

## Reprodução e larvicultura de *Holothuria grisea* Selenka, 1867 (Holothuroidea: Aspidochirotida) em laboratório: resultados iniciais no sul do Brasil

### Reproduction and larval culture of *Holothuria grisea* Selenka, 1867 (Holothuroidea: Aspidochirotida) in the hatchery: initial results in southern Brazil

Guilherme S. Rupp<sup>1</sup> , Robson C. Da Costa<sup>2</sup> , Adriano W. C. Marenzi<sup>2</sup> , Gilberto C. Manzoni<sup>2</sup> , Idalício S. da Silva<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Epagri/Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca, Rod. Admar Gonzaga 1188, Florianópolis, SC, Brasil. 88010-970.

<sup>2</sup>Centro Experimental de Maricultura, Centro de Ciência Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Rua Maria Emília da Costa, 228, Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. 88385-000.

**Correspondência:** Guilherme S. Rupp, **E-mail:** [rupp@epagri.sc.gov.br](mailto:rupp@epagri.sc.gov.br).

Artículo original | Original article

#### Palavras-chave

Pepinos-do-mar  
Aquicultura  
Desova  
Cultivo larval

**RESUMO** | A produção de formas jovens em laboratório é uma etapa fundamental para a implantação e desenvolvimento da aquicultura de pepinos-do-mar. No Brasil, poucos estudos nesse sentido foram realizados, sendo *Holothuria grisea* considerado o holoturoide com maior potencial para cultivo. Esta tem ocorrência no litoral brasileiro, até Santa Catarina, seu limite sul de distribuição. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de técnicas para indução à desova e cultivo de larvas de *H. grisea*, registrando-se seu crescimento, sobrevivência e desenvolvimento. Adultos foram coletados em substrato areno-rochoso na zona entremarés, na Armação do Itapocoroy, Penha, SC, Brasil em fevereiro de 2021. Após determinação do índice gonádico dos reprodutores, foram realizadas indução à desova e fertilização dos ovócitos. As larviculturas foram realizadas em sistema estático, com trocas de água diárias, e foram testados dois métodos: um com troca de água completa e outro com renovação parcial (80%), onde as larvas eram mantidas nas unidades de cultivo. O índice gonádico dos reprodutores apresentou-se baixo (0,85%). Dois exemplares responderam aos estímulos de indução, sendo uma fêmea, que liberou 150.000 ovócitos (135,8µm). Após 48 horas, verificou-se 23,3% de recuperação de larvas auriculárias iniciais (375,5µm). Decorridos 20 dias de experimento, foram observadas larvas auriculárias finais com comprimento médio de 876,8µm (±65,5) e a sobrevivência final foi de 0,51% (±0,04) no tratamento com troca total de água. Já no outro tratamento não houve larvas sobreviventes ao final do experimento. Com este primeiro ensaio de reprodução e larvicultura de *H. grisea* em seu limite sul de distribuição conclui-se que há possibilidade de induzir a desova e cultivar larvas de *H. grisea* utilizando técnicas empregadas para outros holoturoides, mesmo com baixo índice gonádico dos reprodutores. Torna-se necessário o prosseguimento de estudos para melhor compreensão do ciclo reprodutivo de *H. grisea* e determinar protocolos de cultivo adequados para esta espécie.

#### Keywords

Sea cucumber  
Aquaculture  
Spawning  
Larval culture

**ABSTRACT** | Hatchery production of juveniles is considered fundamental for the development of sea cucumber aquaculture. In Brazil, where *Holothuria grisea* is considered the holothuroid with the greatest potential for aquaculture, few studies in this regard have been carried out. This species occurs along the Brazilian coast, up to Santa Catarina State, its southern limit of distribution. The objective of this work was to evaluate techniques for induction of spawning and cultivation of *H. grisea* larvae, recording their growth, survival, and development. Adults were collected in a sandy-rocky substrate in the intertidal zone, in Armação do Itapocoroy, Penha, SC, Brazil in February 2021. After determining the gonad index of broodstock, spawning induction and fertilization of the oocytes were performed. The larval cultures were carried out in static system, with daily water changes, and two methods were tested: one with complete water change and the other with partial renewal (80%), where the larvae were kept in the cultivation units. The gonad index of the broodstock was low (0.85%). Two specimens responded to induction stimuli, one female, which released 150,000 oocytes (135.8µm). After 48 hours, there was 23.3% recovery of initial auricularia (375.5µm). After 20 days, final auricularia with an average length of 876.8µm (±65.5) were observed, and final survival was 0.51% (±0.04) in the treatment with total water change. In the other treatment, however, there were no surviving larvae at the end of the experiment. With this first trial to reproduce *H. grisea* in its southern limit of distribution, it is concluded that it

is possible to induce spawning and to cultivate *H. grisea* larvae using techniques used for other holoturoids, even though a low gonad index of the broodstock was recorded. It is necessary to continue studies for a better understanding of the reproductive cycle of *H. grisea* and to determine appropriate cultivation protocols for this species.

## INTRODUÇÃO

O cultivo de pepinos-do-mar é uma atividade emergente em países do Indo-Pacífico, tais como China, Japão, Austrália, Índia, Madagascar, Filipinas e Vietnã, entre outros (Purcell *et al.* 2012; Toral-Granda *et al.* 2008). Na América Latina, estudos recentes vêm sendo realizados no Equador, México, Colômbia e Brasil (Sonnenholzner-Varas 2021). O crescente interesse no desenvolvimento do cultivo de pepinos-do-mar deve-se não apenas ao seu elevado valor comercial nos mercados asiáticos (Purcell *et al.* 2018), mas também devido às propriedades bioativas e medicinais de interesse farmacêutico (Shi *et al.* 2016), além do importante papel ecológico desses organismos no ambiente marinho (Purcell *et al.* 2016). Deve-se destacar, que grande parte dos estoques de pepinos-do-mar se encontra sobre-explotado ou mesmo colapsado em vários países, havendo uma demanda mundial por estes organismos que supera a capacidade de oferta dos estoques naturais (Conand 2017; Purcell *et al.* 2013). Com isso, a aquicultura torna-se a única maneira sustentável de suprir essa crescente demanda. Várias espécies são cultivadas comercialmente na Ásia, onde as principais são *Holothuria (Metriatyla) scabra* Jaeger, 1833 e *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) (Purcell *et al.* 2012), cuja produção de juvenis em laboratório é fundamental para o desenvolvimento dos cultivos. Esta envolve diversas etapas, que incluem a obtenção e maturação de reprodutores, indução à desova, fertilização, cultivo das fases larvárias, metamorfose e subsequente cultivo de juvenis (Renbo e Yuan 2004; Agudo 2006). No Brasil *Holothuria (Halodeima) grisea* Selenka, 1867 é uma espécie de interesse comercial com potencial para a aquicultura e que já se apresenta ameaçada pela captura ilegal (Ponte e Feitosa 2019; Souza Junior *et al.* 2017; Rupp e Marenzi 2021). Esta espécie apresenta distribuição geográfica desde a região do Golfo do México, Caribe até o litoral brasileiro, sendo seu limite sul de distribuição o estado de Santa Catarina (Martins 2012). Extensa é a literatura sobre a reprodução e cultivo de holoturoides em laboratório (Renbo e Yuan 2004; Agudo 2006; Mercier *et al.* 2012; Huang *et al.* 2018; Rakaj *et al.* 2019; Zacarias-Soto *et al.* 2013). Entretanto, para *H. grisea*, encontrou-se apenas o trabalho de Marques (2016), que realizou indução à desova, cultivo larval e produção experimental de juvenis em laboratório no estado do Ceará, região nordeste do Brasil, o que representou um importante avanço para o conhecimento da Biologia dessa espécie. Entretanto, as taxas de sobrevivência obtidas foram consideradas baixas para propósitos de aquicultura, sendo necessária a otimização das metodologias empregadas, a fim de desenvolver protocolos que permitam a produção em larga escala. O objetivo do presente trabalho foi iniciar estudos em laboratório sobre a reprodução de *Holothuria grisea* em seu limite sul de distribuição geográfica e avaliar o uso de técnicas empregadas em outros holoturoides para induzir à desova e cultivar larvas. O índice gonadossomático dos reprodutores, a porcentagem de indivíduos que liberaram gametas, bem como o diâmetro dos ovócitos, a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento larval foram registrados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção de reprodutores

Os exemplares de *Holothuria grisea* (Fig. 1) foram coletados manualmente na zona intermareal, em substrato arenoso-rochoso na enseada da Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, (26°47'18" S; 48°36'19" W) durante a baixa-mar de sizígia em fevereiro de 2021 (verão austral). Cerca de 40 indivíduos adultos foram acondicionados em um recipiente com água marinha do local (temperatura 26,0°C; salinidade 31psu). O tempo de transporte ao laboratório foi de aproximadamente 5 minutos, onde foram submetidos à limpeza para a retirada do material aderido ao corpo dos indivíduos. As coletas dos holoturoides foram realizadas sob licença para coleta de fauna nativa do Ministério do Meio Ambiente, MMA/SISBIO no. 68215 e cadastro de acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado da biodiversidade brasileira MMA/SISGEN no. A61927E. No dia seguinte à desova, os organismos foram devolvidos ao seu habitat original.



**Figura 1.** Exemplares de *Holothuria grisea* durante a indução à desova. (barra = 1 cm) (foto dos autores).

### **Biometria e determinação do índice gonadossomático**

Um lote de 20 organismos foi separado, aleatoriamente, para biometria, dissecação e determinação do índice gonadossomático. Inicialmente cada organismo foi manipulado a fim de induzir a contração corporal e a eliminação do fluido interno, passando-os em seguida, em papel absorvente para remoção do excesso de água nas paredes do corpo. O comprimento total e largura na sessão média do corpo foram obtidos com auxílio de régua graduada (mm); o peso úmido total com auxílio de balança digital Quimis BG 400 (0,001g). Todos os organismos foram identificados individualmente, com auxílio de bandas elásticas com etiquetas dispostas ao redor do corpo, e anestesiados em um recipiente contendo solução de cloreto de magnésio em água marinha (7mg/L). Ao verificar-se a ausência de tônus muscular e resposta a estímulos tácteis, procedia-se a dissecação, onde eram separadas as paredes do corpo, gônadas e vísceras (trato digestivo, sistema hemal e árvore respiratória). O excesso de líquido de cada órgão era removido com auxílio de papel absorvente e em seguida era realizada a pesagem. O índice gonadossomático foi determinado pela razão entre o peso úmido das gônadas e o peso úmido das demais partes do corpo (Hopper *et al.* 1998) expresso em porcentagem:  $(IG=PG/(PP+PV)*100)$ , onde: IG=índice gonadossomático, PG=peso das gônadas, PP=peso das paredes do corpo e PV=peso das vísceras.

### **Indução à liberação dos gametas**

Os procedimentos para indução da desova foram adaptados de métodos recomendados por Agudo (2006) para *H. scabra*. Os demais exemplares vivos foram transferidos para um tanque de polietileno (1,1m x 0,6m x 0,5m) com 100L de água marinha filtrada (1 $\mu$ m), esterilizada (UV) e com temperatura de 27,2 $\pm$ 0,2 $^{\circ}$ C sob aeração constante, onde permaneceram por 60 minutos para eliminação de fezes do trato digestivo. Após esse período, foram submetidos à exposição ao ar (temperatura 26 $^{\circ}$ C) por mais 60 minutos e a seguir expostos à jatos de água e transferidos para um tanque retangular de fibra de vidro (2,05m x 1,25m x 0,3m) contendo 150L de água marinha com recirculação constante, temperatura inicial de 28,0 $^{\circ}$ C, salinidade 33psu e pH 8,12 (Fig. 2). A temperatura foi elevada gradualmente até 30,3 $^{\circ}$ C em um período de 2 horas e os reprodutores foram observados por mais 7 horas para verificar a ocorrência de desova. Os organismos em processo de eliminação de gametas eram transferidos, individualmente, para recipientes com 5L na mesma temperatura da indução, onde permaneceram até finalizar a liberação dos gametas. O número total de ovócitos liberados e o diâmetro foram determinados a partir de alíquotas em triplicata, após diluição e homogeneização em recipiente de 20L.



**Figura 2.** Tanque de indução à desova com exemplares de *Holothuria grisea*. (foto dos autores).

### **Fecundação e desenvolvimento embrionário**

O processo de fecundação foi realizado em um recipiente contendo 20L de água marinha filtrada e esterilizada, através da adição de uma amostra 20mL retirada do recipiente contendo espermatozoides, procedido de suave homogeneização. Na sequência foram observadas amostras sob microscópio até a verificação dos sinais de clivagem da célula ovo. A solução foi então transferida para um tanque de 250L, salinidade de 35psu e suave aeração. Cerca de 48 horas após a fecundação foram observadas larvas no estágio auriculária inicial. Procedeu-se então, a drenagem do tanque com peneira de 70 $\mu$ m, disposta no interior de uma bacia com água marinha. As larvas foram concentradas em um balde de 20L sendo homogeneizada a solução para a coleta de amostras. As contagens (n=20) foram realizadas sob câmara de Sedgwick-Rafter®, com auxílio de microscópio óptico Nikon® e as medições pelo software Motic® Images Plus 2.0ML.

### **Métodos de larvicultura**

Dois métodos de troca de água (em triplicatas) foram testados, denominados TROCA (I) e SIFÃO (II), ambos sob sistema estático, utilizando água marinha filtrada (1 $\mu$ m) e esterilizada (UV). Recipientes plásticos contendo 12L de água marinha, e suave aeração foram utilizados para a estocagem inicial de aproximadamente 0,5 larvas/mL. As trocas de água foram realizadas diariamente.

No tratamento TROCA realizou-se a troca completa de água, vertendo-se todo seu conteúdo em uma peneira com abertura de 120 $\mu$ m, disposta no interior de uma bacia com água marinha, onde as larvas ficavam retidas. As unidades de cultivo eram então limpas com hipoclorito de sódio, enxaguadas e preenchidas com água marinha filtrada e esterilizada (UV). Em seguida as larvas eram devolvidas ao recipiente de cultivo.

No tratamento SIFÃO as trocas de água foram parciais (80%) utilizando-se um sifão, cuja extremidade era colocada no interior de um cilindro de PVC com malha de abertura 120 $\mu$ m, disposto no interior do recipiente de larvicultura, de acordo com Marques (2016). Deste modo as larvas permaneciam no mesmo recipiente de cultivo, evitando-se sua manipulação. A seguir o volume do recipiente era completado com água marinha filtrada e esterilizada. Para a comparação das médias de tamanho e quantidade de larvas entre os tratamentos no sétimo dia de cultivo, utilizou-se o teste “t” de Student para amostras independentes (Sokal e Rohlf 1995) e o software Statistica® 12.

A alimentação foi ministrada uma vez ao dia e consistiu em uma mistura de microalgas composta por 50% *Chaetoceros muelleri*, 25% *Isochrysis galbana* e 25% de *Tetraselmis chuii*, em concentrações entre  $2 \times 10^4$  células/mL a  $4 \times 10^4$  células/mL. Diariamente também foi registrada a temperatura (termômetro infravermelho), a salinidade (refratômetro óptico); em quatro oportunidades foi ainda verificado o pH da água (pHmetro YSI Ecosense 100A). As avaliações e contagens de larvas ( $n=10$ /réplica) foram realizadas no sétimo dia (presença de larvas auriculárias médias) e no vigésimo dia (presença de larvas auriculárias finais), quando foi encerrado o experimento.

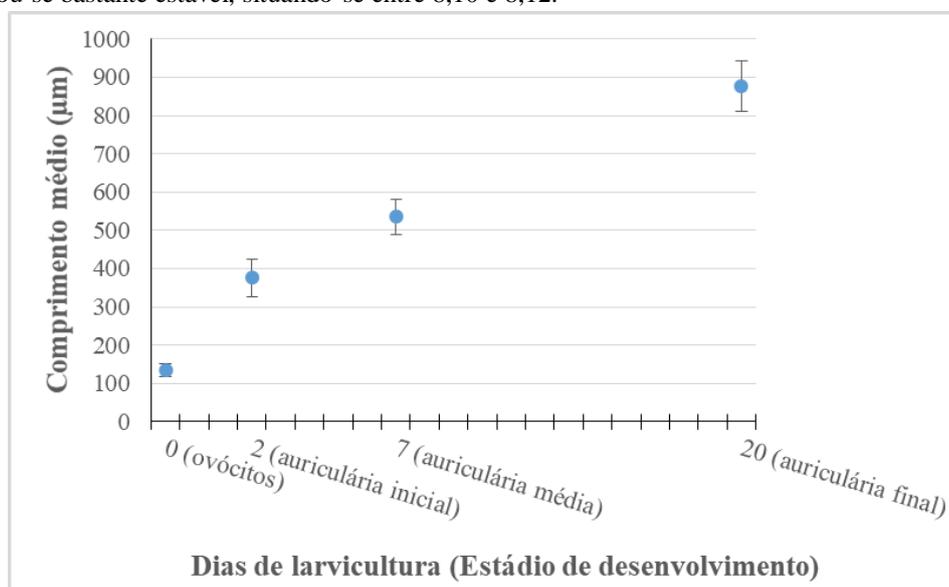
## RESULTADOS

### Liberação de gametas, crescimento e desenvolvimento

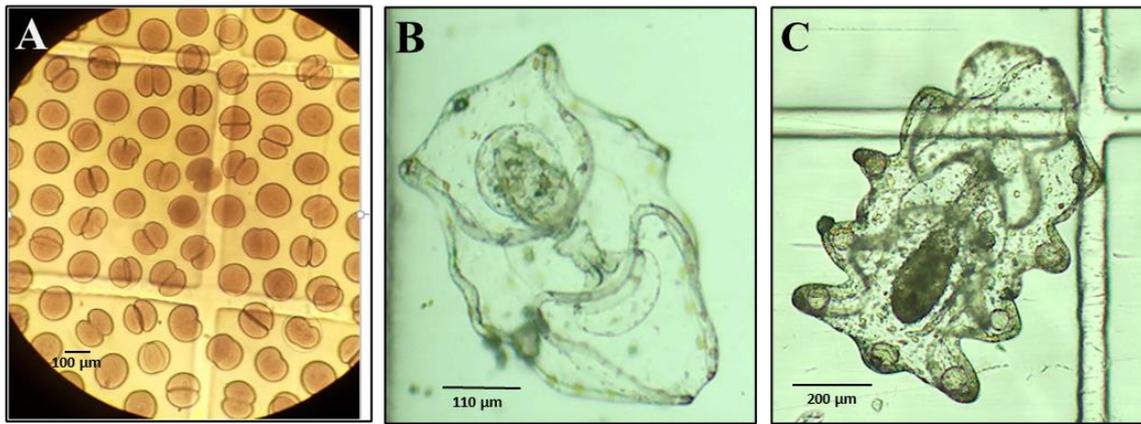
Os reprodutores utilizados na indução à desova apresentavam comprimento médio de 13,21cm ( $\pm 1,74$ ), largura média de 3,09cm ( $\pm 0,34$ ) e peso total médio de 69,15g ( $\pm 19,10$ ). Apenas 5 exemplares apresentavam gônadas conspícuas (3 machos, 2 fêmeas) nos demais exemplares não foi possível identificar o sexo. O índice gonadossomático da amostra foi de 0,85%. Dois exemplares (um de cada sexo) iniciaram a liberação de gametas aproximadamente 6 horas após a elevação de temperatura. Para a fêmea foram contabilizados cerca de 150.000 ovócitos.

Na figura 3 é apresentado o desenvolvimento temporal dos estádios larvais de *Holothuria grisea*. Os ovócitos apresentavam diâmetro médio de 135,8 $\mu$ m ( $\pm 6,7$ ) (Fig. 4a). Após 48 horas da fecundação, verificou-se uma taxa de recuperação de 23,3% de larvas auriculárias iniciais em relação ao número total de ovócitos. As larvas auriculárias iniciais apresentavam comprimento médio de 375,5 $\mu$ m ( $\pm 49,5$ ). Após 7 dias de cultivo as larvas (Fig. 4b) apresentavam um comprimento médio de 535,5 $\mu$ m ( $\pm 46,1$ ) e 542,4 $\mu$ m ( $\pm 48,2$ ) respectivamente nos tratamentos I e II, não havendo diferenças significativas entre estes (teste “t”  $p > 0,1$ ). As larvas auriculárias finais apresentaram comprimento médio de 876,8 $\mu$ m ( $\pm 65,5$ ) (Fig. 4c).

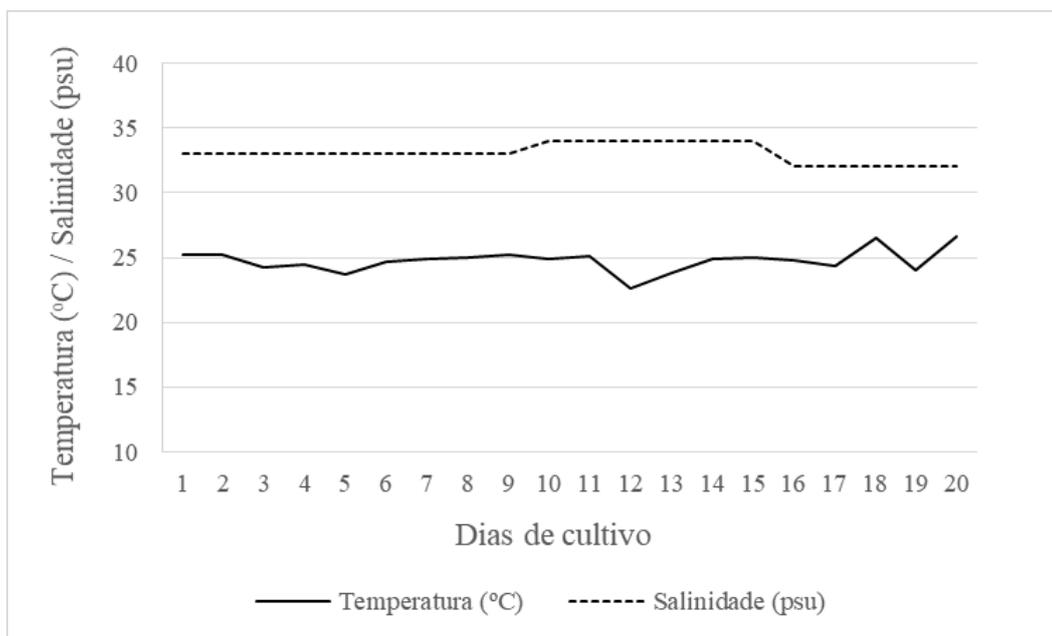
No tratamento TROCA foi registrado, no sétimo dia, a média de 2.500 ( $\pm 1.700$ ) larvas auriculárias médias, o que representou uma sobrevivência de 44,5% em relação às auriculárias iniciais. Ao final de 20 dias a percentagem de sobrevivência foi de 0,51% de auriculárias finais em relação ao número inicial de larvas. No tratamento SIFÃO verificou-se no sétimo dia, uma média de 2.660 ( $\pm 1040$ ) larvas (cerca de 45,7% de sobrevivência) não havendo diferenças significativas entre os tratamentos (teste “t”  $p > 0,1$ ); nenhuma larva sobreviveu ao vigésimo dia. A temperatura e salinidade (média  $\pm$  desvio padrão) durante o período de larvicultura foram de 24,8 °C ( $\pm 0,9$ ) e 33,1 psu ( $\pm 0,8$ ), respectivamente (Fig. 5). O pH apresentou-se bastante estável, situando-se entre 8,10 e 8,12.



**Figura 3.** Crescimento e respectivos estádios de desenvolvimento de *Holothuria grisea* (média  $\pm$  sd) em relação ao tempo de larvicultura.



**Figura 4.** (A) Ovócitos e embriões em clivagem. (B) Larva auriculária média (7 dias) - comprimento total 545 µm. (C) Larva auriculária final (20 dias) - comprimento total 906 µm.



**Figura 5.** Temperatura (°C) e salinidade (psu) registradas durante o período de larvicultura.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A produção de juvenis de pepinos-do-mar em laboratório compreende uma série de etapas, sendo a disponibilidade de reprodutores maduros e o domínio dos protocolos para a indução à desova e larvicultura, consideradas fundamentais. No presente trabalho, pretendeu-se dar início à obtenção de informações relativas à estas etapas de cultivo em laboratório para *H. grisea*, como parte integrante de um projeto para desenvolver protocolos para cultivo integral de pepinos-do-mar no estado de Santa Catarina.

Um dos problemas frequentemente relatados em relação aos reprodutores, é a capacidade de evisceração que os holoturoides apresentam, em resposta a situações de estresse tais como, transporte e manipulação (Agudo 2006; Marques 2016). Quando isso ocorre, os organismos tornam-se impróprios para a indução à desova. Tal fato não se verificou no presente estudo, indicando que *H. grisea* tolerou bem os procedimentos de indução, sem que ocorresse a evisceração, sendo portanto, um aspecto positivo para sua reprodução em laboratório. Entretanto, deve-se ressaltar que, neste estudo, o tempo de transporte foi curto devido à proximidade entre o laboratório e o local de coleta.

Verificou-se resposta positiva dos reprodutores aos estímulos utilizados para a indução à desova, os quais consistiram na exposição ao ar, seguidos de jatos de água e elevação da temperatura da água. Entretanto, apenas um pequeno número de exemplares liberou gametas. Isso se deve ao fato de que a maioria dos reprodutores não se encontrava em condições adequadas de maturação gonádica, o que fica evidente através do baixo índice gonadossomático (0,85%) e do pequeno número de organismos que apresentavam gônadas conspícuas (25%). Pouco se sabe sobre o ciclo reprodutivo de *H. grisea* no sul do Brasil. Bueno *et al.* (2015) verificou que no estado do Paraná (Lat. 25°55'S), esta espécie apresenta indivíduos maduros ao longo de todo o ano, com maior atividade sexual em fevereiro. Já no Nordeste do Brasil, Leite-Castro *et al.* (2016) verificou a ocorrência de exemplares com máximo índice gonadossomático entre dezembro e abril, e exemplares com sexo indeterminado entre junho e julho. No presente trabalho não se verificou tal comportamento, uma vez que muitos exemplares se encontravam com gônadas indiferenciadas e com baixo índice gonádico no mês de fevereiro, o que pode indicar um padrão diferente de reprodução no limite sul de distribuição geográfica dessa espécie, ou a existência de variação interanual no ciclo reprodutivo.

Outro indicativo de que os organismos do presente estudo não se encontravam adequadamente maduros, foi o diâmetro dos ovócitos, uma vez que Bueno *et al.* (2015) relata um diâmetro 160 µm para organismos em maturação, e no presente trabalho verificaram-se ovócitos com diâmetro médio de 135 µm. Estudos detalhados sobre o ciclo reprodutivo de *H. grisea* no sul do Brasil, são necessários para um melhor conhecimento dos períodos de reprodução no ambiente natural, os quais são os mais adequados para produção de larvas e juvenis, uma vez que o processo de maturação de reprodutores em laboratório não é dominado para essa espécie.

Foi possível realizar a fertilização dos gametas liberados, e proceder o cultivo das larvas utilizando-se métodos usualmente empregados para outros holoturoídeos, embora a taxa de fertilização e a sobrevivência final de larvas tenham sido baixas. Estes resultados podem ser reflexo da ocorrência de ovócitos imaturos ou com baixa quantidade de reservas bioquímicas para permitir um adequado desenvolvimento embrionário. Até o sétimo dia de cultivo, não houve significativa diferença de sobrevivência entre os métodos de larvicultura testados. Porém aquele em que se realizou troca total de água (TROCA) apresentou melhor sobrevivência final que no sistema em que se utilizou o sifonamento da água (SIFÃO), no qual as larvas permaneceram no mesmo recipiente até o final do cultivo. Este último foi o sistema utilizado por Marques (2016), que verificou sobrevivência de auriculárias finais entre 0,43% e 2,64%.

No presente trabalho, a sobrevivência de auriculárias finais obtida com o método TROCA (0,51%) situou-se próxima àquelas registradas por Marques (2016). É possível que o uso dos mesmos recipientes, sem limpeza e desinfecção no tratamento SIFÃO, tenha propiciado a ocorrência de contaminação, acarretando mortalidade total das larvas após o sétimo dia de cultivo. Baixa sobrevivência larval é também reportada para outras espécies tropicais, tais como *Isostichopus badionotus* (2-5%) (Zacarias-Soto *et al.* 2013). Por outro lado, altas taxas de sobrevivência larval podem ser obtidas quando se utiliza dietas e condições de cultivo adequadas para a espécie (Morgan 2001; Rakaj *et al.* 2019). Ao final da fase de auriculária ocorre o processo de metamorfose onde se sucedem as etapas de doliolária e pentácula. O pequeno número de larvas sobreviventes ao final da larvicultura, impossibilitou o prosseguimento do experimento para as etapas pós-metamorfose, que deverão ser objeto de estudos futuros. Portanto, fica evidente a necessidade de otimização dos protocolos de larvicultura de *H. grisea* para aumento da sobrevivência durante a fase larval de modo a permitir seu aproveitamento em aquicultura.

Quarenta e oito horas após a fertilização, as larvas auriculárias iniciais apresentavam em média 345 µm de comprimento, já Marques (2016) registrou um comprimento médio de cerca de 312µm nesta mesma fase de desenvolvimento. Aos sete dias de cultivo as larvas do presente trabalho encontravam-se no estágio de auriculária média e apresentavam comprimento de 535,5µm. Marques (2016) relata nessa mesma fase, larvas entre 626µm e 787µm, respectivamente, nos tratamentos com dieta mista e dieta unialgal de *Chaetoceros muelleri*. Portanto, as larvas obtidas no presente estudo, inicialmente apresentavam maior tamanho que aquelas obtidas no nordeste do Brasil, porém, com o desenvolvimento, esta situação se inverteu. O tempo de cultivo para atingir auriculária final no presente trabalho foi de 20 dias, quando estas

apresentavam comprimento médio de 876,8µm. Já Marques (2016) registrou a ocorrência de larvas nessa fase aos 13 dias de cultivo, com comprimento médio de 985,67µm, quando alimentadas apenas com *C. muelleri*. Entretanto, quando alimentadas com uma dieta mista de *C. muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis* houve diminuição do crescimento e da sobrevivência, sendo o estágio de auriculária final atingido em 15 dias. *H. grisea* apresentou, portanto, um desenvolvimento larval mais lento que o registrado no Nordeste do Brasil. As distintas condições de alimentação, podem ter sido responsáveis por estas diferenças, porém a possibilidade de diferenças genéticas não deve ser descartada.

A quantidade e a qualidade das microalgas são fatores fundamentais para o desenvolvimento de holoturoides. Agudo (2006) recomenda concentrações entre 20.000 e 40.000 cels/mL para *H. scabra*, sendo estas as concentrações utilizadas por Marques (2016) para *H. grisea*, e também no presente estudo. As espécies geralmente utilizadas em cultivo de larvas de holoturoides compreendem *C. muelleri*, *I. galbana*, *C. calcitrans*, *Rodomonas salina* e *Tetraselmis* sp. (Agudo 2006), sendo as duas primeiras frequentemente utilizadas e apresentam bons resultados (Laguerre *et al.*, 2020; Rakaj *et al.*, 2018). No presente estudo 3 dessas espécies foram utilizadas. De maneira geral considera-se que uma dieta mista apresenta melhores resultados que dietas unialgais (Agudo 2006). Entretanto, Marques (2016) obteve melhor resultado de crescimento e sobrevivência utilizando uma dieta unialgal de *Chatoceros muelleri*. Já a combinação desta com *Thalassiosira fluviatilis* resultou em menor crescimento e maior mortalidade de larvas de *H. grisea*. Portanto, para *H. grisea* mais estudos são necessários para a determinação de dietas que atendam os requerimentos nutricionais, de modo a permitir um melhor rendimento da larvicultura.

A temperatura, salinidade e o pH são fatores que merecem atenção em estudos sobre o desenvolvimento larval de holoturoides (Asha e Muthiah 2005; Li e Li 2010). Consideram-se temperaturas entre 26 e 30°C como ótimas para o desenvolvimento de espécies tropicais tais como *H. scabra* e *H. atra* (Agudo 2006; Gamboa *et al.* 2012). Marques (2016) realizou as larviculturas em temperaturas (29°C) superiores às utilizadas no presente estudo (24,8°C) o que pode ter sido determinante para as menores taxas de crescimento observadas. Os valores de salinidade permaneceram dentro do intervalo de flutuação no ambiente natural de *H. grisea* na região de estudo (Vidolin *et al.* 2002). O pH apresentou-se estável, situando-se próximo ao recomendado por Asha e Mutiah (2005) para *H. spinifera* e também similar ao utilizado para *H. marmorata* e *Bohadschia marmorata* (Laxminarayana 2005) e *Isostichopus badionotus* (Zacarias-Soto *et al.* 2013). Portanto estes fatores não parecem ter influenciado o crescimento e a sobrevivência das larvas.

O presente estudo determina o marco inicial dos parâmetros de crescimento e sobrevivência de larvas de *H. grisea* de uma população do Sul do Brasil, distanciada em aproximadamente 25° de latitude do estado do Ceará, o que representa uma distância hipotética em linha reta de cerca de 1.500 km, ou cerca de 4.000 km em linha de costa. Assim é possível que estas populações apresentem características genéticas e reprodutivas distintas. Os resultados deste estudo servirão como referência e base de comparação para futuros trabalhos visando o desenvolvimento de protocolos para o cultivo de *H. grisea* do sul do Brasil. Estes resultados permitem, ainda, recomendar a realização de estudos adicionais, necessários ao desenvolvimento de tecnologia de cultivo de *H. grisea*. Dentre estes podemos destacar a comparação entre distintos métodos para a indução à desova; a realização induções à desova em distintas épocas do ano, de modo a coincidir com o período de reprodução dessa espécie no ambiente; determinação das dietas com requerimentos nutricionais mais adequados ao crescimento e sobrevivência de larvas; comparação de distintas densidades de cultivo e técnicas de manejo, bem como estudos sobre indução à metamorfose e cultivo de juvenis.

Em conclusão, no presente estudo as técnicas utilizadas para o transporte de reprodutores, indução à desova, fertilização dos gametas e cultivo de larvas auriculária mostraram-se adequadas para *H. grisea*, representando um avanço em várias das etapas para o desenvolvimento de tecnologia para cultivo dessa espécie em laboratório no Sul do Brasil. Entretanto, os reprodutores utilizados não se apresentavam em adequada condição de maturação, mesmo sendo realizado o experimento em um período que, supostamente, estes poderiam estar em fase reprodutiva. Isso pode ter prejudicado as taxas de fertilização e de sobrevivência larval. O método de larvicultura em que houve diariamente troca total de água, resultou, após

o sétimo dia de cultivo, em menor mortalidade de larvas, comparado com o sistema em que foram realizadas trocas de água parciais. A sobrevivência final das larvas pode ser considerada baixa para propósitos de aquicultura, e recomenda-se o prosseguimento de estudos para uma melhor compreensão do ciclo reprodutivo de *H. grisea* e para a redução da mortalidade durante a larvicultura. O desenvolvimento de protocolos de cultivo em laboratório adequados para esta espécie poderá contribuir para o uso sustentável deste importante recurso natural renovável e abrir perspectivas para a implantação de uma nova alternativa para a maricultura no Sul do Brasil.

#### **Declaração de conflito de interesses dos autores**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

#### **Declaração de boas práticas no uso de animais**

Este trabalho seguiu todas as diretrizes internacionais, nacionais e institucionais aplicáveis ao cuidado e uso de animais. As coletas de *H. grisea* foram realizadas sob licença do Ministério do Meio Ambiente, MMA / SISBIO nº. 68215 e cadastro de acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional associado da biodiversidade brasileira MMA / SISGEN no. A61927E.

#### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC, pelo apoio ao projeto “Bases para o desenvolvimento da aquicultura de pepinos-do-mar (Echinodermata: Holothuroidea) em Santa Catarina” - 2021TR0658.

#### **REFERÊNCIAS**

- Agudo N. (2006). Sandfish hatchery techniques. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Secretariat of the Pacific Community (SPC) & WorldFish Center, Noumea. 43pp.
- Asha P.S., Muthiah P. (2005). Effects of temperature, salinity and pH on larval growth, survival and development of the sea cucumber *Holothuria spinifera* Theel. *Aquaculture*, 250(3–4):823–829. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.075>
- Bueno M.L., Tavares Y.A.G., di Domenico M., Borges M. (2015). Gametogenesis and weight change of body organs of the sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea* (Aspidochirotida: Holothuriidae) in Southern Brazil. *Revista de Biologia Tropical*, 63:285–296. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i2.23163>
- Conand C. (2017). Expansion of global sea cucumber fisheries buoys exports. *Revista de Biología Tropical*, 65:(S1–S10). <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i1-1.31661>
- Gamboa R.U., Aurelio R.M., Ganad D.A., Concepcion L.B., Abreo N.A.S. (2012). Small-scale hatcheries and simple technologies for sandfish (*Holothuria scabra*) production. In: Hair C.A., Pickering T.D., Mills D.J. (eds). Asia-Pacific Tropical Sea Cucumber Aquaculture, Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, *ACIAR Proceedings*, 136:63–74.
- Hopper D.R., Hunter C.L., Richmond R.H. (1998). Sexual reproduction of the tropical sea cucumber, *Actinopyga mauritiana* (Echinodermata: Holothuroidea), in Guam. *Bulletin of Marine Science*, 63(1):1–9.
- Huang W., Huo D., Yu Z., Ren C., Jiang X., Luo P., Chen T., Hu, C. (2018). Spawning, larval development and juvenile growth of the tropical sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Aquaculture*, 488:22–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.013>
- Laguerre H., Raymond G., Plan P., Améziane N., Bailly X., Le Chevalier P. (2020). First description of

- embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture*, 521(May 2019). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734961>
- Laxminarayana A. (2005). Induced spawning and larval rearing of the sea cucumbers, *Bohadschia marmorata* and *Holothuria atra* in Mauritius. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 22:48–52.
- Leite-Castro L., Souza Junior J., Salmito-Vanderley C.S.B. Nunes J.F., Hamel J.F., Mercier A. (2016). Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. *Marine Biology*, 163(3). <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2842-x>
- Li L., Li Q. (2010). Effects of stocking density, temperature, and salinity on larval survival and growth of the red race of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture International*, 18(3):447–460. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9256-4>
- Marques D.F. (2016). Crescimento, sobrevivência e desenvolvimento larval do pepino do mar *Holothuria grisea*: Alimentação com diferentes microalgas. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará. 70pp.
- Martins L.R. (2012). Estudo taxonômico dos Holothuroidea (Echinodermata) de águas rasas da costa Brasileira. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia. 120pp.
- Mercier A., Ycasa H.R., Espinoza, R., Haro V.M., Hamel J.F. (2012). Hatchery experience and useful lessons from *Isostichopus fuscus* in Ecuador and Mexico. In: Hair C.A., Pickering T.D., Mills D.J. (eds.). *Asia-Pacific Tropical Sea Cucumber Aquaculture*, Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, *ACIAR Proceedings*, 136:79–90.
- Morgan A.D. (2001). The effect of food availability on early growth, development and survival of the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 14:6–12.
- Ponte I.A.R., Feitosa, C.V. (2019). Evaluation of an unreported and unregulated sea cucumber fishery in eastern Brazil. *Ocean and Coastal Management*, 167:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2018.09.016>
- Purcell, S.W., Conand, C., Uthicke, S., Byrne, M. (2016). Ecological Roles of Exploited Sea Cucumbers. In: Hughes, R.N., Hughes, D.J., Smith I.P., Dale, A.C. (eds). *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 54:367–386.
- Purcell S.W., Hair C.A., Mills D.J. (2012). Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: Progress, problems and opportunities. *Aquaculture*, 368–369:68–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.053>
- Purcell S.W., Mercier A., Conand C., Hamel J.F., Toral-Granda M.V., Lovatelli A., Uthicke S. (2013). Sea cucumber fisheries: Global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish and Fisheries*, 14(1):34–59. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2011.00443.x>
- Purcell S.W., Williamson D.H., Ngaluafé P. (2018). Chinese market prices of beche-de-mer: Implications for fisheries and aquaculture. *Marine Policy*, 91:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.02.005>
- Rakaj A., Fianchini A., Boncagni P., Lovatelli A., Scardi M., Cataudella S. (2018). Spawning and rearing of *Holothuria tubulosa*: A new candidate for aquaculture in the Mediterranean region. *Aquaculture Research*, 49(1):557–568. <https://doi.org/10.1111/are.13487>

- Rakaj A., Fianchini A., Boncagni P., Scardi M., Cataudella, S. (2019). Artificial reproduction of *Holothuria polii*: A new candidate for aquaculture. *Aquaculture*, 498:444–453. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.060>
- Renbo W., Yuan C. (2004). Breeding and culture of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, Liao. FAO Fisheries Technical Paper, 463:277–286.
- Rupp G.S., Marenzi A.C. (2021). Holotúrias do litoral de Santa Catarina (Brasil): captura ilegal e potencial para a aquicultura. In: De Donato M., González-Henríquez N., Rey-Méndez M., Baltazar-Guerrero P.M., Sonnenholzner-Varas J., Alió Mingo J.J., Lodeiros C. (eds). *Proceedings Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui.* 10:607–618.
- Shi S., Feng W., Hu S., Liang S., An N., Mao Y. (2016). Bioactive compounds of sea cucumbers and their therapeutic effects. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(3):549–558. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-4334-8>
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995). *Biometry: The principles and Practices of Statistics in Biological Research.* W. H. Freeman and Co., New York, USA. 887pp.
- Sonnenholzner-Varas J.J. (2021). ¿Hacia dónde va la acuicultura de equinodermos en América Latina? Potencial, retos y oportunidades. *Revista de Biología Tropical*, 69(Suppl.1):514–549. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69isuppl.1.46393>
- Souza Junior J., Ponte I.A.R, Melo Coe C., Lobo Farias W.R., Vieira Feitosa C., Hamel J.-F., Mercier, A. (2017). Sea cucumber fisheries in Northeast Brazil. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 37:43–47.
- Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (2008). Sea cucumbers. A global review of fishery and trade. FAO Fisheries Technical Paper, 516. 317pp.
- Vidolin D., Gouvea I.A.S., Freire C.A. (2002). Estabilidade osmótica dos fluídos celômicos de um pepino do mar (*Holothuria grisea*) e de uma estrela-do-mar (*Asterina stellifera*) (Echinodermata) expostos ao ar durante a maré baixa: um estudo de campo. *Acta Biológica Paranaense*, 31:113–121. <https://doi.org/10.5380/abpr.v31i0.611>
- Zacarías-Soto M., Olvera-Novoa M.A., Pensamiento-Villarauz S., Sánchez-Tapia, I. (2013). Spawning and larval development of the four-sided sea cucumber, *Isostichopus badiotus* (Selenka 1867), under controlled conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(5):694–705. <https://doi.org/10.1111/jwas.12061>

Recibido: 15-09-2021  
Aprobado: 29-10-2021  
Versión final: 05-11-2021

