presente estudo, através das infestações de várias espécies do gênero *Diplodon* em *A. altiparanae*, foi obtido uma porcentagem de metamorfose de apenas 5,3 a 0,8 % (tabela 11). Bigham (2002), estudando as espécies *Venustaconcha ellipsiformis*, *Etheostoma spectabile* e *E. caeruleum* cita uma taxa de metamorfose média menor que 5 %. Em outro estudo realizado por Gray e colaboradores (2002) com *Strophitus*

undulatus, utilizando diversas espécies de peixes hospedeiros, a porcentagem de metamorfose obtida, após um período de 10 dias de incubação, variou de 2 a 51 %.

De certa forma, o cultivo *in vivo* de bivalves tende a imitar a natureza. Porém esta pretensão envolve um alto labor e custo para a realização de testes de viabilidade de potenciais peixes hospedeiros (Hove *et al.*, 2000), assim como, o conhecimento dos mesmos (Henley e Neves, 1999). Entretanto, tanto na natureza como em laboratório, é observada uma alta taxa de mortalidade causada por bactérias, fungos e protozoários (Young e Williams, 1984a, b), o que levou os pesquisadores a buscarem outra alternativa, o cultivo artificial ou *in vitro*.

Os cultivos de gloquídeos *in vitro* têm-se revelado bastante eficiente quando comparado com os cultivos *in vivo*. Neste estudo, *D. rotundus gratus* apresentou quatro vezes mais juvenis metamorfoseados e *D. expansus* var. 2 7,5 vezes quando cultivados com o liofilizado de peixe e comparados com o cultivo *in vivo*. Estudos semelhantes produziram cerca de dez a vinte vezes mais juvenis a partir de vários meios de cultura artificial (Hudson e Isom, 1984; Hudson e Shelbourne, 1990).

O interesse em aumentar a produção de bivalves através da utilização de cultura artificial foi visto no início do século XX, quando Ellis e Ellis (1926) relataram o sucesso da primeira cultura para a transformação de gloquídeos após excisão destes a partir do tecido branquial dos seus peixes hospedeiros. Infelizmente, os detalhes de suas soluções nunca foram publicados (Farris e Van Hassel, 2006). Muito mais tarde, no início de 1980, o interesse na cultura artificial de gloquídeos foi revista por Isom e Hudson (1982), que relataram o

sucesso na transformação de várias espécies, sem a utilização de um hospedeiro. Esta técnica começou como uma modificação de técnicas modernas de cultura celular e fez uso de uma mistura de aminoácidos, vitaminas e glicose em solução Ringer de Unionídeo (Ellis *et al.*, 1930), juntamente com a adição de plasma de peixes como uma fonte de proteínas, além de estimulantes de crescimento, hormônios, etc. Embora este trabalho comesse através da mistura desses componentes a partir do zero (usando as concentrações encontradas no plasma dos peixes como orientação), Hudson e Isom (1984) também relataram o sucesso usando pré-misturas, comercialmente disponíveis como meio de cultura de células (solução de Eagles com aminoácidos essenciais e não essenciais e M 199), que contém quase todos esses aminoácidos em concentrações elevadas ou superiores aos encontrados no plasma dos peixes.

Essa mistura tem sido usada para produzir milhares de bivalves juvenis (Johnson *et al.*, 1993; Hudson *et al.*, 1994; Hudson *et al.*, 1996; Barfield *et al.*, 1997; Clem, 1998), sendo, porém pouco conveniente para o uso em alguns laboratórios devido à exigência de um pronto fornecimento de peixe para que o sangue possa ser extraído e separado em plasma e não componentes do plasma. Devido a este inconveniente e porque a utilização de plasma de peixes apresenta grande variação nos resultados, devidos às condições destes, Hudson e Shelbourne (1990) tentaram desenvolver um meio alternativo que fosse livre de soro / plasma ou um meio com soro disponível comercialmente. Keller e Zam (1990) abordaram pela primeira vez a modificação da cultura de gloquídeos, demonstrando que outros soros podem ser substituídos pelo plasma de peixes, com o soro de cavalo produzindo os melhores resultados.

Mas trabalhos realizados por Uthaiwan *et al.* (2001, 2002) confirmaram uma maior afinidade dos gloquídeos por plasma de peixe quando comparado com um meio contendo soro de cavalo. A utilização de extrato liofilizado de peixe, *A. altiparanae*, neste trabalho, demonstrou ser possível o cultivo *in vitro*, de maneira simples, econômica e eficiente.

Na técnica de cultura com meio artificial os gloquídeos são removidos, como descrito por Hudson e Isom (1984), ou de preferência usando uma seringa com água para retirar as larvas do marsúpio (Uthaiwan *et al.*, 2001, 2002; Lima *et al.*, 2006), porém, neste trabalho, preferiu-se optar pela liberação natural dos gloquídeos para evitar a utilização de gloquídeos não maduros. No entanto, diferente das publicações anteriores, onde os gloquídeos são lavados três a quatro vezes em água de rio autoclavada ou água reconstituída e uma lavagem final com solução de Ringer para Unionídeo ou uma solução de Hank (Hudson e Isom, 1984; Milam *et al.* 2000), os gloquídeos foram lavados repetidas vezes com água destilada e uma lavagem final com uma solução de antibióticos, sendo, posteriormente, colocados para incubar em meio de cultura.

O meio original era composto de uma solução de Eagles com aminoácidos essenciais e não essenciais em um Ringer para Unionídeo contendo NaHCO_3 para controle de pH, vitaminas, antibióticos e glicose como parte artificial, e plasma de peixes como fonte de proteína natural, em uma proporção final de dois terços de meio artificial e de um terço de plasma (Isom e Hudson, 1982). Como mencionado anteriormente, outros meios foram testados por Hudson e Shelbourne (1990), tendo sido testadas as variações dos seguintes componentes específicos do meio artificial:

Equilíbrio iônico: inicialmente, Isom e Hudson (1982) usaram uma modificação do Ringers para Unionídeo descrito por Ellis *et al.* (1930), porém, os testes mostraram que preparados de soluções salinas equilibradas como solução de Earle ou de Hank (Sigma) são úteis na lavagem dos gloquídeos, bem como na sua transformação artificial, embora o rendimento possa ser ligeiramente inferior.

Fonte protéica: o plasma de peixe foi utilizado por Isom e Hudson (1982) como aditivo protéico. Hudson e Shelbourne (1990) trabalhando com *U. imbecillis* demonstraram que o soro de coelho também pode ser empregado como fonte protéica. Demonstraram ainda que, o desempenho do soro de coelhos é melhor do que de suíno, eqüino, ovino, de frango, bovino e soro fetal Estes resultados diferem dos achados de Keller e Zam (1990) que relataram que o soro de cavalo era mais eficiente como aditivo protéico. A combinação dos soros e plasmas mencionados também foi testada por Hudson e Shelbourne (1990), os quais sugerem utilizar a combinação de plasma de peixes / soro de coelho a qual promove um desenvolvimento normalmente igual, ou melhor, do que plasma de peixe sozinho. Uma vez que alguns laboratórios não têm acesso a plasma de peixes, e uma vez que as taxas de infecção são menores quando se utiliza soro estéril obtido a partir de empresas de fornecimento de bioquímica, o soro de coelho foi considerado como a melhor alternativa por Farris e Van Hassel (2006). Em um caso, gloquídeos de *Elliptio angustata* cultivados em soro de coelho superou significativamente o plasma de peixes nas taxas de transformação (Hudson e Shelbourne 1990). Embora os valores encontrados no presente estudo, com a utilização do extrato liofilizado de peixe, sejam menores do que os encontrados na literatura, eles foram bem

superiores aos valores de metamorfose obtidos através da infestação dos peixes hospedeiros. Além disso, a preparação e conservação do extrato são bem mais simples e não requer a manutenção de peixes no laboratório.

Antibióticos / Antimicóticos: várias lavagens dos gloquídeos retirados do marsúpio, como descrito anteriormente, são essenciais para reduzir a taxa de infecções por bactérias e fungos. Também ajudam a garantir uma baixa taxa de infecção os antibióticos (por exemplo, penicilina e estreptomicina) e antimicóticos (por exemplo, a anfotericina B). Estes que são normalmente encontrados na maioria das culturas celulares e foram os primeiros a serem utilizados no desenvolvimento dos meios para a manutenção e metamorfose dos gloquídeos (Isom e Hudson, 1982). Melhorias dessas técnicas foram feitas por isolamento e cultivo de culturas de bactérias provenientes dos gloquídeos e medindo as zonas de inibição de cerca de uma dúzia de antibióticos disponíveis comercialmente (Hudson e Isom, 1984). Os três antibióticos (ie, carbenicilina, sulfato de gentamicina e rifampicina) com os melhores efeitos inibitórios foram relatados por Isom e Hudson (1982) e atualmente são aqueles usados em todos os laboratórios que trabalham com culturas de gloquídeos. Muito mais tarde, as bactérias que foram isoladas, pela técnica de swab, das brânquias de *Amblema plicata*, *P. catarata*, e *U. Imbecillis* foram identificadas e medidas para efeitos inibidores (por exemplo, o crescimento) por quinze antibióticos (Loveless *et al.*, 1999). O pressuposto deste trabalho é que a contaminação da cultura artificial de gloquídeos provavelmente vem do tecido branquial do pai, que abriga estes gloquídeos. Os antibióticos mais eficazes contra as dezenas de bactérias isoladas foram neomicina, ciprofloxacina e polimixina B. Uma vez que o efeito destes nunca foi avaliado no sucesso da

metamorfose, uma mistura de antibióticos, incluindo dois destes novos antibióticos foi testada contra um controle de antibióticos padrão no efeito sobre a transformação de *U. Imbecillis* (Hudson e Isom, 1984). Uma vantagem de usar este aumento do número de antibióticos seria que um largo espectro de bactérias pode ser mais bem controlado do que com o uso dos antibióticos originalmente descritos por Isom e Hudson (1982). A solução antimicótica / fungicida da Invitrogen (tabela 3) não continha toda a gama de antibióticos citados pelos autores anteriores, o que pode ter sido um dos fatores de contaminação durante a incubação dos gloquídeos (figura 24).

Outros componentes do meio: a maioria dos outros componentes do meio permaneceu a mesma como descrito primeiramente por Isom e Hudson (1982). Os aminoácidos essenciais e não essenciais da solução de Eagles são misturados com o Ringer de Unionídeo com a adição de taurina e ornitina. As culturas parecem seguir bem sem a adição destes dois últimos aminoácidos, mas uma vez que estes são encontrados no plasma de peixes e uma vez que algumas espécies de bivalves podem exigir esses dois aminoácidos, eles ainda são utilizados na maioria das culturas. L-glutamina deve ser adicionada semanalmente, devido à sua incapacidade de manter-se estável em solução. Outros meios de cultura (por exemplo, M 199) também foram bem sucedidos na transformação, mesmo que sua composição varie ligeiramente do meio modificado de Eagles (Isom e Hudson, 1982, Keller e Zam, 1990).

Gloquídeos desenvolvidos artificialmente parecem ter um menor teor de lipídios do que aqueles em desenvolvimento aderidos aos peixes (Fisher e Dimock, 2002). Tankersley (2000) mostrou que os níveis lipídicos em gloquídeos e juvenis variam de acordo com cada desova, sendo influenciado

pelo bivalve-mãe. Além disso, indicou que o tipo de meio de cultura influenciou o teor de lipídios dos gloquídeos e desenvolvimento dos juvenis subseqüentes. Fisher (2002) demonstrou que gloquídeos desenvolvidos em meio artificial, com soro de coelho como fonte protéica, apresentaram menores teores de lipídios do que aqueles metamorfoseados nos peixes hospedeiros. Hudson e Isom (1984) compararam as taxas de transformação com meios contendo óleo de lula (Artemate, Argent Chemical Laboratories) e óleo de fígado de bacalhau. Embora as taxas variem, o óleo de fígado de bacalhau parecia ser melhor do que o óleo de lula e também resultou em menores taxas de infecção fúngica. Pensa-se que a adição deste óleo aumenta o armazenamento de lipídios dos gloquídeos (Tankersley, 2000).

Com a utilização do extrato liofilizado de *A. altparanae*, no o cultivo de *D. rotundus gratus* a taxa de sobrevivência e metamorfose foi, respectivamente, de 40 % e 20 %. Para *D. expansus* var. 2 a taxa de sobrevivência foi de 50 % com 15 % de indivíduos metamorfoseados. Isom e Hudson (1982) e Hudson e Shelbourne (1990) mostraram que a taxa de transformação dos gloquídeos com a inclusão do plasma do peixe, variou entre 50 a 78 % de indivíduos metamorfoseados. Uthaiwan e colaboradores (2001, 2002, 2003) desenvolveram uma técnica simples de cultura de gloquídeos em meio artificial, que resultou em uma alta taxa de metamorfose (85 a 100 %), trabalhando com *H. myersiana*. Resultados semelhantes foram obtidos com a espécie européia *A. cygnea*, que apresentaram uma sobrevivência larval de 34,3 %, enquanto que a proporção de larvas que sofreram metamorfose foi de 60,8 % (Lima *et al.*, 2006).

Mesmo não conseguindo os valores de sobrevivência e metamorfose que autores anteriores obtiveram a utilização de extrato de liofilizado de *A. altparanae*, como fonte protéica do meio de cultura, forneceu os componentes necessários para o desenvolvimento dos gloquídeos das espécies testadas. Apesar de não dispormos da composição de aminoácidos essenciais e não essenciais de *A. altparanae*, apenas a composição corporal, 13,45 % de proteína e 6,05 % de gordura (Cotan *et al.*, 2006), nossos resultados sugerem uma eficiência na sobrevivência pós-metamórfica, com sobrevivência de 75% após 30 dias. Autores como Hudson e Isom (1984), não conseguiram manter os juvenis pós-metamórficos por mais de uma semana trabalhando com as espécies de *L. ovata*, *Fusconaia ebena*, *Ligumia recta*, *Pleurobema cordatum* e *Carunculina moesta*. Uthaiwan *et al.* (2001) utilizando meio de cultura M 199 com plasma de *Oreochromis niloticus* e soro de cavalo, não conseguiu manter os juvenis pós-metamórficos de *H. myersiana* por mais de 10 dias. Uthaiwan *et al.* (2002), comparou o efeito do plasma de várias espécies de peixe, encontrando valores de sobrevivência pós metamórfica de 2 meses, 1 mês, 2-3 semanas e 1-2 semanas com carpa comum, Tilápia do Nilo e híbrido catfish, soro de cavalo e striped catfish, respectivamente. Estudos de Lima *et al* (2006) utilizando *A. cygnea*, cultivada em meio M 199 com plasma de *C. carpio* logrou uma sobrevivência pós-metamórfica de 15 dias.

Um estudo realizado por Hudson e Isom (1984) foi talvez a primeira tentativa bem sucedida para o cultivo de juvenis de bivalves de água doce em laboratório. Desde então, os esforços por Buddensiek (1995), Gatenby *et al.* (1997), O'Beirn *et al.* (1998), Hanlon (2000), Jones *et al.* (2005) e outros estudos não publicados têm diversificado e melhorado as técnicas de cultura.

Gatenby *et al.* (1997) utilizaram placas de Petri com ar para cultivar juvenis de *Villosa iris*, enquanto O'Beirn *et al.* (1998) utilizou sistemas de recirculação para estudos com *L. fasciola*. Os juvenis do gênero *Diplodon* apresentaram uma boa sobrevivência quando mantidos em placas de Petri e apenas após 15 dias serem transferidos para frascos maiores, com aeração. Provavelmente os resultados são devido à alimentação podal que os juvenis apresentam logo após a metamorfose (Yager *et al.*, 1994), e ao menor estresse causado pelas borbulhas de ar (Gatenby *et al.*, 1997). Jones *et al.* (2005) projetaram um sistema de recirculação tipo "mesocosmo" para uma variedade de espécies de bivalves. O mesocosmo é um sistema de recirculação com estágios incorporando vários processos biológicos naturais, incluindo o crescimento de bactérias e a decomposição de detritos. Esta abordagem de mesocosmo tenta imitar um riacho natural e proporciona uma dieta mais diversificada para os jovens recém-metamorfoseados. Todos estes sistemas, no entanto, necessitam de manutenção freqüente e suplementação alimentar com algas cultivadas. Juvenis de *U. Imbecillis* e *Epioblasma triquetra* foram cultivados com sucesso em um meio com água do rio exposta ao sol por 1-4 dias para aumentar a concentração de algas. Além disso, a adição de silte melhorou o crescimento dos juvenis em ambas as espécies, enquanto que a alimentação artificial, cultura mista de três espécies de algas resultou em inanição (Hudson e Isom, 1984). Uma observação apoiada por estudos realizados por Yeager *et al.* (1994) sugerem que os juvenis pós-metamórficos se alimentam principalmente de água intersticial do sedimento, através do sulco podal, de modo que o silte e microdetritos e bactérias associados podem ser sua principal fonte de alimento.

No entanto em experimentos com sedimentos do rio, os juvenis mostram uma sobrevivência de 50-60% em relação aos juvenis mantidos em uma cultura simples e estática por 90 dias (Hudson e Roberts, 1997, Hudson e McKissic, 1999). Beck (2001) e Gatenby *et al.* (1997) demonstraram a importância do sedimento nos cultivos de juvenis de bivalves. O mesmo foi constatado para os juvenis do gênero *Diplodon*. Porém a utilização de sedimento mostrou-se eficaz somente quando utilizado em juvenis com 12 dias de vida (tabela 16).

A causa de maior mortalidade no cultivo dos juvenis, no presente trabalho, foi devido à predação por Turbellaria e Protistas. Outros autores citam a predação como causa da dificuldade do cultivo. A taxa média de predação de *Macrostomum tuba* (Platyhelminthes, Turbellaria) em juvenis de bivalves (número de juvenis consumidos por verme por hora) foi de $0,26 \pm 0,17$ quando o substrato estava ausente e $0,43 \pm 0,18$ quando o substrato estava presente (Delp, 2002). Barnhart *et al.* (2008) relata que tanto *Macrostomum* e *Microstomum* ingerem juvenis de unionídeos. Henley *et al.* (2001) descreveu *M. tuba* como sendo um problema na instalação da cultura de náíades no Virginia Polytechnic Institute.

Técnicas que incluem o uso de peixes hospedeiros (*in vivo*) e métodos *in vitro* têm gerado juvenis viáveis para vários objetivos, incluindo testes de toxicidade, monitoramento *in situ*, bem como ajudar a estabilizar o declínio das populações através dos planos de recuperação de espécies e habitats degradados (Jacobson *et al.*, 1993; Yeager *et al.*, 1994).

A geração de juvenis também pode auxiliar na identificação taxonômica das espécies. Segundo Bonetto, (1961a), além de conhecer conquiologia e caracteres morfológicos do adulto, o ideal para se estudar a sistemática do

gênero *Diplodon* é conhecer as características morfológicas dos gloquídeos, pois estas são sempre preservadas em qualquer que seja a distribuição geográfica e o meio em que as espécies vivem.

As características gloquidiais ajudam na identificação e classificação desse grupo de moluscos no qual indivíduos juvenis ou adultos freqüentemente não fornecem critérios diagnósticos interespecíficos (Mansur e Silva, 1999).

Uma característica de valor taxonômico, citada por Bonetto (1959b) e Mansur e Campos-Velho (1990), seria a morfometria da concha gloquidial.

Os valores para todos os parâmetros medidos nas três espécies estudadas encontram-se muito próximos dos encontrados por Mansur e Silva (1999) para cinco espécies de *Diplodon*: *D. martensi*, *D. berthae*, *D. koseritzi*, *D. ihering* e *D. charruanus*. As espécies *D. expansus* var. 1 e *D. expansus* var. 2 apresentaram variação de comprimento semelhante a *D. ihering*, com 260 µm a 300 µm de comprimento. No que diz respeito à altura, *D. berthae*, com variação de 210 µm a 250 µm, foi aquele que mais se assemelhou às espécies do presente estudo.

Os deslocamentos da ponta ventral de *D. expansus* var. 1 e *D. expansus* var. 2 são menores do que os valores encontrados por Mansur e Silva (1999) nas outras espécies de *Diplodon*, enquanto que os ângulos de obliquidade são maiores. O gloquídeo de *D. rotundus gratus* foi o que apresentou as maiores dimensões entre as três espécies estudadas, exceto pelo ângulo de obliquidade. Através do teste ANOVA foi possível inferir que *D. rotundus gratus* apresenta diferença significativa em relação *D. expansus* var. 1 e *D. expansus* var. 2 para $p < 0,01$. No entanto, os ângulos de obliquidade de *D. expansus* var. 1 e *D. expansus* var. 2 não são significativamente diferentes. Mansur (1999)

não realizou testes estatísticos para as medidas morfométricas das larvas encontradas nas espécies de *Diplodon* que estudou.

Essa dificuldade de identificação das espécies do gênero *Diplodon* ficou evidenciada nos resultados observados no presente trabalho, no caso de *D. expansus* (figura 17). Porém a discussão em relação a grande plasticidade da espécie *D. expansus* é anterior.

A descrição de *D. expansus* feita por Kuster (1856), feita inteiramente na concha, é muito similar às descrições feitas por Ihering (1893) para *D. greeffeanus*. A localidade tipo da descrição de Kuster foi rio Conigo, Nova Friburgo, enquanto que a espécie descrita por Ihering provem do rio Piracicaba, São Paulo.

Ortmann (1921) fez uma série de correções na identificação das espécies de náíades da América do Sul, e através da anatomia macroscópica (brânquias, palpos, manto), dividiu o grupo do *D. expansus* em *D. expansus*, *D. mogymirim* e *D. greeffeanus*. E desta forma, descreve a espécie *D. mogymirim*, com características da concha muito similar a *D. greeffeanus*, mas com uma anatomia das aberturas, brânquias e palpos diferentes. A abertura exalante é parecida com uma fenda, fechada acima; a porção fechada não é mais que duas vezes a porção aberta. Abertura exalante tão comprida quanto a inalante, separada dela por uma conexão sólida do manto. Abertura inalante com papilas distintas. Palpo moderado, subtriangular, margem posterior conectada por cerca de um terço do seu comprimento. Brânquias algo que largas, a externa subtriangular, levemente mais larga que a interna posteriormente; a interna subtrapezoidal, mais larga que a externa anteriormente, sua porção

anterior imediatamente atrás do palpo. Lamela interna da brânquia interna totalmente conectada com o saco abdominal.

Simone (2006), seguindo a proposta feita por Haas (1945) e Bonetto (1965), agrupa *D. mogymirim* e *D. greeffeanus* sob *D. expansus*, como sinonímias. Porém, como ressaltado por Bonetto (1965), Haas distinguiu esta espécie compreendendo nela um conjunto de formas bem heterogêneas. Tais conclusões foram feitas com base em características conquiliológicas, normalmente sobre a escultura umbonal.

Os três grupos de *D. expansus* apresentaram características morfológicas das brânquias bem distintas (figura 20), porém o número reduzido de animais dissecados não permitiu tirar nenhuma conclusão.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível estabelecer uma metodologia para a reprodução e o cultivo dos bivalves do gênero *Diplodon*. De forma resumida, a metodologia consta:

- lavagens dos gloquídeos, eliminados naturalmente, com água destilada e uma lavagem final com uma solução de antibiótico / antimicótico.
- incubação dos gloquídeos (100-150 gloquídeos/placa) em placa de Petri (60x15 mm), com meio artificial composto de dois terços de meio de cultura M 199 e um terço de uma solução de extrato liofilizado de peixe, como fonte protéica, mais a adição de antibióticos e antimicóticos.
- os gloquídeos recém metamorfoseados são mantidos em placas de Petri com água da mina autoclavada, previamente agitada com difusores de ar
- no quarto dia de cultivo é feita a adição de alimento.
- no décimo segundo dia os juvenis são transferidos para placas de Petri com uma camada de 1 mm de sedimento arenoso.
- e no vigésimo dia são colocados em Becker, com 1 mm de sedimento, e difusores de ar para manter as microalgas na coluna de água e oxigenar o meio.

Apesar dos resultados satisfatórios na reprodução dos bivalves, incubação e metamorfose dos gloquídeos e cultivo de juvenis das espécies de bivalves límnicos do rio Mogi Guaçu, para um plano de repovoamento fica evidenciada a necessidade de estudos taxonômicos mais aprofundados. E justamente pela falta desses estudos, todo o programa de reintrodução deve preocupar-se em utilizar os animais de sua própria bacia hidrográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, H; Adams, A. 1858. The genera of recent Mollusca, arranged according to their organization. Volume 2. John van Voorst, Londres.
- Ahlstedt, SA. 1981. The molluscan fauna of Copper Creek (Clinch River System) in southwestern Virginia. Bulletin of the American Malacological Union, 1: 4–6.
- Almeida, ALAA. 2006. Comparação temporal de uma associação de bivalves límnicos do rio Pardo, município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. 108 p.
- Arey, LB. 1932. The nutrition of glochidia during metamorphosis. Journal of Morphology, 53 (1): 201-221.
- Assad, LT; Bursztyn, M. 2000. Aquicultura Sustentável. In Valenti, W.C. (ed). Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. CNPq/MCT, Brasília, pp. 33-72.
- Avelar, WEP. 1993. Functional anatomy of *Fossula fossiculifera* (D'Orbigny, 1843) (Bivalvia, Mycetopodidae). American Malacological Bulletin, 10(2): 129-138.
- Avelar, WEP; Santos, SCD. 1991. Functional anatomy of *Castalia undosa undosa* (Martens, 1827) (Bivalvia: Hyriidae). The Veliger 34(1): 21-31.
- Avelar, WEP; Mendonça, SHST. 1998. Aspects of gametogenesis of *Diplodon rotundus gratus* (Wagner, 1827) (Bivalvia: Hyriidae) in Brazil. American Malacological Bulletin, 14(2): 157-163.
- Avelar, WEP; Cunha, AD. 2009. The anatomy and functional morphology of *Diplodon rhombeus fontainianus* (Orbigny, 1835) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae). Brazilian Journal of Biology, 69(4): 1153-1163.
- Barfield, ML; Clem, SA; Farris, JL. 1997. Comparison of acute testing methods of *Utterbackia imbecillis* (Say) with variation on age, diet, and in vitro transformation method. Conservation and Management of Freshwater Mussels II: Initiatives for the Future. Proceedings of a UMRCC Symposium, St. Louis, EUA, 293 p.

- Barnhart, MC; Haag, WR; Roston, WN. 2008. Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida. *Journal of North American Benthological Society*, 27(2): 230-394.
- Bauer, G; Vogel, C. 1987. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). I: Host response to glochidiosis. *Archiv für Hydrobiologie*, 76(4): 393-402.
- Beasley, CR. 2001. The impact of exploitation on freshwater mussels (Bivalvia: Hyriidae) in the Tocantins River, Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36(2): 159-165.
- Beasley, CR; Túry, E; Vale, WG; Tagliaro, CH. 2000. Reproductive cycle, management and conservation of *Paxyodon syrmatophorus* (Bivalvia: Hyriidae) from the Tocantins River, Brazil. *Journal of Molluscan Studies*, 66: 393-402.
- Beasley, CR; Miranda, LQ; Alves, STM; Tagliaro, CH. 2003. Evaluation of methods for assessing brood size in freshwater mussel (Hyriidae). *Journal of Molluscan Studies*, 69: 159-161.
- Beck, KM. 2001. Development of an algal diet for rearing juvenile freshwater mussels (Unionidae). *Dissertação de Mestrado*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, EUA. 58 p.
- Bigham, SE. 2002. Host specificity of freshwater mussels: a critical factor in conservation. *Dissertação de Mestrado*, Southwest Missouri State University, USA. 48 p.
- Bogan, AE. 2008. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 139-147.
- Bogan, AE; Hoeh, WR. 2000. On becoming cemented: evolutionary relationships among the genera in the freshwater bivalve family Etheriidae (Bivalvia: Unionoida). In Harper, EM; Taylor, JD; Crame, JA (eds), *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London Special Publication, 177: 159–168.
- Bonetto, AA. 1951. Acerca de las formas larvales de Mutelidae ORTMANN. *Jornadas Icticas*, 1: 1-8.

- Bonetto, AA. 1954. Náyades Del Rio Paraná. El gênero *Diplodon* en el biotopo isleño del Paraná médio e inferior. Publicación Técnica, Secretaria de Agricultura, Ganaderia e Industrias (Santa Fé), 62: 1-56.
- Bonetto, AA. 1959a. Sobre algunas nuevas formas larvales de Hyriinae Ortmann. Actas del I Congreso Sudamericano de Zoología, La Plata, 2: 33-41.
- Bonetto, AA. 1959b. Contribución al conocimiento de las glochidias del genero *Diplodon* y su aplicación a los estudios sistemáticos. Actas del I Congreso Sudamericano de Zoología, La Plata, 2: 43-59.
- Bonetto, AA. 1960a. Sobre la distribución geográfica de las náyades en la República Argentina. Physis, T. XXII, n°. 63 (Sesiones Cient. Zoología, Tucumán), Argentina.
- Bonetto, AA. 1960b. Sobre algunas formas larvales de Hyriinae Ortmann, 1º Congreso Sudamericano Zoologia, La Plata, 2.
- Bonetto, AA. 1961a. Investigaciones acerca de las formas larvales en el género *Diplodon* y su aplicación a los estudios sistemáticos. Dirección General de Recursos Naturales, Santa Fé, Argentina, 48 p.
- Bonetto, AA. 1961b. Nuevas notas sobre formas larvales de náyades Sud y Centroamericanas. Physis, 21(62): 332-335.
- Bonetto, AA. 1961c. Acerca de la distribución geográfica de las náyades en la República Argentina. Physis, 22(63): 259-268.
- Bonetto, AA. 1962. Notas sobre *Diplodon charruanus* (Orb.) y *Diplodon rhuacoicus* (Orb.). Dirección General de Recursos Naturales, Santa Fé, Argentina, 10: 35-44.
- Bonetto, AA. 1964. Las especies do genero *Diplodon* (Moll. Unionacea) en los ríos de la pendiente Atlántica del Sur de Brasil. Physis, 68: 323-328.
- Bonetto, AA. 1965. Las especies del genero *Diplodon* en el sistema hidrográfico del rio de la Plata. Anais do II Congresso Latino-americano de Zoologia, São Paulo, 1962, vol. 2: 37-54.

- Bonetto, AA; Ezcurra, ID. 1963. Notas Malacológicas I. El desarrollo del glochidium de *Diplodon delodontus delodontus* (Lam.), Physis, B. Aires, 24(67): 17- 21.
- Bonetto, AA; Maciel, I; Pignalberi, C. 1962. Algunos factores ecológicos vinculados a la distribución geográfica de las náyades en el río Paraná y sus afluentes. Dirección General de Recursos Naturales Santa Fé, Argentina, 12: 167-175.
- Boss, KJ. 1982. Mollusca. In S.P. Parker (ed.). Synopsis and Classification of Living Organisms. Volume 1. McGraw-Hill Book Company, New York. pp. 945-1166.
- Bradshaw, M. 1984. Permian non-marine bivalves from the Ohio Range, Antarctica. Alcheringa, 8: 305-309.
- Brusca, RC; Brusca, GJ. 2007. Invertebrados. Guanabara Koogan, São Paulo, Brasil. p. 1092.
- Buddensiek, V. 1995. The culture of juvenile freshwater pearl *mussels* *Margaritifera margaritifera* L. In cages: a contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. Biological Conservation, 74: 33-40.
- Christian, AD; Smith, BN; Berg, DJ; Smoot, JC; Findlay, RH. 2004. Trophic position and potential food source of 2 species of unionid bivalves (Mollusca: Unionidae) in 2 small Ohio streams. Journal of North American Benthological Society, 23(1): 101-113.
- Clem, SA. 1998. Complexities in testing early lifestage responses of freshwater mussels to metals and contaminated sediments. Dissertação de Mestrado. Arkansas State University. 89 p.
- Coker, RE; Shira, AF; Clark, HW; Howard, AD. 1921. Natural history and propagation of freshwater mussels. Bulletin of the Bureau of Fisheries, 37: 77-81.
- Cope, OB. 1959. New parasite records from stickleback and salmon in an Alaskan stream. Transaction of American Microscopy Society, 789: 157-162.

- Cosgrove, PJ; Hastie, LC. 2001. Conservation of threatened freshwater pearl mussel population: river management, mussel translocation and conflict resolution. *Biological Conservation*, 99: 183-190.
- Cotan, J.L.V., Lanna, E.A.T., Bomfim, M.A.D., Donzele, J.L., Ribeiro, F.B. e Serafini, M.A. 2006. Níveis de energia digestível e proteína bruta em rações para alevinos de lambari tambuí. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(3), 634-640.
- Davis, GM; Fuller, SLH. 1981. Genetic relationships among Recent Unionacea (Bivalvia) of North America. *Malacologia*, 20: 217-253.
- Delp, AM. 2002. Flatworm predation on juvenile freshwater mussel. Dissertação de Mestrado. Southwest Missouri State University. 31 p.
- Dodd, BJ; Barnhart, MC; Rogers-Lowery, CL; Fobian, TB; Dimock, RV. 2005. Cross-resistance of largemouth bass to glochidia of unionid mussels. *Journal of Parasitology*, 91(5): 1064–1072.
- Dodd, BJ; Barnhart, MC; Rogers-Lowery, CL; Fobian, TB; Dimock, RV. 2006. Persistence of host response against glochidia larvae in *Micropterus salmoides*. *Fish e Shellfish Immunology*, 21(5): 473-484.
- Dudgeon, D; Morton, B. 1984. Site selection and attachment duration of *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea) glochidia on fish hosts. *Journal of Zoology of London*, 204: 355-362.
- Ellis, MM; Ellis, MD. 1926. Growth and transformation of parasitic glochidias in physiological nutrient solutions. *Science*, 54(1667): 579-580.
- Ellis MM; Merrick, AD; Ellis, MD. 1930. The blood of North American freshwater mussels under normal and adverse conditions. *Bulletin of Bureau Fisheries*, 56: 509-542.
- Farris, J.L. e Van Hessel, J.H. 2006. Freshwater bivalve ecotoxicology. SETAC Press, Florida.
- Figueiredo, J; Hoorn, C; Van der Ven, P; Soares, E. 2009. Late miocene onset of the Amazon river and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas basin. *Geology*, 37(7): 619-622.

- Fisher, G. 2002. Physiological condition of in vitro- and in vivo-reared juvenile mussels. Resumo. Freshwater Mussel Conservation Society, Shepherdstown, EUA. 11 p.
- Fisher, GR; Dimock, RV. 2002. Morphological and molecular changes during metamorphosis in *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae). Journal of Molluscan Studies, 68(2): 159-164.
- Fisher, GR; Dimock, RV. 2006. Indicators of physiological condition in juveniles of *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae): A comparison of rearing techniques. American Malacological Bulletin, 21(1-2): 23-29.
- Fitzgerald, P. 2002. Tectonics and landscape evolution of the Antarctic plate since the breakup of Gondwana, with an emphasis on the West Antarctic Rift System and the Transantarctic Mountains. Royal Society of New Zealand Bulletin, 35: 453-469.
- Frierson, LS. 1927. A Classified and Annotated Check List of the North American Naiades. Baylor University Press, Waco, Texas.
- Fryer, G. 1954. Development in a mutelid Lamellibranch. Nature, 183: 1342-1343.
- Fryer, G. 1961. The developmental history of *Mutela bourguignati* (Ancey) (Mollusca: Bivalvia). Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 244: 259-298.
- Gatenby, CM; Parker, BC; Neves, RJ. 1997. Growth and survival of juvenile rainbow mussels, *Villosa iris* (Lea, 1829) (BIVALVIA: UNIONIDAE), reared on algal diets and sediment. American Malacological Bulletin, 14(1): 57-66.
- Giribet, G; Wheeler, W. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. Invertebrate Biology, 121(4): 271-324.
- Giusti, F; Castagnolo, L; Moretti, F; Renzoni, L; Renzoni, A. 1975. The reproductive cycle and the glochidium of *Anodonta cygnea* from Lago Trasimondo (Central Italy). Monitore Zoologico Italiano, 9: 99-118.
- Graf, DL. 1997. Sympatric speciation of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea): a model. American Malacological Bulletin, 14(1):35-40.

- Graf, DL. 2000. The Etherioidea revisited: a phylogenetic analysis of Hyriid relationships (Mollusca: Bivalvia: Paleoheterodonta: Unionoida). Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan, 729: 1-21.
- Graf, DL. 2002. Molecular phylogenetics analysis of two problematic freshwater mussel genera (*UNIO* and *GONIDEA*) and a re-evaluation of classification of nearctic UNIONIDAE (BIVALVIA: PALAEHETERODONTA: UNIONOIDA). Journal of Molluscan Studies, 68: 65-71.
- Graf, DL. 2007. Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) diversity and the Comparative Method as a species concept. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 156: 71-88.
- Graf, DL; Ó'Foighil, D. 2000. The evolution of brooding characters among the freshwater pearly mussels (Bivalvia: Unionoida) of North America. Journal of Molluscan Studies, 66: 157-170.
- Graf, DL; Cummings, KS. 2006. Palaeoheterodont diversity (Mollusca: Trigonioidea + Unionoida): what we know and what we wish knew about freshwater mussel evolution. Zoological Journal of the Linnean Society, 148: 343-394.
- Graf, DL; Cummings, KS. 2007. Review of the systematic and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). Journal of Molluscan Studies, 73: 291-314.
- Gray, EV; Lellis, WA; Cole, JC; Johnson, CS. 2002. Host identification for *Strophitus undulatus* (Bivalvia: Unionidae), the creeper, in the Upper Susquehannan River basin, Pennsylvania. American Midland Naturalist, 147(1): 153-161.
- Haag, WR; Warren, ML. 2003. Host fishes and infection strategies of freshwater mussels in large Mobile Basin streams, USA. Journal of the North American Benthological Society, 22(1): 78-91.
- Haas, F. 1945. Some remarkable shells of a South American freshwater mussel. Fieldiana-Zoology, 31: 15-30.
- Haas, F. 1969. Superfamilia Unionacea. In R. Martens and W. Hennig (eds.). Das Tierreich, Lieferung 88, Walter de Gruyter and Co., Berlin. 663 pp.

- Hanlon, SD. 2000. Release of juvenile mussels into a fish hatchery raceway: comparison of techniques. Dissertação de Mestrado. Virginia Polytechnic and State University. 131 p.
- Hastie, LC; Cosgrove, PJ; Ellis, N; Gaywood, M. 2003. The Threat of Climate Change to Freshwater Pearl Mussel Populations. *Ambio*, 32(1): 40-47.
- Heard, WH; Hendrix, SS. 1964. Behavior of unionid glochidia. Annual Report of the American Malacological Union.
- Heard, WH; Guckert, RH. 1971. A re-evaluation of the Recent Unionacea (Pelecypoda) of North America. *Malacologia*, 10: 333-355.
- Hebling, NJ. 1976. The functional Morphology of *Anodontites trapezeus* (Spix) and *Anodontites trapesialis* (Lamarck). (Bivalvia: Mycetopodidae). *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 1: 265-298.
- Hebling, NJ; Penteado, AMG. 1974. Anatomia funcional de *Diplodon rotundus gratus* Wagner, 1827 (MOLLUSCA, BIVALVIA). *Revista Brasileira de Biologia*, 34(1): 67-80.
- Henley, WF. 2002. Evaluation of diet, gametogenesis and hermaphroditism in freshwater mussels (BIVALVIA: UNIONIDAE). Tese de Doutorado. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, EUA. 148 p.
- Henley, WH; Neves, RJ. 1999. Recovery status of freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) in the North Fork Holston River, Virginia. *American Malacological Bulletin*, 15: 65–73.
- Henley, W.; Neves, RJ. 2001. Behavioral responses of glochidia of freshwater mussels (BIVALVIA: UNIONIDAE) to chemical cues of fish. *American Malacological Bulletin*, 16(1/2): 131-135.
- Henley, WF; Zimmerman, LL; Neves, RJ; Kidd, MR. 2001. Design and evaluation of recirculating water systems for maintenance and propagation of freshwater mussels. *North American Journal of Aquaculture* 63: 144-155.
- Hoeh, WR; Bogan, AE; Heard, WH; Chapman, EG. 2009. Palaeoheterodont phylogeny, character evolution, diversity and phylogenetic classification: a reflection on methods of analysis. *Malacologia* 51: 307–317.

- Hoggarth, MA. 1992. An examination of the glochidia—host relationships reported in the literature for North American species of Unionacea (Mollusca: Bivalvia). *Malacology Data Net* 3:1–30.
- Hoggarth, MA. 1999. Descriptions of some of the glochidia of the Unionidae (Mollusca: Bivalvia). *Malacologia*, 41: 180-298.
- Hove, M.C. e Neves, R.J. 1994. Life history of the endangered James spiny mussel *Pleurobema collina* (Conrad, 1837) (Mollusca: Unionidae). *American Malacological Bulletin*, 11, 29-40.
- Hove, MC; Hillegass, KR; Kurth, JE; Pepi, VE; Lee, CJ; Knudsen, KA; Kapuscinski, AR; Mahoney, PA; Bomier, MM. 2000. Considerations for conducting host suitability studies. *Freshwater mollusk symposia proceedings, part I. Proceedings of the Conservation, Captive Care, and Propagation of Freshwater Mussels Symposium*, Ohio Biological Survey, Columbus, 27-34.
- Howard, A.D. 1915. Some exceptional cases of breeding among Unionidae. *The Nautilus*, 29: 4-11.
- Hudson, RG; Isom, B. 1984. In vitro culture of parasitic freshwater mussel glochidia. *The Nautilus*, 96: 147–151.
- Hudson, RG; Shelbourne, CW. 1990. Improved in vitro culture of parasitic freshwater mussel glochidia Report to the Tennessee Valley Authority.
- Hudson, RG; Roberts, CE. 1997. Chronic toxicity effects of Pigeon River sediment when used to culture freshwater juvenile mussels. Report Tennessee Wildlife Resources Division, p. 61.
- Hudson, RG; McKissic, RQ. 1999. Chronic toxicity effects of Conasauga and Teleco River sediments when used to culture freshwater juvenile mussels. Report Tennessee Wildlife Resources Division, p. 49.
- Hudson, RG; Wade, DC; McKinney, AD; Martin, RD. 1994. Comparative response of selected non-target aquatic organism to commercial molluscicide. Resumo. 15th Annual Meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Denver, EUA. 186 p.
- Hudson, RG; Barfield, ML; McKinney, AD. 1996. Species specificity and effect of pH on the response of freshwater mussel juveniles to acute copper toxicity. 88th Annual National Shellfish Association Meeting, Baltimore, EUA. 25 p.

- Hupé, MH. 1857. Mollusques. In: Animaux Nouveaux ou Rares Recueillis Pendant L'expédition dans les Parties Centrales de L'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para. P. Bertrand, Libraire (editeur). Paris, 123 p.
- Ihering, H. 1890. Revision der von Spix Brasilien gesammelten Najaden. Archiv für Naturgeschichte, 56(1): 117-170.
- Ihering, R. 1893. Najaden von S. Paulo und die geographische Verbreitung der Süßwasserfauna von Südamerika. Archiv für Naturgeschichte, 59: 45-140.
- Isom, BG; Hudson, RG. 1982. Culture of freshwater mussel glochidia in an artificial habitat utilizing complex liquid growth media. US Patent 4,449,480. 18 pp.
- Jacobson, PJ; Farris, JL; Cherry, DS; Neves, RJ. 1993. Juvenile freshwater mussel (Bivalvia: Unionidae) responses to acute toxicity testing with copper. Environmental Toxicology and Chemistry, 12: 879-883.
- Jenkinson, J. 1982. Cumberlandian mollusk conservation program, In A.C., Miller (ed), Report of freshwater mollusks workshop, US Army Engineer Waterways Experiment Station, Environmental Laboratory, Vicksburg, EUA. 185 p.
- Johnson, IS; Keller, AE; Zam, SG. 1993. A method for conducting acute toxicity tests with the early life stages of freshwater mussels. Standard Technical Publication 1179, ASTM, Philadelphia.
- Jones, JW; Mair, RA; Neves, RJ. 2005. Factors Affecting Survival and Growth of Juvenile Freshwater Mussels Cultured in Recirculating Aquaculture Systems. North American Journal of Aquaculture, 67: 210-220.
- Jones, JW; Hallerman, EM; Neves, RJ. 2006. Genetic management guidelines for captive propagation of freshwater mussels (Unionoidea). Journal of Shellfish Research, 25(2): 527-535.
- Kat, PW. 1984. Parasitism and the Unionacea (BIVALVIA). Biological Reviews, 59: 189-207.
- Keller, AE; Zam, SG. 1990. Simplification of in vitro culture techniques for freshwater mussels. Environmental Toxicological Chemistry, 9: 1291-1296.

- Kirk, SG; Layzer, JB. 1997. Induced metamorphosis of freshwater mussel glochidia on nonhost fish. *The Nautilus*, 110(3): 102-106.
- Kondo, Y; Sano, SI. 2009. Origination of extant heteroconch families: Ecological and environmental patterns in post-Paleozoic bivalve diversification. *Paleontological Research*, 13(1): 39–44.
- Korniushin, AV. 1998. Review of the studies on freshwater mollusk systematic carried out by the Russian taxonomic school. *Bivalvia I: Malacological Review Supplement*, 7: 65-82.
- Kuster, HC. 1856. *Systematisches Conchylien Cabinet* (1848), 1852-1862.
- Lee, HH; Mora, DA. 2005. Survival of glochidias of freshwater mussels, *Pyganodon grandis* (Mollusca: Unionidae), *in vitro* in the United States. *World Aquaculture*, 36(4): 56-60.
- Lefevre, G; Curtis, WC. 1912. Studies on the reproduction and artificial propagation of fresh-water mussels. *Bulletin of the Bureau of Fisheries* 30: 107-201.
- Lima, P; Uthaiwan, K; Satit, K; Machado, J. 2006. In vitro culture of glochidia from the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Invertebrate Biology*, 125(1): 34-44.
- Loveless, R; Raymond, S; Inman, J; Hudson, R; Fairfax, M. 1999. Isolation, identification and control of bacteria which threaten in vitro cultures of freshwater mussel glochidias. 1st Symposium of the Freshwater Mollusk Conservation Society, Chattanooga. 79 p.
- Mackie, GL. 1984. Bivalves. In Karl Wilbur (ed.) *THE MOLLUSCA*, vol 7, cap 5, pg. 351-418.
- Mansur, MCD. 1970. Lista dos moluscos bivalves das famílias Hyriidae e Mycetopodidae para o Estado do Rio Grande do Sul. *Iheringia, Zoologia*, 39: 33-95.
- Mansur, MCD. 1972. Morfologia do sistema digestivo de *Castalia undosa martensi* (IHERING, 1891) (BIVALVIA, HYRIIDAE). *Iheringia, Zoologia*, 41: 21-34.

- Mansur, MCD. 1973. Morfologia do sistema digestivo das espécies do gênero *Diplodon* Spix, 1827 do rio Guaíba, Rio Grande do Sul (Unionacea, Hyriidae). *Iheringia Zoologia*, 43: 75-90.
- Mansur, MCD. 1999. Gloquídio de *Diplodon martensi* (Ihering) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) e seu ciclo parasitário. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(2): 185-194.
- Mansur, MCD; Anflor, LM. 1981. Diferenças morfológicas entre *Diplodon charruanus* ORBIGNY, 1835 e *D. Pilsbryi* MARSHALL, 1928 (Bivalvia, Hyriidae). *Iheringia, Zoologia*, 60: 101-116.
- Mansur, MCD; Campos-Velho, NMR. 1990. Técnicas para o estudo dos gloquídeos de Hyriidae (Mollusca, Bivalvia, Unionoida). *Acta Biológica Leopoldensia, São Leopoldo*, 12(1): 5-18.
- Mansur, MCD; Silva, MGO. 1999. Description of glochidia of five species of freshwater mussels (HYRIIDAE: UNIONOIDEA) from South America. *Malacologia*, 41(2): 475-483.
- Mansur, MCD; Campos-Velho, NMR. 2000. The glochidium of *Castalia martensi* (Ihering 1891) (Bivalvia, Unionoida: Hyriidae). *Heldia*, 3(1): 06-10.
- Mansur, MCD; Schulz, C; Garces, LMMP. 1987. Moluscos bivalves de água doce: identificação dos gêneros do sul e leste do Brasil. *Acta Biológica Leopoldinense*, 9(2): 181-202.
- Mansur, MCD; Santos, CP; Darrigan, G; Heydrich, I; Callil, CT; Cardoso, FR. 2003. Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, na Lagoa Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(1): 75-84.
- Martínez, S; Del Rio, C. 2002. Las provincias malacológicas miocenas y recientes del Atlántico sudoccidental. *Anales de Biología*, 24: 121-130.
- Martinez, S; Figueiras, A; Da Silva, JS. 1993. A New Unionoidea (Mollusca, Bivalvia) from the Tacuarembó Formation (Upper Triassic-Upper Jurassic), Uruguay. *Journal of Paleontology*, 67(6): 962-965.
- Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

- Mayr, E. 1971. Populations, Species, and Evolution. Harvard University Press, second printing , 453 p.
- McMahon, RF; Bogan, AE. 2001. Mollusca: Bivalvia. In: Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. 2nd Edition, Academic Press. Pp. 331-429.
- McMichael, DF; Hiscock, ID. 1958. A monograph of the freshwater mussels (MOLLUSCA: PELECYPODA) of the Australian region. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 9(3): 372-508.
- Meyers, TR; Millmann, RE; Fustish, CA. 1980. Glochidiosis of salmonid fishes. IV. Humoral and tissue responses of coho and chinook salmon to experimental infection with *Margaritifera*. Journal of Parasitology, 66: 274-281.
- Milam, CD; Farris, JL; Van Hassel, J; Barfield, ML. 2000. Reintroduction of native freshwater mussels using in vivo and in vitro propagation techniques. Freshwater mollusk symposia proceedings, part I. Proceedings of the Conservation, Captive Care, and Propagation of Freshwater Mussels Symposium, Ohio Biological Survey, Columbus, 53-61.
- Modell, H. 1942. Das natürliche System der Najaden. Archiv für Molluskenkunde 74: 161-191.
- Modell, H. 1964. Das natürliche System der Najaden. Archiv für Molluskenkunde 93: 71-129.
- Morrison, JPE. 1956. Family relationships of the North American fresh water mussels. American Malacological Union Annual Reports for 1955: 16-17.
- Morrison, JPE. 1973. The families of the pearly freshwater mussels. Bulletin of the American Malacological Union, Inc. 38: 45-46.
- Morton, LS; Herbst, R. 2001. Nuevas especies del género *Diplodon* Spix (Bivalvia, Unionidea) del Jurásico Medio (Formación La Matilde), provincia de Santa Cruz, Argentina. Revista Museo Argentino Ciencias Naturales, 3(2): 159-164.
- Mummert, A; Newcomb, TJ; Neves, RJ; Parker, B. 2006. Evaluation of a recirculating pond system for rearing juvenile freshwater mussels at White Sulphur Springs National Fish Hatchery, West Virginia, USA. American Malacological Bulletin, 21(1-2): 1-10.

- Neves, FF. 2005. Análise prospectiva dasá de risco à erosão na microbacia hidrográfica do rio Bonito (Descalvado – SP), potencialmente poluidoras por dejetos de granjas. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos, 199 p.
- Neves, RJ. 1999. Conservation and commerce: management of freshwater mussel (BIVALVIA: UNIONOIDEA) resources in the United States. *Malacologia*, 41(2): 461-474.
- Neves, RJ; Zale, AV. 1982. Freshwater mussels (Unionidae) of Big Moccasin creek, southwest Virginia. *The Nautilus*, 96(2): 52-54.
- Neves, RJ; Weaver, LR; Zale, AV. 1985. An evaluation of host fish suitability for glochidia of *V. vanuxemi* and *V. nebulosa* (Pelecypoda: Unionidae). *American Midland Naturalist*, 113(1): 13-19.
- Neves, RJ; Bogan, AE; Williams, JD; Ahlstedt, SA; Hartfield, PW. 1997. Status of aquatic mollusks in the southeastern United States: a downward spiral of diversity. In: G.W.Benz e D.E.Collins (ed) *Aquatic fauna in peril: the Southeastern perspective*, .Publicação especial 1. Decatur, GA, EUA: Southeast Aquatic Research Institute, Lenz Design and Communications. p 43–85.
- Newell, ND. 1969. Classification of Bivalvia. pp. N205-N224. In R.C. Moore (ed.). *Treatise on Invertebrate Paleontology, Part N, Mollusca*, 6. Volume 1: Bivalvia. Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- O’Beirn, FX; Neves, RJ; Steg, MB. 1998. Survival and growth of juvenile freshwater mussels (Unionidae) in a recirculating aquaculture system. *American Malacological Bulletin*, 14(2): 165-171.
- O’Connel, MT; Neves, RJ. 1999. Evidence of immunological responses by a host fish (*Ambloplites rupestris*) and two non-host fishes (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) to glochidia of a freshwater mussel (*Villosa iris*). *Journal of Freshwater Ecology*, 14: 71-78.
- Ortmann, A.E. 1910. A new system of the Unionidae. *Nautilus*, 23: 114-120
- Ortmann, A.E. 1911. The anatomical structure of certain exotic Najades compared with that of the North American forms. *Nautilus*, 24: 103-108, 114-120, 127-131.

- Ortmann, A.E. 1912. Notes upon the families and genera of the Najades. *Annals of the Carnegie Museum*, 8: 222-365.
- Ortmann, AE. 1921. South American Naiades: a contribution to the knowledge of the freshwater mussels of South America. *Memoirs of the Carnegie Museum*, 8(3): 451-670.
- Owen, C; Alexander, JE; McGregor, M. 2009. Control of microbial contamination during in vitro culture of larval unionid mussels. *Invertebrate Reproduction Development*, in press.
- Pain, T; Woodward, FR. 1961. A revision of the freshwater mussels of the family Etheriidae. *Journal of Conchology*, 25: 2–8.
- Parodiz, JJ. 1969. The Tertiary Non-Marine Mollusca of South America. *Systematic Zoology*, 19(3): 306-307.
- Parodiz, JJ. 1973. The species complex of *Diplodon delodontus* (Lamarck) (Unionacea – Hyriidae). *Malacologia*, 14: 247-270.
- Parodiz, JJ. 1982. Distribution and origin of the continental South America malacofauna. *Malacologia*, 22(1-2): 421-425.
- Parodiz, JJ; Bonetto, AA. 1963. Taxonomy and zoogeographic relationships of the South American naiades (PELECYPODA: UNIONACEA: MUTELACEA). *Malacologia*, 1(2): 179-213.
- Penn, GH. 1939. A study of the life cycle of the freshwater mussel, *Anodonta grandis*, in New Orleans. *Nautilus*, 52: 99-101.
- Pillow, MJ; Crownhart, AK; Barnhart, MC. 2008. The role of conglomerates in the survival of glochidias larvae. 6th Biennial International Symposium of the Freshwater Mollusk Conservation Society, 19 - 24 April, Baltimore, Maryland.
- Pilsbry, HA. 1911. Non-marine mollusca of Patagonia. Reprinted from the Reports of Princeton University Expedition to Patagonia, 1896-1899, vol. III.
- Rafinesque, CS. 1820. Monographie des coquilles bivalves fluviatiles de la Riviere Ohio, contenant douze genres et soixante-huit especes. *Annales Générales des Sciences Physiques*, Bruxelles 5(13): 287-322.

- Ricciardi, A; Neves, RJ; Rasmussen, JB. 1998. Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionoida) following the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion. *Journal of Animal Ecology*, 67(4): 613-619.
- Roe, KJ; Lydeard, C. 1998. Molecular systematics of the freshwater mussel genus *Potamilus* (Bivalvia: Unionidae). *Malacologia*, 39: 195-205.
- Rogers, CL; Dimock, RV. 2003. Acquired resistance of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* to glochidia larvae of the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) following multiple infections. *Journal of Parasitology*, 89: 51-56.
- Rogers-Lowery, CL; Dimock, RV. 2006. Encapsulation of attached ectoparasitic glochidia larvae of freshwater mussels by epithelial tissue on fins of naive and resistant host fish. *Biological Bulletin*, 210(1): 51-63
- Rogers-Lowery, CL; Dimock, RV; Kuhn, RE. 2007. Antibody response of bluegill sunfish during development of acquired resistance against the larvae of the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis*. *Development e Comparative Immunology*, 31: 143-155.
- Rogers, SO. 1999. Population biology of the tan riffle shell (*Epioblasma florentina walkeri*) and the effects of substratum and light on juvenile mussel propagation. Dissertação de Mestrado. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, EUA. 121 p.
- Rosen, DE. 1978. Vicariance patterns and historical explanations in biogeography. *Systematic Zoology*, 27: 159-188.
- Sachs, I. 1993. Estratégias de transição para o século XXI. In: Bursztyn, M. (org.) Para pensar o desenvolvimento sustentável. Ed. Brasiliense, Brasília. Pp. 29-56.
- Say, T. 1817. Conchology. In W. Nicholson (ed.), American Edition of the British Encyclopedia or Dictionary of Arts and Sciences, Comprising an Accurate and Popular View of the Present Improved State of Human Knowledge 2: 15 p.
- Schneider, JA. 2001. Bivalve systematic during the 20th century. *Journal of Paleontology*, 75(6): 1119-1127.

- Scholz, H; Hartman, JH. 2007. Paleoenvironmental reconstruction of the upper cretaceous hell creek formation of the Williston basin, Montana, USA: implications from the quantitative analysis of unionid bivalve taxonomic diversity and morphologic disparity. *Palaos*, 22: 24-34.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2004. Solutions for sustainable mariculture - avoiding the adverse effects of mariculture on biological diversity. CBD Technical Series, 12.
- Seshaiya, RV. 1969. Some observations on the life-histories of south Indians freshwater mussels. *Malacologia*, 9: 286-287.
- Silva-Souza, AT; Eiras, JC. 2002 The Histopathology of the Infection of *Tilapia rendalli* and *Hypostomus regani* (Osteichthyes) by Lasidium Larvae of *Anodontites trapesialis* (Mollusca, Bivalvia) *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 97(3): 431-433.
- Simone, LRL. 2006. Land and freshwater mollusks of Brazil. EGB, FAPESP, São Paulo.
- Simpson, C.T. 1900. Synopsis of the Naiades, or pearly freshwater mussels. *Proceedings of the. U.S. National Museum* 22: 501-1044.
- Simpson, C.T. 1914. A Descriptive Catalogue of the Naiades or Pearly Freshwater Mussels, Volumes I to III. Privately published by Bryant Walker, Detroit, Michigan.
- Tankersley, RA. 2000. Fluorescence techniques for evaluating the lipid content of larval and juvenile mussels. *Freshwater mollusk symposia proceedings, part I. Proceedings of the Conservation, Captive Care, and Propagation of Freshwater Mussels Symposium*, Ohio Biological Survey, Columbus, 115-125.
- Tankersley, RA; Butz, SW. 1998. Design, construction and evaluation of a laboratory-scale recirculating aquaculture system for the captive care of freshwater mussels. *Freshwater mollusk symposia proceedings, part I. Proceedings of the Conservation, Captive Care, and Propagation of Freshwater Mussels Symposium*, Ohio Biological Survey, Columbus, 127-134.
- Telda, S; Fernando, CH. 1969. Observations on the glochidia of *Lampsilis radiata* (Gmelin) infesting Yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchell) in the Bay of Quinte, Lake Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 47: 705-712.

- Thiele, J. 1934. Handbuch der Systematischen Weichtierkunde. Verlag von Gustav Fisher, Berlin, 779-1154.
- Tompa, AS. 1979. Life cycle completion of the freshwater clam *Lasmigona compressa* (Bivalvia: Unionidae) in an experimental host, *Lebistes reticulatus*. Veliger, 22: 188-190.
- Uthaiwan, K; Noparatnaraporn, N; Machado, J. 2001. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. Aquaculture, 195: 61-69.
- Uthaiwan, K; Pakkong, P; Noparatnaraporn, N; Vilarinho, L; Machado, J. 2002. Study of a suitable fish plasma for in vitro culture of glochidia *Hyriopsis myersiana*. Aquaculture, 209: 197–208.
- Uthaiwan, K; Pakkong, P; Noparatnaraporn, N; Vilarinho, L; Machado, J. 2003. Studies on the plasma composition of fish hosts of the freshwater mussel, *Hyriopsis myersiana*, with implications for improvement of the medium for culture of glochidia. Invertebrate Reproduction and Development, 44(1): 53-61.
- Villella, RF; Smith, DR; Lemarie, DP. 2004. Estimating Survival and Recruitment in a Freshwater Mussel Population Using Mark-recapture Techniques. American Midland Naturalist, 151:114–133.
- Visconti, G; Elorriaga, EE; Parras, A. 2003. Sedimentitas marinas de la Formación Barranca Final (Mioceno medio-superior de la cuenca del Colorado), aflorantes en El sureste de la provincia de La Pampa, Argentina. Revista de la Asociación Geológica Argentina, 58(2): 187-193.
- Wächtler, K; Mansur, MCD; Richter, T. 2001. Larval types and early postlarval biology in Naiads (Unionoida). In G. Bauer e K. Wächtler (eds) Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida Ecological Studies, vol. 145, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Waller, DL; Mitchell, LG. 1989. Gill tissue reactions in walleye *Stizostedion vitreum vitreum* and common carp *Cyprinus carpio* to glochidia of the freshwater mussel *Lampsilis radiata siliquoidea*. Diseases of Aquatic Organisms, 6: 81–87.
- Watters, GT. 1996. Small dams as barriers to freshwater mussels (BIVALVIA: UNIONOIDEA) and their hosts. Biological Conservation, 75: 79-85.

- Watters, GT. 2000. Freshwater mussels and water quality: a review of the effects of hydrologic and instream habitat alterations. Freshwater mollusk symposia proceedings, part I. Proceedings of the Conservation, Captive Care, and Propagation of Freshwater Mussels Symposium, Ohio Biological Survey, Columbus, 1-14.
- Watters, GT; O'Dee, SH. 1996. Shedding of untransformed glochidia by fishes parasitized by *Lampsilis fasciola* Rafinesque, 1820 (Mollusca: Bivalvia: Unionidae): Evidence for acquired immunity in the field? Journal of Freshwater Ecology, 11: 383-389.
- Watters, GT; O'Dee, SH. 1998. Metamorphosis of Freshwater Mussel Glochidia (Bivalvia: Unionidae) on Amphibians and Exotic Fishes. American Midland Naturalist, 139: 49-57.
- Wesselingh, EP; Ranzi, A; Räsänen, ME. 2006. Miocene freshwater Mollusca from western Brazilian Amazonia. Scripta Geologica, 133: 419-437.
- Williams, JD; Warren, LW; Cummings, KS; Harris, JL; Neves, RJ. 1993. Conservation status of freshwater mussels of the United States and Canada. Fisheries, 18 (9): 6-22.
- Winterringer, R. 2004. Population dynamics and reproductive patterns of the federally endangered freshwater mussel, *Lampsilis streckeri* (Frierson 1927). Dissertação de Mestrado. Arkansas State University, Arkansas, EUA. 74 p.
- Yeager, BL, Neves, RJ. 1986. Reproductive cycle and fish hosts of the rabbit's foot mussel, *Quadrula cylindrical strigillata* (Mollusca: Unionidae) in the upper Tennessee River drainage. American Midland Naturalist, 116: 329-340.
- Yeager, M. M., Cherry, D. S., Neves, R. J. 1994. Feeding and burrowing behaviors of juvenile rainbow mussels, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae). Journal of the North American Benthological Society 13:217-222.
- Yonge, CM. 1957. Mantle fusion in the Lamellibranchia. Pubblicazioni di Stazione Zoologica di Napoli, 29: 151-171.
- Yonge, CM. 1982. Mantle margins with a revision of siphonal types in the Bivalvia. Journal of Molluscan Studies, 48: 102-103.

- Young, M; Williams, J. 1984a. The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (LINN.) in Scotland. I. Field studies. Archives Für Hydrobiologia, 99(4): 405-422.
- Young, M; Williams, J. 1984b. The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (LINN.) in Scotland. II. Laboratory studies. Archives Für Hydrobiologia, 100(1): 29-43.
- Zale, AV; Neves, RJ. 1982. Fish hosts of four species of lampsiline mussels (MOLLUSCA: UNIONIDAE) in Big Moccasin Creek, Virginia. Canadian Journal of Zoology, 60: 2535-2542.
- Zimmerman, LL. 2003. Propagation of Juvenile Freshwater Mussels (Bivalvia: Unionidae) and Assessment of Habitat Suitability for Restoration of Mussels in the Clinch River, Virginia. Dissertação de Mestrado, Virginia Polytechnic Institute, Virginia, EUA. 129 p.
- Zimmerman, LL; Neves, RJ. 2002. Effects of temperature on duration of viability for glochidia of freshwater mussels (BIVALVIA: UNIONIDAE). American Malacological Bulletin, 17(1/2): 31-35.

ANEXOS

ANEXO A. Distribuição atual da família Hyriidae, no Brasil, segundo Simone (2006)

Superfamília UNIONOIDEA

Família HYRIIDAE

Sub família HYRIINAE

Gênero *Triplodon*

Triplodon chodo

Bacia do Amazonas, Bacia das Guianas

Gênero *Prisodon*

Prisodon corrugatus

Bacia do Amazonas

Prisodon obliquus

Bacia do Amazonas

Gênero *Paxyodon*

Paxyodon syrmatophorus

Bacia do Amazonas

Gênero *Callonaia*

Callonaia duprei

Bacia do Amazonas

Gênero *Castalia*

Castalia ambigua

Bacia do Amazonas, Tocantins, São Francisco, Paraná e Prata

Castalia inflata

Bacia do Paraná

<i>Castalia martensi</i>	Bacia do Baixo Paraná, Sul do Brasil, Uruguai e Microbacias Atlântico
<i>Castalia multisulcata</i>	Antilhas, Venezuela, Guianas, Colombia, Acre, Microbacias Atlântico
<i>Castalia nehringi</i>	Bacia do Alto Paraná
<i>Castalia orinocensis</i>	Rio Orinoco
<i>Castalia psamoica</i>	Bacia do Paraná
<i>Castalia undosa</i>	Bacia do Alto Paraná
Gênero Castaliella	
<i>Castaliella sulcata</i>	Guiana, Suriname, Bacia do Amazonas
Gênero Diplodon	
<i>Diplodon besckeanus</i>	Microbacias Atlântico (BA a SP)
<i>Diplodon delodontus</i>	Bacia do Paraná, Microbacias Atlântico (RS a Uruguai)
<i>Diplodon ellipticus</i>	Bacia do Alto São Francisco, Bacia do Alto Paraná, Microbacias Atlântico (ES a RS)
<i>Diplodon expansus</i>	Bacia do Alto Paraná, Microbacias Atlântico (RS a Uruguai)
<i>Diplodon fontainianus</i>	Bacia do Alto Paraná, Microbacias Atlântico (ES a PR)
<i>Diplodon granosus</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná, Microbacias Atlântico (BA a SP)
<i>Diplodon multistriatus</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná, Microbacias Atlântico (BA a SC)
<i>Diplodon parallelipipedon</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná
<i>Diplodon parodizi</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná
<i>Diplodon patagonicus</i>	Patagônia, Argentina

<i>Diplodon rhuacoicus</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná, Microbacias Atlântico (RJ a Uruguai)
<i>Diplodon wymanii</i>	Bacia do Médio-Baixo Paraná
Gênero Rhipidodonta	
<i>Rhipidodonta burroughiana</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná
<i>Rhipidodonta charruana</i>	Bacia do Paraná, Microbacias Atlântico (SP a Uruguai)
<i>Rhipidodonta funebris</i>	Bacia do Baixo Paraná
<i>Rhipidodonta grata</i>	Bacia do Paraná
<i>Rhipidodonta hylaea</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do Paraná
<i>Rhipidodonta rhombea</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do São Francisco
<i>Rhipidodonta suavidica</i>	Bacia do Amazonas, Bacia do São Francisco
<i>Rhipidodonta variabilis</i>	Bacia do Paraná

Anexo B. Parâmetros abióticos medidos no ponto de coleta no rio Mogi Guaçu, município de Porto Ferreira, São Paulo.

	2007			2008									
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out
Turbidez (NTU)	15,9	50,5	50,0	167,0	147,0	157,0	87,0	38,9	32,4	28,4	37,1	24,1	19,3
Oxigênio dissol. (g/ml)	6,2	6,9	7,3	7,6	8,2	7,9	7,2	9,5	9,2	8,8	9,1	9,1	10,2
Temperatura (°C)	25,7	25,8	28,0	23,0	25,0	21,5	21,4	19,0	20,2	19,1	20,2	22,4	23,1
Condut. elétrica (US)	106,7	107,3	103,4	107,1	96,2	66,8	69,4	76,4	68,7	75,3	79,2	67,8	72,3
Vazão do rio (m ³ /s)		90,40	154,98	297,97	294,86	229,60	152,63	120,79	106,27	79,54	61,69	63,01	66,99

Obs: os dados da vazão do rio são referentes a uma média mensal entre os anos de 1997 a 2007.