

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS - PPGCTRA

ATIVIDADE DIÁRIA E REPRODUÇÃO DO GASTRÓPODE
Pomacea amazonica (REEVE, 1856)

IZOMAR BARBOSA MELO

ITACOATIARA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS - PPGCTRA

IZOMAR BARBOSA MELO

ATIVIDADE DIÁRIA E REPRODUÇÃO DO GASTRÓPODE
Pomacea amazonica (REEVE, 1856)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Sampaio
Sant'Anna Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Yomar Hattori

ITACOATIARA
2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M528a Melo, Izomar Barbosa
ATIVIDADE DIÁRIA E REPRODUÇÃO DO GASTRÓPODE
Pomacea amazonica (REEVE, 1856) / Izomar Barbosa Melo. 2015
58 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Bruno Sampaio Sant'Anna
Coorientador: Gustavo Yomar Hattori
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. comportamento. 2. ampullaridae. 3. fecundidade. 4.
desenvolvimento embrionário. 5. amazônia. I. Sant'Anna, Bruno
Sampaio II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

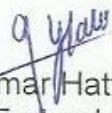
IZOMAR BARBOSA MELO


Atividade diária e reprodução do gastrópode
Pomacea amazonica (Reeve, 1856)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 15 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Gustavo Yomar Hattori, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Dr. Renato Soares Cardoso, Membro
Instituto Federal do Amazonas


Dr. Érica de Oliveira Penha Zica, Membro
Universidade Estadual Paulista

Aos meus pais, *Paulo e Circleide* pela educação, incentivo e oportunidade para prosseguir os meus estudos. Aos meus irmãos e amigos pelo incentivo para realização deste trabalho.

O caminho mais curto é sempre tentar
mais uma vez

Thomas Edson

Se não puder voar, corra. Se não puder
correr, ande. Se não puder andar,
rasteje, mas continue em frente de
qualquer jeito.

Martin Luther King

Uma experiência nunca é um fracasso,
pois sempre vem demonstrar algo.

Thomas Edon

O caminho da sabedoria é não ter medo
de errar.

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de inspiração, por ter me dado força, saúde, paz, sabedoria nos momentos difíceis durante a pesquisa, as dúvidas que foram muitas, o cansaço que muitas vezes só acrescentava a vontade de desistir, mas sempre superada ao amanhecer pela vontade de vencer e por me conceder a oportunidade de realizar esse trabalho;

Aos meus familiares principalmente aos meus pais **Paulo e Circleide** que sempre estiveram ao meu lado apoiando nos meus estudos e em todos os momentos difíceis da minha vida o quais serei eternamente grato;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna pelo acompanhamento, paciência e disponibilidade para ensinar, corrigir, orientar, pelos momentos de “cobranças”, pois sei que foi com a finalidade de chegar com sucesso ao fim deste trabalho. O caminho foi longo, mas o ensinamento, aprendizado e amizade desde o período da graduação são considerados como grandes conquistas;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori pelo qual tenho respeito e consideração, pois tem me acompanhado desde a graduação, contribuindo e orientando nos trabalhos acadêmicos;

A todos os professores que tive em minha formação desde a graduação. E aos professores do programa de pós-graduação em especial ao Prof. Dr. Fábio Ferreira professor da disciplina de Biometria Experimental pelo apoio, incentivos e conselhos durante a execução da pesquisa;

Aos colaboradores das bancas examinadoras, dos seminários, projeto de pesquisa, qualificação e defesa da dissertação pelas correções, sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento das pesquisas e de minha formação como profissional;

Aos coordenadores do Programa De Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA), Prof^ª. Dra. Renata Takeara e Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna, pela eficiência na condução do programa, organização, disponibilidade e orientações nos atendimentos solicitados;

Ao prof. Dr. Luiz Ricardo Simone e ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo por auxiliar na identificação das espécies;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudos com auxílio financeiro;

Aos caros colegas e alunos do Laboratório de Zoologia do Grupo de Pesquisa Biologia e Produção de Organismos Aquáticos Amazônicos que contribuíram no projeto, entre eles, Delma Marques, Ellan Pas, Elias Santos, Eudivane Ferreira, Emeson Dantas, Leandro, Loyana, Karine Coelho, Ronilce Pinheiro, principalmente os colegas; Aldeiza Marques, Amilcar Jr, Bruna Lorena, Franciely Pinheiro, Kerolen Costa, Leo Jaime Oliveira, Ozanei Soares, Osmar dos Santos e Timóteo Watanabe pelo auxílio nas coletas, auxílio na

execução dos experimentos. Agradeço ainda pelos momentos que passamos trabalhando juntos que foram marcantes, descontraídos, divergentes, mas que foram fundamentais na construção de novas amizades;

Aos amigos da primeira turma do Curso de Licenciatura em Ciências Química e Biologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia ICET-UFAM, pela amizade e apoio durante a graduação e pós-graduação;

Aos amigos do “Grupo Original Itacity” Andreza Fontinelle, Ana Sara, Eduardo Santos, Eduardo Garcia, Catarina Ymay, David Campos, Hirlane, Jessé Barbosa, Joice, Loryane Fontinelle, Mayara Lúcia, Nadielle Patrícia, Paula Tome e Samuel Smith, pela amizade verdadeira e em todos os momentos apoiaram e incentivaram;

A todos os meus amigos que não citei, mas que tiveram comigo sempre incentivando nos momentos de desânimos para que realizasse essa conquista.

AGRADEÇO

RESUMO

Os gastrópodes do gênero *Pomacea* (Perry, 1810), além da importância ecológica são usados na alimentação humana, são considerados o maior grupo de gastrópodes de água doce. Este estudo investigou a atividade diária e seleção de substrato e a reprodução e seleção de substrato para oviposição do gastrópode *Pomacea amazonica* (Reeve, 1856). Os gastrópodes foram coletados no período de maio a agosto de 2014 no município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. A investigação da atividade diária, seleção de substrato foram realizadas sob condições de luz e temperatura ambiente. Os animais foram observados por 48 horas para registro de suas atividades diárias, e a seleção de substrato foi analisada por quatro diferentes tipos de substratos: areia, seixo, coluna d'água e superfície lisa. No experimento de reprodução e seleção de substrato para oviposição os casais formados foram mantidos em gaiolas, com diferentes substratos, três tipos de lixas de diferentes rugosidades, além da parede lisa do próprio frasco. A atividade de *P. amazonica* foi significativamente diferente ($P < 0,05$), quando comparado o período do dia e da noite. A maior atividade foi registrada durante a noite, cerca de 70% dos indivíduos exploraram o ambiente e durante o dia 72% permaneceram imóveis. A seleção de substrato diferiu significativamente entre os períodos do dia e noite ($X^2 = 22,46$; $Gl = 3$; $P < 0,05$) com maior uso do substrato liso durante o dia e durante a noite a maioria dos animais passaram a usar o substrato seixo. Não houve diferença significativa ($t = -1.1289$; $DF = 172$; $P = 0.2605$) quando comparado o tamanho entre machos e fêmeas da população coletada. Já para o tamanho de machos e fêmeas de cada casal, houve diferença significativa ($Z = 2.4326$; $P = 0.0150$), com machos menores que as fêmeas. Ao todo 29 fêmeas colocaram massas de ovos e destas, 6 colocaram duas massas de ovos consecutivas. As desovas múltiplas apenas das fêmeas que colocaram duas massas de ovos, não apresentaram diferença significativa quanto ao número de ovos ($Z = 0.8090$; $P = 0.4185$). O desenvolvimento embrionário teve média de $10,38 \pm 1,73$ com taxa de eclosão média de 89,6% para primeira desova e 65% para a segunda desova. Entre massas de ovos consecutivas de uma mesma fêmea o diâmetro dos ovos não diferiu ($t = -0.1801$; $GL = 5$; $P = 0,8641$). Observou-se que quanto maior a fêmea, maior a fecundidade, e apesar do baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,22$), a regressão foi significativa ($F = 7,6382$; $Gl = 1$; $P = 0,0099$). A seleção de substrato para oviposição apresentou diferença significativa ($X^2 = 172,55$; $GL = 3$; $P < 0,05$) com preferência dos animais em colocar ovos em superfície lisa. Pode-se concluir que *P. amazonica* tem atividade noturna e a seleção de substrato varia de acordo com o período do dia. Embora o tamanho entre os sexos não seja diferente, no acasalamento de *P. amazonica* as fêmeas preferem os machos menores. A fecundidade desta espécie está diretamente relacionada ao tamanho da fêmea e a postura de massas de ovos ocorre principalmente à noite em superfície de substrato liso. O desenvolvimento embrionário foi relativamente curto em relação a outras espécies do mesmo gênero, e o diâmetro dos ovos não difere entre as desovas consecutivas.

Palavras – Chave: Reprodução, Comportamento, Ampullariidae, Fecundidade, Desenvolvimento embrionário, Amazônia.

ABSTRACT

Gastropods of the genus *Pomacea* (Perry, 1810), as well as ecological importance are used for human consumption, are considered the largest freshwater gastropods group. This study investigated the daily activity and substrate selection of gastropod *Pomacea amazonica* (reeve, 1856), and reproduction and substrate selection for oviposition. The gastropods were collected from May to August of 2014 in the City of Itacoatiara, Amazonas, Brazil. Investigation of daily activity and substrate selection were performed under light and temperature conditions. The animals were observed for 48 hours to record their daily activities and substrate selection was analyzed by four different types of substrates sand, pebbles, water column and smooth surfaces. In reproduction experiment and substrate selection for oviposition graduates couples were kept in cages with different substrates, three types of sandpaper with different roughness, beyond the smooth wall of the bottle itself. *P. amazonica* activity was significantly different ($P < 0,05$), Compared the time of day and night The highest activity was recorded overnight, about 70% of individuals explored the room during the day and 72% remained immobile. The substrate selection differed significantly compared between periods of day and night ($X^2 = 22,46$; $DF = 3$; $P < 0,05$). With greater use of the flat substrate during the day and during the night most of the animals went on to use the substrate pebble There was no significant difference ($t = -1.1289$; $DF = 172$; $P = 0.2605$) as compared size between males and females of the collected population. As for the size of males and females of each couple, there was significant difference ($Z = 2.4326$; $P = 0.0150$), with fewer males than females. Altogether 29 females laid egg masses and of these, 6 left two bodies of consecutive eggs. The multiple spawns only the females that put two egg masses, no significant difference in the number of eggs ($Z = 0.8090$; $P = 0.4185$). Embryonic development averaged 10.38 ± 1.73 mean hatch rate of 89.6% for the first spawn and 65% for the second spawning. Among masses of consecutive eggs of the same female diameter of the eggs did not differ ($t = -0.1801$; $GL = 5$; $P = 0,8641$). It was observed that the higher the female higher fertility, despite the low coefficient of determination ($R^2 = 0.22$), regression was significant ($F = 7,6382$; $Gl = 1$; $P = 0,0099$). The substrate selection for oviposition significantly different ($X^2 = 172,55$; $GL = 3$; $P < 0,05$) with preference animals lay eggs in smooth surface. It can be concluded that *P. amazonica* nocturnal activities and substrate selection varies with the time of day. Although the size of the sexes is not different in *P. amazonica* mating females prefer the smaller males. The fecundity of this species is directly related to female size and egg laying mass occurs mostly at night in smooth substrate surface. Embryonic development was relatively short compared to other species of the same genus, and the diameter of the eggs did not differ between consecutive spawns.

Key - words: Reproduction, Behavior, Ampullariidae, Fertility, Embryo development, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	13
Figure 1 - Map of study region in Itacoatiara.....	19
Figura 2 - View of the tank used in the experiment	20
Figure 3 - Behaviors of <i>Pomacea amazonica</i> observed in the experiment	22
Figure 4 - Diurnal frequencies (%) of the behaviours of <i>Pomacea amazonica</i>	24
Figure 5 - Three-dimensional principal components bubble plot of the daily activity.....	24
Table I – Substrate selection of the gastropod <i>Pomacea amazonica</i>	25
Capítulo II	33
Figura 1. Mapa da região de estudo no Município de Itacoatiara	40
Figura 2. Cópula do casal de <i>Pomacea amazonica</i>	41
Figura 3. Gaiola utilizada para isolamento dos casais de <i>Pomacea amazonica</i>	41
Figura 4. Caixas Plásticas contendo 15 gaiolas com os casais de <i>Pomacea amazonica</i>	42
Figura 5. Massa de ovos de <i>Pomacea amazonica</i> na superfície lisa	43
Figura 6. Massa de ovos, substrato liso, ovos para medidas eclosão dos ovos	44
Figura 7- Classes de tamanho de comprimento da concha (CC) de <i>Pomacea amazonica</i>	46
Figura 8 – Dispersão entre o tamanho das fêmeas e a quantidade de ovos	48
Figura 9 – Massas de ovos colocadas nos diferentes tipos de substratos	48

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUCTION.....	15
2 OBJECTIVE.....	18
3 MATERIAL AND METHODS.....	19
3.1 Data analysis.....	21
4 RESULTS.....	23
5 DISCUSSION.....	26
REFERENCIAS.....	29
CAPÍTULO II.....	33
RESUMO.....	34
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 Geral.....	39
2.1 Específicos.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Coleta dos espécimes.....	40
3.2 Análise dos dados.....	44
4 RESULTADOS.....	46
5 DISCUSSÃO.....	49
REFERENCIAS.....	53
CAPÍTULO III.....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

CAPÍTULO I

DAILY ACTIVITY AND SUBSTRATE SELECTION BY THE GASTROPOD *Pomacea amazonica* (REEVE, 1856)

~



ABSTRACT

Gastropods of the genus *Pomacea* are ecologically important and are used as a source of protein in human food and in the pet market. The use of members of this genus as pets and for aquaculture around the world has enabled these snails to become pests, invading biomes in countries where they do not occur naturally and causing ecological problems. This study investigated the daily activity and substrate preference of *Pomacea amazonica* (Reeve, 1856), in the Amazon. A total of 90 gastropods were caught in Itacoatiara, Amazonas, Brazil. The animals were identified and acclimated for three days in tanks with aerated water and plants from the natural locations for food, with natural light and temperatures. After this period, the snails were observed for 48 h to record their daily activity, using an ethogram with the behaviors: feeding, reproduction (mating or spawning), burying, exploration, immobile (attached or loose on the substrate), social interaction, and floating. The observations were made at 1-h intervals; during the night a red light was used, to minimize the effect of light on the snails' activity. These procedures were conducted in three replicates with 30 animals in each tank, for a total of 90. Substrate selection was analyzed with four different types of substrates: sand, pebbles, water column (if floating) and smooth surfaces (tank wall and plant surfaces). During the day, most individuals remained mainly immobile, and at night more actively explored the environment. The highest activity was recorded at night, with up to 70% of the individuals exploring and up to 20% feeding in this period, demonstrating that *P. amazonica* has a nocturnal activity pattern. Substrate use showed a significant difference between day and night ($X^2=22.46$; $df=3$; $P<0.05$). During the day most individuals used the smooth substrate, whereas at night the animals used the smooth and pebble substrates in similar frequencies. The differential use of substrate is clearly related to daily behavior, because *P. amazonica* showed nocturnal activity, remaining immobile on the smooth substrate most of the time during the day. Information about the activity patterns of mollusk species is essential to comprehend the community dynamics in the natural environment, and is particularly important for *P. amazonica*, whose ecology in its native Amazon region is little known.

Key words: Amazonia, Ampullariidae, gastropod, behavior

1 INTRODUCTION

The approximately 70 species of the ampullariid gastropod genus *Pomacea* are native to Neotropics (Cowie & Thiengo, 2003; Simone, 2006) with a wide geographical distribution (Simone, 2006). Because of their use as food source, members of this genus are often studied (Lum-kong, 1989; Bocanegra *et al.*, 1996, Alves *et al.*, 2006) including in Brazil, where they form part of the human diet in some regions (Barboza *et. al* 2006).

Although the genus is native to South America, many species have been introduced into Asia, and North America (Cowie, 2002; Rawlings *et al.*, 2007, Hayes *et al.*, 2008), mainly for culture for human food, biological control agents, and the aquarium trade (Naylor, 1996; Cowie, 2002). Many were released in rivers and canals, where they rapidly established large populations (Ito, 2002). *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1819) has been cited as the worst invasive species worldwide (Lowe *et al.*, 2000). Introduced *Pomacea* species often become agricultural and environmental pests (Joshi & Sebastian, 2006; Yusa *et al.*, 2006; Rawlings *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2008; Thiengo *et al.*, 2011), causing changes in ecosystem functioning (Carlsson *et al.*, 2004). Adaptation to new localities is facilitated by their feeding behavior, generally herbivorous, although they may feed on eggs of other gastropods and decomposing animal matter, and may become cannibals when food is scarce (Bronson, 2002).

In the tropics and subtropics, these snails are active year-round; in temperate zones they reproduce mainly in spring and summer (Albrecht *et al.*, 1999). In locations with sudden environmental changes, i.e., periods of river flooding or long dry periods, they adapt their reproductive behavior to the local conditions (Watanabe, 2014). Water, temperature and food availability may influence their copulation and spawning behavior (Albrecht *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2006; Collier *et al.*, 2010).

Spawning does not necessarily occur immediately after copulation, because females store sperm and may keep them viable for long periods (Bocanegra *et al.*, 1996). For protection and to facilitate development, spawning occurs above the water level (Rawlings, 2007; Horn *et al.*, 2008; Fasulo, 2014). For example, *Pomacea maculata* (Perry, 1810) places its eggs 15 to 30 cm above the water level; embryonic development ranges from 13 to 16 days, with a hatching rate of 44 to 50% (Bocanegra *et al.*, 1996). The polygonal eggs measure 3 to 5 mm in diameter (Rawlings, 2007). Females rarely spawn during the day, and most copulations occur in the morning (Guimarães, 1981).

Pomacea has a chemical defense strategy in eggs (Snyder & Snyder, 1971; Yusa 2001; Dreon & Heras 2010; Dreon *et al.*, 2013; Dreon *et al.*, 2014). Eggs substances in *P. canaliculata* show a warning coloration to avoid the predation with antinutritive and antidigestive properties which cause a reduction in the egg predation and ensure the survival (Dreon *et al.*, 2013). The biochemistry of Ampullariid in contain perivitelline fluid in the egg mass are associated to defense against egg predation (Dreon *et al.*, 2002; Dreon *et al.*, 2014) as well as protection (Heras, 2007). According Heras *et al.* (2008) and Dreon *et al.* (2013) the presence of toxin in the egg mass is the only genetically coded within an egg, establishing similarity in defense to the predator with plants and bacteria (Dreon *et al.*, 2013; Dreon *et al.*, 2014).

Although the ampullariids are aquatic, their characteristics allow a semi-terrestrial life mode (Burlakova *et al.*, 2010). The presence of both gills and a lung increases their resistance to flood and dry periods (Cowie, 2002), although they require air during flood periods, because restriction of aerial respiration may negatively affect survivorship, activity and feeding Seuffert & Martín (2010). These snails can also estivate for long periods (Burlakova *et al.*, 2010; Bae *et al.*, 2014; Watanabe, 2014), remaining inactive or underground during the

winter (Damborenea, 1996; Seuffert *et al.*, 2010; Seuffert *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2014) or in hot dry seasons such as occur in the Amazon region (Cowie, 2002).

Substrate preference in gastropods varies widely, and many species are associated with macrophytes (Martelo *et al.*, 2006), e.g., juveniles of *P. canaliculata* (Martelo *et al.*, 2008). Substrate use may also be associated with the typically gregarious behavior of pomaceans (Ansell, 2001; Frantini *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002), as well as with the search for food. Both terrestrial and freshwater gastropods search for food by chemical perception (D`Ávila *et al.*, 2006). Thus, mollusks sense chemical compounds in the water and form aggregates (Frantini *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002). Their gregarious behavior may also contribute to finding mating partners.

2 OBJECTIVE

The present study investigated the daily activity and substrate selection of *Pomacea amazonica* (Reeve, 1856).

3 MATERIAL AND METHODS

For the experiment, 90 gastropods of different sizes were collected in May 2014 in Itacoatiara, Amazonas, Brazil ($03^{\circ}08'19.9''\text{S}$ and $058^{\circ}27'32.5''\text{W}$) (Figure 1).

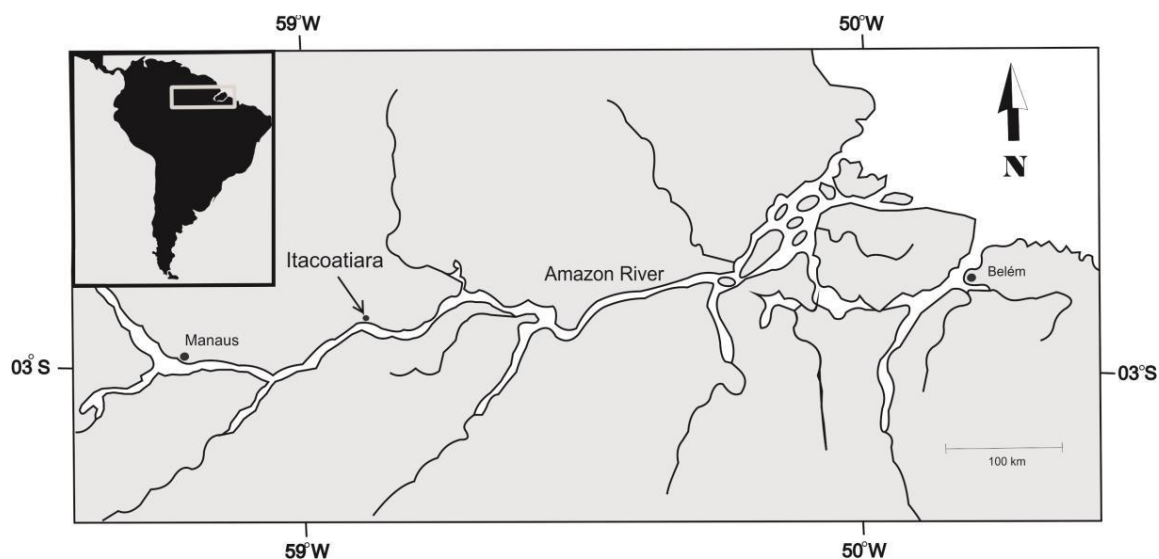


Figure 1 - Map of study region in Itacoatiara (arrow) Amazonas, Brazil.

Fonte: Alison C. Wunderlich.

The snails were collected with hand nets (40 cm diameter, 2 mm mesh) among macrophytes in flooded locations on the Amazon floodplain. The collected gastropods were placed in plastic boxes with water from the environment and aeration, and transported to the laboratory. They were identified by morphological characteristics Simone (2006), and confirmed by previous identification where the specimens of *P. amazonica* were deposited in the Mollusk Collection of the Museum of Zoology, University of São Paulo (MZUSP 106885) and the total shell length was measured with a caliper (0.05 mm).

The animals were kept in round plastic tanks (buckets) (310 L), with aerated water and filtration. To investigate substrate selection, four types of substrate were used. Half of the bottom of the tank was filled with fine sand and the other half with pebbles (diameter 16.80 ± 7.70 mm), each to a depth of 8 cm. The water column was also considered as a substrate, because these snails can float; and the fourth substrate was smooth surfaces, i.e., the

tank wall and plant surfaces (Figure 2). In the experiment, locally collected plants of the creeping river grass *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (Poaceae), locally known as "canarana", were provided as food. Before the observations, the gastropods were acclimated for three days in the tank in natural conditions of light and temperature.

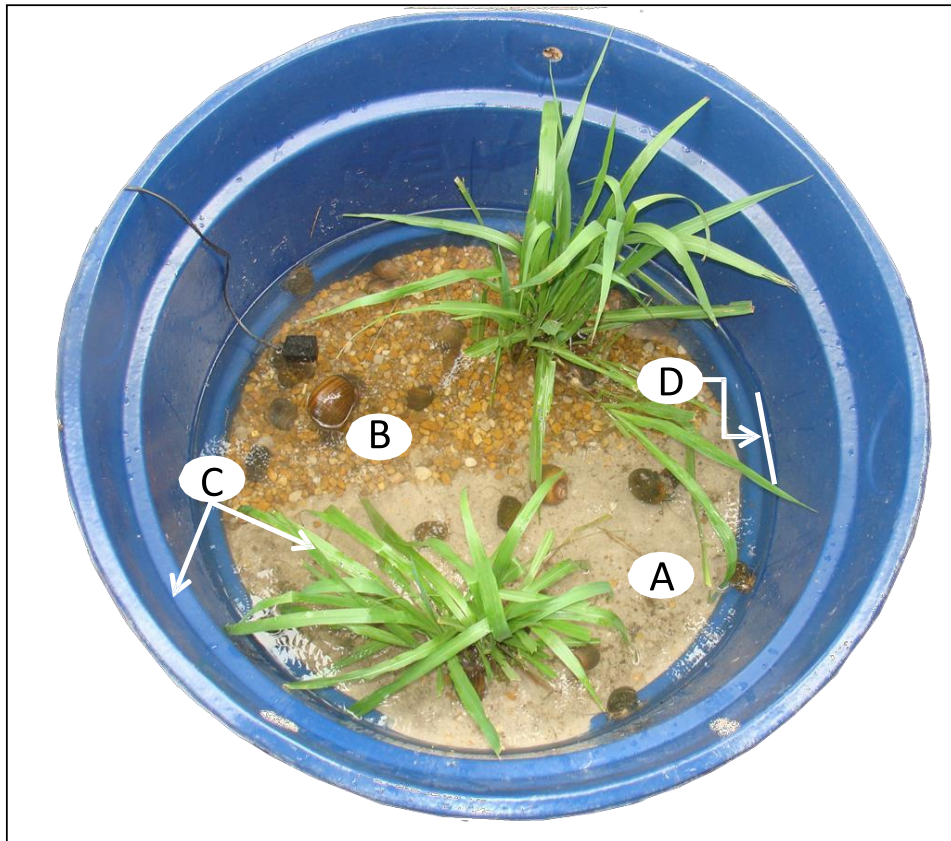


Figure 2 - View of the tank used in the experiment: A) fine sand, B) pebbles, C) smooth surface, tank wall and plant surface, and D) water column.

After acclimation, the gastropods were observed for 48 h and their activity recorded using an ethogram adapted from Watanabe *et. al.* (2014), including the behaviors: 1) feeding; 2) reproduction (mating or spawning); 3) burying, i.e., burrowing into the substrate; 4) floating in the water; 5) immobility loose on the substrate, i.e., inactive and not attached to the substrate; 6) immobility attached to the substrate, i.e., inactive and attached to the substrate; 7) exploration of the environment, i.e., the animal moved, exploring the environment; and 8) social interactions, i.e., contact between two or more snails without mating (Figure 3).

The observer recorded the behaviors from behind a screen with an opening of 10 X 10 cm, at 1-h intervals, and developed by two observers. During the night, a red light was used, to minimize interference with the snails' behavior (Waser, 1968; Chernorizov *et al.*, 1994). All procedures were conducted in three replicates with animals of different sizes, using 30 animals in each tank, totaling 90 animals in the experiment. The temperature and relative air humidity were measured at intervals of 1 h with a digital thermometer (°C) and a thermohygrometer (%), respectively. During the experiment the mean air temperature was 27.29 ± 1.39 °C and the mean relative humidity was 72.80 ± 2.63 %. The pH was measured with a ph-meter (0.01) before and after experiment with mean of 6.77 ± 0.01 and 6.03 ± 0.03 respectively at the end of the experiment the animals were released to the environment.

3.1 Data analysis

The frequencies of the different behaviors of *P. amazonica* were compared between day and night by a principal components analysis (PCA), followed by a bootstrap analysis, with the software *R* (R 2012). This analysis method was proposed by Catlin-Grove *et al.* (2009) and modified by Stafford *et al.* (2012) for the analysis of behavioral monitoring data. The method avoids problems with dependence on repeated measures of behavioral data (Underwood, 1997), and gives the statistical significance for the PCA, not merely a tendency. A frequency distribution was calculated using the overall mean of each replication, with the percentage of the activities. The bootstrap PCA results were determined through a 3D scatterplot of the principal components, where the size of the sphere represents the confidence interval; if the spheres overlap there is no statistical difference, and this analysis used a 95% confidence interval. Substrate selection by *P. amazonica* was compared between day and night by the Chi-square test (X^2), and the day and night temperatures were compared by the *t* test, adopting a significance level of $P < 0.05$ for both tests (Sokal & Rohlf, 1995).

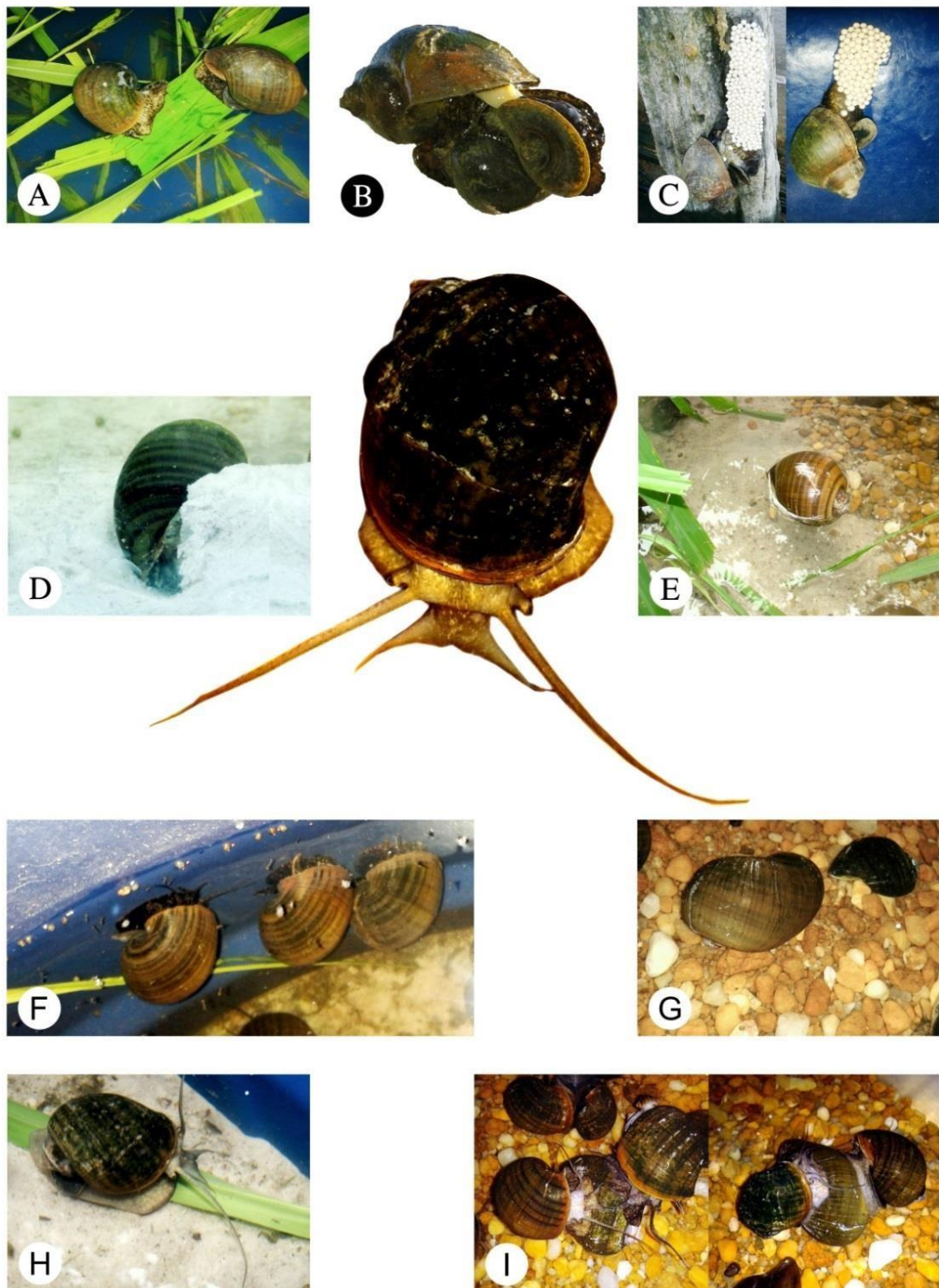


Figure 3 - Behaviors of *Pomacea amazonica* observed in the experiment: A) feeding, B) mating, C) spawning, D) burying, E) floating, F) immobility (attached to the substrate), G) immobility (loose on the substrate), H) exploration of the environment, and I) social interaction.

4 RESULTS

In the experiment on daily activity and substrate selection, a total of 90 individuals of *Pomacea amazonica* with shell lengths averaging 55.44 ± 6.35 mm were used. The mean air temperature during the day was 28.39 ± 1.04 °C and at night was 26.18 ± 0.39 °C, with a significant difference ($t = 15.0412$; $df = 71$; $P < 0.0001$).

During the day about 72% of the individuals remained immobile attached to the substrate; the proportion of snails loose on the substrate remained constant in daytime, reaching a maximum of 32%. At night about 70% of the snails explored the environment (Figure 4).

Feeding was more frequent at night (21%); social interaction between snails was similar, 21% in daytime and 24% at night. Other activities showed low frequencies: 13% for floating; 2% for reproduction, with mating in the morning and spawning at night; and 1% for burying. Egg masses were recorded on the tank wall and plant surfaces between the observation times. The activity of *P. amazonica* was significantly different ($P < 0.05$) between the day and night (Figure 5).

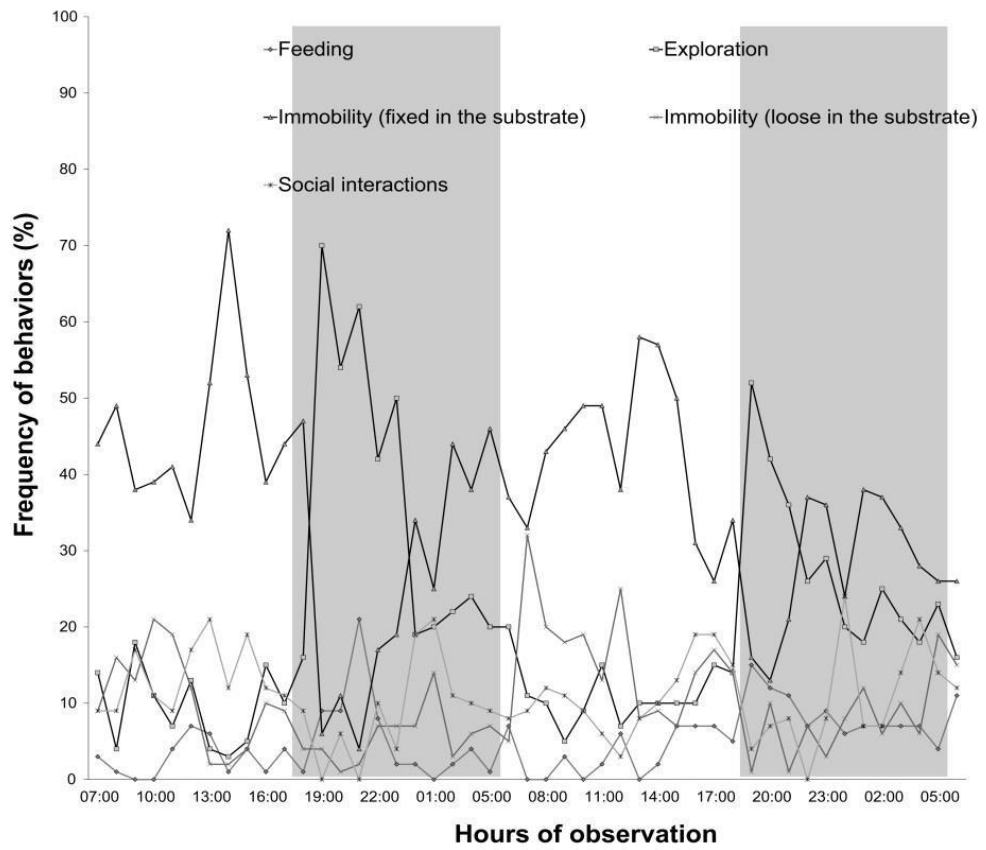


Figure 4 - Diurnal frequencies (%) of the behaviours of *Pomacea amazonica*. Behaviours that did not reach a minimum of 15% were not included in the graph

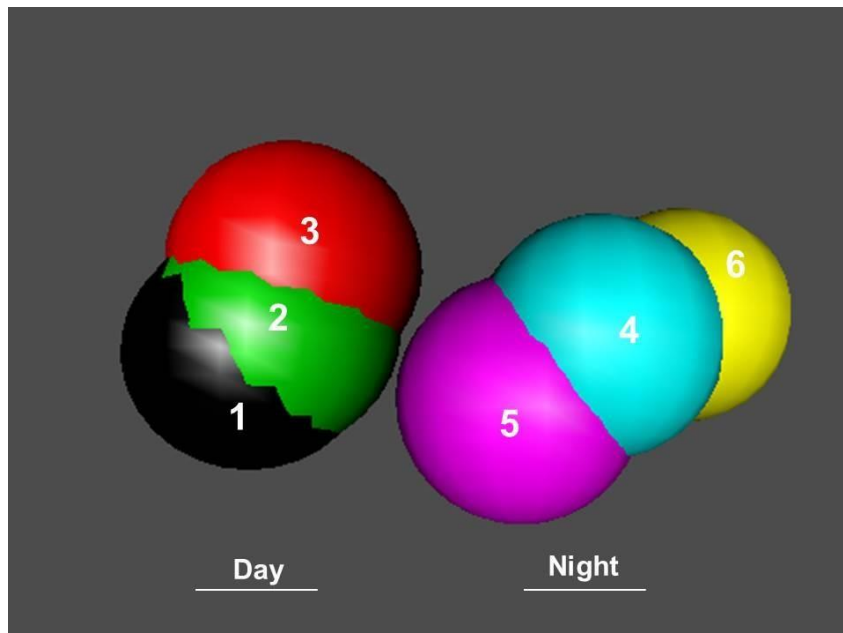


Figure 5 - Three-dimensional principal components bubble plot of the daily activity of *Pomacea amazonica* (95% confidence interval). Replicates of the experiment during the day (1, 2, and 3) and at night (4, 5 and 6).

Pomacea amazonica remained immobile on smooth substrates during most of the day (Table I). Some of the snails that remained immobile on smooth substrate during the day migrated to pebbles at night, exploring the environment and feeding in this period. Substrate selection differed significantly between the day and night periods ($X^2=22.46$; $df=3$; $P<0.05$), and the pebble substrate was most often selected by the snails.

Table I – Substrate selection of the gastropod *Pomacea amazonica* in day and night periods.

Replicate		Water Column	Smooth	Sand	Pebbles
Day	A	0	22	2	6
	B	0	21	3	6
	C	0	24	4	2
		0	67	9	14
Night	A	0	14	5	11
	B	2	14	5	9
	C	0	9	3	18
	Total	2	37	13	38

5 DISCUSSION

The gastropod *Pomacea amazonica* was more active at night, as also recorded for *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Heiler *et al.*, 2008) and for *Pomacea bridgesii* (Rever, 1856) (Watanabe *et al.*, 2014). It is possible that other species of Ampullariidae show a similar pattern of nocturnal activity Berthold (1990) and Lee & Oh (2006). This nocturnal habit may be related to interspecific competition, avoidance of predation and high temperatures, and availability of food (Heiler *et al.*, 2008). This pattern differs from the most common behavior of terrestrial mollusks, in which nocturnal activity is associated with avoidance of water loss (Sokolove *et al.*, 1977).

To avoid metabolic and physiological stress in higher temperatures, gastropods reduce their activities (Guderley, 2004). Here, at night the temperature was lower than during the day, which may have favored the increased nocturnal activity of *P. amazonica* and the low frequency of snails exploring the environment during the day (Watanabe, 2014; Bae *et al.*, 2014), when most snails remained immobile.

Terrestrial gastropods search for food similarly to aquatic snails, by chemical perception (D'Ávila *et al.*, 2006), being capable of perceiving chemical compounds dispersed in the water (Frantini *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002). The feeding behavior at night was similar to that of *P. bridgesii* (Watanabe *et al.*, 2014), where some of the snails that were immobile during day started to feed in the night, probably because of the milder temperature. Similarly, the feeding behavior of *P. canaliculata* was more intense in low temperatures Bae *et al.* (2014). Another study with *P. canaliculata* found reduced feeding in higher temperatures Seuffert *et al.* (2010).

Ampullariids are generally herbivores and also feed on decaying matter (Bronson, 2002). In the experiment, the snails usually scraped the vegetation with the radula, and some individuals fed on a dead snail. This gastropod died in the intervals of observations, and we

cannot verify if this gastropod died from natural causes or by action of the other gastropod. However, cannibalism has also been recorded for *P. maculata*, where adult snails fed on the eggs (Horn *et al.*, 2008).

Another explanation for the increase in activity at night is that *P. amazonica* spawns at night, similarly to other species of *Pomacea* (Guimarães (1981; Coelho *et al.*, 2012); and (Watanabe *et al.*, 2014). Nocturnal spawning probably reduces predation (Schnorbach, 1995; Albrecht *et al.*, 1996; Turner, 1998; Alves *et al.*, 2006; 22 Horn *et al.*, 2008) by aquatic predators (Turner, 1998), including turtles (Yusa *et al.*, 2006; Yoshie & Yusa, 2008; Fasulo, 2014), crabs (Yusa *et al.*, 2006) and alligators (Fasulo, 2014). Members of *Pomacea* may also be predated by the snail kite *Rostrhamus sociabilis* Vieillot, 1817 (Aves: Falconiformes), which hunts and feeds mainly in daytime (Beissinger, 1983), or the limpkin *Aramus guarauna* Linnaeus, 1766 (Aves: Gruiformes), which feeds almost exclusively on species of *Pomacea*, and its distribution is closely related to the occurrence of these mollusks (Del Hoyo *et al.*, 1996).

The habit of spawning out of water led to physiological adaptations of the eggs to survive in a dry environment, or resulted from a functional inability to remain under water (Turner, 1998). The record of egg masses on the tank wall and on the plants above the water is characteristic of this snail, which lays its egg masses on hard surfaces such as plants, tree boles, and walls (Cowie, 2002; Rawlings, 2007; Horn *et al.*, 2008; Fasulo, 2014). In the experiment, the finding of these egg masses indicates that some reproductive activity occurred outside the observation sessions.

Another frequent behavior, in both the day and night periods, was social interactions. Formation of aggregates is common in aquatic and terrestrial gastropods (Ansell, 2001; Frantini *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002), and may aid in partner formation D'Ávila *et al.* (2006).

Burying was recorded in low frequency. Self-burying and estivation is a common behavior of *Pomacea* (Kretzschmar & Heckman 1995; Aizaki & Yusa 2006; Heiler *et al.*, 2008; Seuffert *et al.*, 2010; Fasulo, 2014; Bae *et al.* 2014). In adverse conditions such as extreme drought, the snails self-bury until conditions improve (Watanabe *et al.*, 2014). The low frequency of this behavior observed here is likely due to the good conditions, without extreme drought or other natural events.

Mollusks may show preferences for many substrate types (Martelo *et al.*, 2008), The high frequency of selection for the smooth substrate shown by *P. amazonica* is clearly related to immobility attached to the substrate during the day. At night, with the increase in activity, some of the snails that were on the smooth surface migrated to pebbles as they explored the environment. This pattern may differ from other *Pomacea* species in the same locations. *Pomacea bridgesii* also remained immobile, but mostly on pebbles during the day, and at night with the increase of activity, some of them migrated to smooth surfaces (Watanabe, 2014). The inverse patterns shown by these two sympatric species indicate a behavior of partitioning microhabitat occupation, which would reduce competition for food and other environmental resources. It would be interesting to investigate the behavior of these two sympatric species together.

REFERENCES

- AIZAKI, K.; YUSA, Y. Field observations of the alarm response to crushed conspecifics in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*: effects of habitat, vegetation, and body size. *Journal of Ethology*, v. 27, p. 175-180. 2009.
- ALBRECHT, E.A.; CARRENO, N.B.; CASTRO-VASZQUEZ, A. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger*, v. 39, p. 142-147. 1996.
- ALBRECHT, E.A.; CARREÑO, N.B.; CASTRO -VASQUEZ, A. A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, v. 65, p. 241-250. 1999.
- ALVES, T. et al. Growth of *Pomacea lineata* and *Pomacea bridgesii* in different stock densities. *Thalassas*, v. 22, p. 55-64. 2006.
- ANSELL, A.D. Dynamics of aggregation of a gastropod predator/scavenger on a new Zeland Harbour beach. *Journal of Molluscan Studies*, v. 67, p. 329-341. 2001.
- BAE, M.J.; CHON, T.S.; PARK, Y.S. *in press*. Modeling behavior control of golden apple snails at different temperatures. *Ecological Modelling*.
- BARBOZA, S.H.R.; COSTA, D.P.S.; ROMANELLI, P.F. Processamento e Avaliação Sensorial da Carne Dos Moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 17, p. 413-418. 2006.
- BEISSINGER, S.R. Hunting behavior, prey selection, and energetics of Snail Kites in Guyana: consumer choice by a specialist. *The Auk*, v. 100, p. 84-92. 1983.
- BERTHOLD, T. Phylogenetic relationships, adaptations and biogeographic origin of the Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda) endemic to Lake Malawi, Africa. *Abhandlungen des naturwissenschaftlichen Vereins Hamburg*, v. 31/32, p. 47-84. 1990.
- BOCANEGRA, F.A.; VALVERDE, N.N.; PEREA, E.Z. Características del desova de churo, *Pomacea maculata* em ambiente controlado. *Folia Amazonica*, v. 8, n. 2, p. 7-11. 1996.
- BRONSON, C.H. Apple snails. Technical Bulletin, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, v. 3, p. 1-4. 2002.
- BURLAKOVA, L.E. Differences in population dynamics and potential impacts of a freshwater invader driven by temporal habitat stability. *Biological Invasions* v. 12, p. 927-941. 2010.
- CARLSSON, O.; BRÖNMARK, C.; HANSON, L.A. Invading herbivory: the golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology*, v. 85, p. 1575-1580. 2004.
- CATLIN-GROVES, C.L. et al. Use of confidence radii to visualise significant differences in principal components analysis: Application to mammal assemblages at locations with different disturbance levels. *Ecological Informatics*, v. 4, p. 147-151. 2009.
- CHERNORIZOV, A.M. et al. The Vision of the Snail: Spectral Sensitivity of the Dark-Adapted Eye. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 24, n. 1, p. 59-62. 1994.
- COELHO, A.R.A.; CALADO, G.J.P.; DINIS, M.T. Freshwater snail *Pomacea bridgesii* (Gastropoda: Ampullariidae), life history traits and aquaculture potential. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society*, v. 5, n. 3, p. 168-181. 2012.

- COLLIER, K.J.; HOGG, I.D. Macroinvertebrates. In *The waters of the Waikato: ecology of New Zealand's longest river.* (eds. K.J. Collier, D.P Hamilton, W.N. Vant & C. Howard-Williams), Environment Waikato/ Centre for Biodiversity and Ecology Research (The University of Waikato), Hamilton, p. 173-19. 2010.
- COWIE, R.H. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. In: Barker, G.M. (ed) *Molluscs as crop pests.* CABI, Wallingford, 2002. pp 145-192.
- COWIE, R.H.; THIENGO, S.C. The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): a nomenclatural and type catalog. *Malacologia*, v. 45, p. 41–100. 2003.
- D'ÁVILA, S.; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C de A. Comportamento agregativo em *Subulina octana* (Bruguière) (Mollusca, Subulinidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, p. 357-363.2006.
- DAMBORENEA, M.C. Patrones de distribución y abundancia de *Temnocephala iheringi* (Platyhelminthes, Temnocephalidae) en una población de *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Ampullariidae). *Gayana Zoología*, v. 60, p. 1-12. 1996.
- DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. *Handbook of the birds of the world.* Barcelona: Lynx Edicions, 1996. v. 3, 752 p.
- DREON, M.S. et al. Synthesis distribution, and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J Exp Zool*, v. 292, p. 323-330. 2002.
- DREON, M.S.; ITUARTE, S.; HERAS, H. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. 1-9. 2010.
- DREON, M.S. et al. Novel animal defenses against predation: a snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. 1-11. 2013.
- DREON, M.S. et al. Insights into Embryo Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata*: Egg Mass Ingestion Affects Rat Intestine Morphology and Growth. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 6, p. 1-10. 2014.
- FASULO, T.R. Apple snails of Florida *Pomacea* spp. (Gastropoda: Ampullariidae). EENY-323, UF/IFAS Extension. Published March 2004. Revised July 2014. *Entomology Circular*, 388, p. 1-2. 2014.
- FRANTINI, S.; CANNICCI, S.; VANNINI, M. Feeding clusters and olfaction in the mangrove snail *Terebraliapalustris* (Linnaeus) (Potamidae: Gastropoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 261, p. 173-183. 2001.
- GUDERLEY, H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol. Rev.* v. 79, p. 409-427. 2004.
- GUIMARÃES, T.C. Algumas observações de laboratório sobre biologia e ecologia de *Pomacea haustum* (Reeve, 1856). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 76, p. 33-46. 1981.
- HAYES, K.A. et al. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions*, v. 14, p. 701–712. 2008.
- HEILER, K.C.M. et al. Studies on the temperature dependence of activity and on the diurnal activity rhythm of the invasive *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mollusca*, v. 26, n. 1, p. 73-81. 2008.
- HERAS, H. et al. Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Archaitaenioglossa). *Comp Biochem Physiol C*, v. 146, p. 158-167. 2007.
- HERAS, H. et al. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon*, v. 52, p. 481-488. 2008.

- HORN, K.C. et al. Factors affecting hatching success of golden apple snail eggs: effects of water immersion and cannibalism. *The Society of Wetland Scientists*, v. 28, p. n. 2, p. 544-549. 2008.
- ITO, K. Environmental factors influencing overwintering success of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae), in the northernmost population of Japan. *Applied Entomology and Zoology*, v. 37, p. 655-661. 2002.
- JOSHI, R.C.; SEBASTIAN.; L. S. eds. Global advances in ecology and management of golden apple snails. Nueva Ecija: Philippine Rice Research Institute, p. 588 pp. 2006.
- KRETZSCHMAR, A.U.; HECKMAN, C.W. Estratégias de sobrevivência das espécies de Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda) durante mudanças das condições ambientais extremas do ciclo sazonal sob o clima tropical úmido-e-seco. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 7, p. 60-66. 1995.
- LEE, T.G.; OH, K.C. 2006. Golden apple snails in Korea. In Joshi, R.C. & Sebastian, L.S. Global advances in ecology and management of golden apple snails. Science City of Muñoz: Philippine Rice Research Institute, 2006. p. 588.
- LOWE, S. et al. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A selection from the Global Invasive Species Database. Auckland: The Invasive Species Specialist Group (ISSG), p.12. 2000.
- LUM-KONG, A. The potencial of *Pomacea urceus* as a culture species in Trinidad. *BCPC – MONO: Slugs and snails in World Agriculture*, v.41, p. 33-39. 1989.
- MARTELLO, A.R. et al. Malacofauna límnic associada à macrófitas aquáticas. *Ciência e Natura*, v. 30, p. 27-41. 2008.
- MARTELLO, A.R. et al. Quantitative fidelity of Recent freshwater mollusk assemblages from the Touro Passo River, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 96, p. 453-465. 2006.
- MORTON, B. et al. Corallivory and prey choice by *Drupellarugosa* (Gastropoda: Muricidae) in Hong Kong. *Journal of Molluscan Studies*, v. 68, p. 217-232. 2002.
- NAYLOR, R. Invasions in agriculture: assessing the cost of the golden apple snail in Asia. *Ambio*, v. 25, p. 443-448. 1996.
- R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2012.
- RAWLINGS, T.A. et al. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the Continental United States. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 97. 2007.
- SCHNORBACH, H. J. The golden apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck), an increasingly important pest in rice, and methods of control with Bayluscid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, v. 48, p. 313-346. 1995.
- SEUFFERT, M.E.; MARTÍN, P.R. Dependence on aerial respiration and its influence on microdistribution in the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biological Invasions*, v. 12, p.1695-1708. 2010.
- SEUFFERT, M.E.; MARTÍN P.R. Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) reared at different constant temperatures. *Springer Plus*, v. 2, p. 1-312. 2013.
- SIMONE, L.R.L. Land and Freshwater Molluscs of Brazil. EGB/FAPESP, São Paulo. 390 pp.
- Snyder N.F.R, Snyder HA. Defenses of the Florida apple snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour*, v. 40, p. 175-215. 1971.

- SOKAL, R.R.; ROHLF, F. James. Biometry. New York: W.H. Freeman and Company, New York. 1995. 887 p.
- SOKOLOVE, P.G.; BEISWANGER, C.M.; PRIOR, D.J.; GELPERIN, A. A circadian rhythm in the locomotive behaviour of the giant garden slug *Limax maximus*. The Journal of Experimental Biology, v. 66, n. 1, p. 47-64. 1977.
- STAFFORD R. et al. Inferential and visual analysis of ethogram data using multivariate techniques. Animal Behaviour, v. 83, p. 563-569. 2012.
- THIENGO, S.C. et al. A família Ampullariidae no Brasil: Aspectos morfológicos, biológicos e taxonômicos. In: FERNAN-DEZ, M.L.A.; SANTOS, S.B.; PIMENTA.; A.D.; THIENGO, S.C. eds. In: Tópicos em Malacologia. XIX ENCONTRO BRASILEIRO EM MALACOLOGIA. Rio de Janeiro 2011, Brazil: Editora Technical Books, 95-111 p.
- TRAN, C.T.; HAYES, K.A.; COWIE, R.H. Lack of mitochondrial DNA diversity in invasive apple snails (Ampullariidae) in Hawaii. Malacologia, v. 50, p. 351-357. 2008.
- TURNER, R.L. Effects of submergence on embryonic survival and developmental rate of the Florida apple snail, *Pomacea paludosa*: implications for egg predation and marsh management. Florida Scientist, v. 61, p.118-129. 1998.
- UNDERWOOD, A.J. Experiments in ecology: Their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press: Cambridge, p. 364-365. 1997.
- WASER, P.M. The spectral sensitivity of the eye of *Aplysia californica*. Comp. Biochem. Physiol, v. 27, p. 339-347. 1968.
- WATANABE, T.T.; HATTORI; G.Y.; SANT'ANNA, B.S. *in press*. Activity, substrate selection, and effect of simulated Amazon flood regime on the behavior of the apple snail *Pomacea bridgesii* (Reeve, 1856). Marine and Freshwater Research.
- YOSHIE, H.; Yusa, Y. Effects of predation on the exotic freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) by the indigenous turtle *Chinemys reevesii* (Testudines: Geoemydidae). *Applied Entomology and Zoology*, v.43, p. 475-482. 2008.
- YUSA, Y. Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. Journal of Molluscan Studies, v.67, p. 275-279. 2001.
- YUSA, Y.; WADA, T.; TAKAHASHI, S. Effects of dormant duration, body size, self-burial and water condition on the long-term survival of the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). Applied entomology and zoology, v. 41, n. 4, p. 627-632. 2006.



CAPÍTULO II

REPRODUÇÃO E SELEÇÃO DE SUBSTRATO PARA OVIPOSIÇÃO DO GASTRÓPODE *Pomacea amazonica* (REEVE, 1856)



RESUMO

O presente estudo investigou a reprodução e a seleção de substrato para oviposição do gastrópode *Pomacea amazonica* (Reeve, 1856). Para o experimento foram coletados 174 indivíduos de *P. amazonica* em Itacoatiara, AM, Brasil. Os espécimes foram conduzidos ao laboratório, identificados e mantidos em caixa plástica com capacidade de 300 L de água. Após a formação dos casais, cada casal foi mantido em uma gaiola. Em cada gaiola foram inseridas três faixas retangulares de lixa com diferentes rugosidades, proporcionando diferentes substratos para oviposição, além da parede do próprio frasco que foi considerada como superfície lisa. Após a postura da massa de ovos, foram contados os ovos de cada casal e registrado o local da desova. Os dados do tamanho de machos e fêmeas foram normais (KS, N=84; DM=0.0978; P=0.1484, e N=90; DM=0.0849; P=0.1434 respectivamente) sendo o tamanho médio das fêmeas 44,29±12,42 mm e dos machos 42,42±9,42 mm, não apresentando diferença significativa ($t=-1.1289$; $DF=172$; $P=0.2605$). Em relação à escolha do parceiro, analisando o tamanho de machos e fêmeas de cada casal, as fêmeas apresentaram média de tamanho 50,33±11,33 mm e 37,89±9,58 mm para os machos com diferença significativa de tamanho ($Z=2.4326$; $P=0.0150$). Quanto a postura de massa de ovos, a maioria (24) foram registradas durante à noite e 5 durante o dia. No total, 29 fêmeas colocaram massas de ovos e destas 6 colocaram duas massas de ovos consecutivas. Foram comparadas as desovas múltiplas apenas das fêmeas que colocaram duas massas de ovos, e na média não houve diferença significativa no número de ovos ($Z=0.8090$; $P=0.4185$), apesar da média de ovos da primeira desova ser visivelmente maior com 130,79±96,30 e a segunda desova com 71,83±65,74 ovos. A duração média do desenvolvimento embrionário foi de 10,38±1,73 e a taxa de eclosão em média foi 89,6% para primeira desova e 65% para a segunda desova. O tamanho dos filhotes recém-eclodidos foi em média de 2,47±0,19mm não apresentando diferença significativa entre filhotes ($H=-33.6480$; $GL=9$; $P=0.0001$) tamanho médio dos recém-eclodidos foi de 2,47±0,19. Na primeira desova o diâmetro dos ovos foi de 2,31±0,28 mm e na segunda desova foi de 2,17±0,21 mm. Entre massas de ovos consecutivas de uma mesma fêmea o diâmetro dos ovos não diferiu ($t=-0.1801$; $GL=5$; $P=0,8641$). Quanto ao tamanho da massa de ovos observou-se que quanto maior a fêmea, maior à massa de ovos e maior a fecundidade, no entanto, obteve-se baixo coeficiente de determinação ($R^2=0,22$), significativo ($F=7,6382$; $GL=1$; $P=0,0099$) com relação ao tamanho das fêmeas e o número de ovos. Quanto a seleção de substrato para oviposição houve diferença significativa ($X^2=172,55$; $GL=3$; $P<0,05$) com preferência dos gastrópodes em colocar seus ovos em superfície lisa. Embora o tamanho entre os sexos não seja diferente, no acasalamento de *P. amazonica* as fêmeas preferem os machos menores, sua fecundidade está diretamente relacionada ao tamanho da fêmea, a postura de massas de ovos ocorreu principalmente à noite em superfície de substrato liso, o desenvolvimento embrionário foi relativamente curto, e o diâmetro dos não difere entre as desovas consecutivas.

Palavras – Chave: Reprodução, Ampullariidae, Fecundidade, Desenvolvimento Embrionário, Amazônia.

1 INTRODUÇÃO

Os ampularídeos são considerados o maior grupo de gastrópodes de água doce, desempenham importantes funções no ecossistema e são encontrados em regiões tropicais e subtropicais (Hayes *et al.*, 2009a; Thiengo *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2012). Os gastrópodes da Família Ampullariidae (Gray, 1824) estão divididos em 9 gêneros, dentre os quais destaca-se o gênero *Pomacea* (Perry, 1810), este gênero é representado por gastrópodes de água doce nativos da América do Sul (Hayes, 2008) e *Pomacea amazonica* (Reeve, 1856) é pertencente a este gênero (Simone, 2006).

Pomaceas são gastrópodes dióicos, com fecundação interna e elevada fecundidade (Cowie, 2002; Burlakova *et al.*, 2010). Uma fêmea de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) possui capacidade de colocar milhares de ovos a partir de uma única cópula, essa alta produtividade tem sido considerada como um fator relevante para que se estabeleça novas populações (Jerde & Lewis, 2009). E corrobora com os resultados de Estebenet & Martín (2002) no estudo com *P. canaliculata*.

Diante do potencial reprodutivo do gênero *Pomacea*, vários autores tem estudado a reprodução desses indivíduos, como a oviposição de *Pomacea insularum* (d'Orbigny, 1835) em ambiente natural efetuado por Burks (2010). Em Guimarães (1981) foi observado a biologia reprodutiva *Pomacea haustum* (Reeve, 1856), desenvolvimento embrionário de *Pomacea canaliculata* (Heras, *et al.*, 1998; Koch, *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010), a morfologia funcional do órgão copulador (Berthold, 1989), acasalamento em *P. canaliculata* (Burela & Martín, 2009), efeito da temperatura no crescimento e sobrevivência (Seuffert & Martín, 2013), a influência dos fatores ambientais na reprodução (Albrecht *et al.*, 1996); predação de ovos, (Yusa, 2006); anatomia reprodutiva (Gamarra-Luques *et al.*, 2006; Gamarra-Luques *et al.*,

2013; Giraud-Billoud *et al.*, 2013) e organogênese reprodutiva pós-eclosão de *P. canaliculata* (Gamarra-Luques *et al.*, 2013).

A reprodução de *P. canaliculata* mostra que formato e as dimensões do opérculo apresentam dimorfismo sexual quando atinge o tamanho de 15 a 20mm (Cazzaniga, 1990; Estebenet *et al.*, 2006, Seufert & Martín, 2013), tornando-se a reprodução. Gamarra-Luques *et al.* (2013) defendem que a oviposição começa entre 20 e 25mm para *P. canaliculata*. Geralmente as fêmeas apresentam tamanhos maiores que o machos (Tanaka *et al.*, 1999; Martín & Estebenet, 2002; Estebenet *et al.*, 2006; Burela & Martín, 2011; Gamarra-Luques *et al.*, 2013) e durante a cópula o macho é sempre menor do que a fêmea (Estebenet & Pizani, 1999; Guimarães, 1981).

Para Guimarães (1981) em estudo com *P. haustum* observou que as cópulas são mais frequentes durante o dia. Durante a cópula, a bainha do pênis é introduzida na cavidade do manto da fêmea (Albrecht *et al.*, 1996; Burela & Martín, 2011) desta forma transmitindo o pênis longo vermiforme para o gonoporo da fêmea (Gamarra-Luques *et al.*, 2006) e no fim da cópula o macho abandona a concha da fêmea com lenta retração do pênis (Guimarães, 1981).

Pomacea canaliculata é uma das espécies mais conhecidas do gênero *Pomacea* e diante de estudos com a espécie verificou-se que machos e fêmeas podem acasalar com diferentes parceiros e as fêmeas põem massas de ovos contendo centenas de ovos (Albrecht *et al.*, 1996; Burela & Martín, 2007, 2009; Heras *et al.*, 2007), além disso, põe seus ovos em superfícies acima do nível da água (Howells *et al.*, 2006; Rawlings, 2007; Horn *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2009a; Fasulo, 2014).

A postura de massa de ovos ocorre principalmente durante a noite (Guimarães, 1981). Para Heiler *et al.* (2008) em estudo com *P. canaliculata* e Watanabe *et al.* (2015) com *Pomacea bridgesii* (Reeve, 1856) a desova durante a noite ocorre devido ao fato da atividade

de alimentação e exploração do ambiente ser maior neste período. Por outro lado seria uma forma de evitar predadores com hábito diurno (Wada & Yoshida; 2000; Tanaka *et al.*, 2006; Horn *et al.*, 2008).

As massas de ovos calcárias produzidas pela população de *Pomacea* são massas de ovas brilhantes (Hayes *et al.*, 2009a; Rawlings, 2007) contendo ovos individuais de 3 a 5mm (Rawlings, 2007). Os ovos das *Pomacea* possuem proteínas que auxiliam na defesa reprodutiva (Pasquevich *et al.*, 2014). Essas proteínas exercem funções de nutrição do embrião devido a quantidade de fluidos perivitelinos (Heras *et al.*, 1998; Pasquevich *et al.*, 2014), além de defesa química contra predadores (Snyder & Snyder, 1971; Yusa, 2001; Dreon & Heras, 2010; Frassa *et al.*, 2010; Dreon *et al.*, 2013; Dreon *et al.*, 2014).

Para Dreon *et al.* (2013) a coloração proveniente de substâncias químicas em *P. canaliculata* serve de advertência ao predador, além de propriedades antinutritivas e antidigestivas, sendo tóxicas, inibindo a ação de predadores, pois tais substâncias são intragáveis (Yusa, 2001), além da eficiência na proteção contra fatores ambientais (Dreon *et al.*, 2007; Heras, 2007; Heras *et al.*, 2008).

Essa estratégia de defesa reprodutiva pode garantir o sucesso na reprodução desses indivíduos, o desenvolvimento embrionário para *P. haustum* em Milward de Andrade *et al.* (1978), variou de 13 a 16 dias, e em Guimarães (1981) foi de 12 a 16 dias. Para Bocanegra *et al.* (1996) ao estudar *Pomacea maculata* (Perry, 1810) 13 a 16 dias com taxa de eclosão de 44 a 50% dos ovos colocados.

O substrato para oviposição é um fator importante do grupo, pois as massas de ovos são encontradas acima da superfície da água (Rawlings, 2007; Burks *et al.*, 2010) podendo ser uma superfície lisa como folhas e caules de plantas (Milward de Andrade *et al.*, 1978; Martelo, 2006; Burks *et al.*, 2010). Guimarães (1981) registrou desovas de *P. haustum* em cubas de plástico, assim como *Pomacea insularum* que colocou massas de ovos em diferentes

estruturas com superfícies com diferentes rugosidades, como árvores, pilares de concreto, e cisternas de esgoto (Burks *et al.*, 2010). Para Seuffert & Martín (2009) geralmente as plantas são os substratos emergentes mais usados por *P. canaliculata*, essa característica pode ser explicada pelo uso da planta como alimento, substrato para oviposição ou como um meio para acessar a superfície para respirar. Dessa forma, estudos sobre a reprodução do gastrópode *P. amazonica* são importantes para compreender a biologia e a relação da espécie com o ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a seleção de substrato de oviposição e a reprodução do gastrópode *Pomacea amazonica*

2.1 Específicos

- Comparar a relação entre o tamanho das fêmeas e dos machos.
- Determinar a fecundidade da espécie;
- Investigar o tempo de desenvolvimento embrionário e a taxa de eclosão de *P. amazonica*;
- Avaliar se existe relação entre o tamanho das fêmeas e a produção de ovos;
- Investigar a seleção de substrato para oviposição em *P. amazonica*, em relação a substratos com diferentes rugosidades;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos espécimes

Os gastrópodes *P. amazonica* foram coletados em julho de 2014 no município de Itacoatiara, AM, Brasil (S 03°08'19,9", W 058°27'32,5") (Figura 1). Os espécimes foram coletados com auxílio de peneira de mão, entre as macrófitas aquáticas, *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. (Poaceae), em seguida foram acondicionados em caixas plásticas com água e aeração e transportados até ao laboratório.

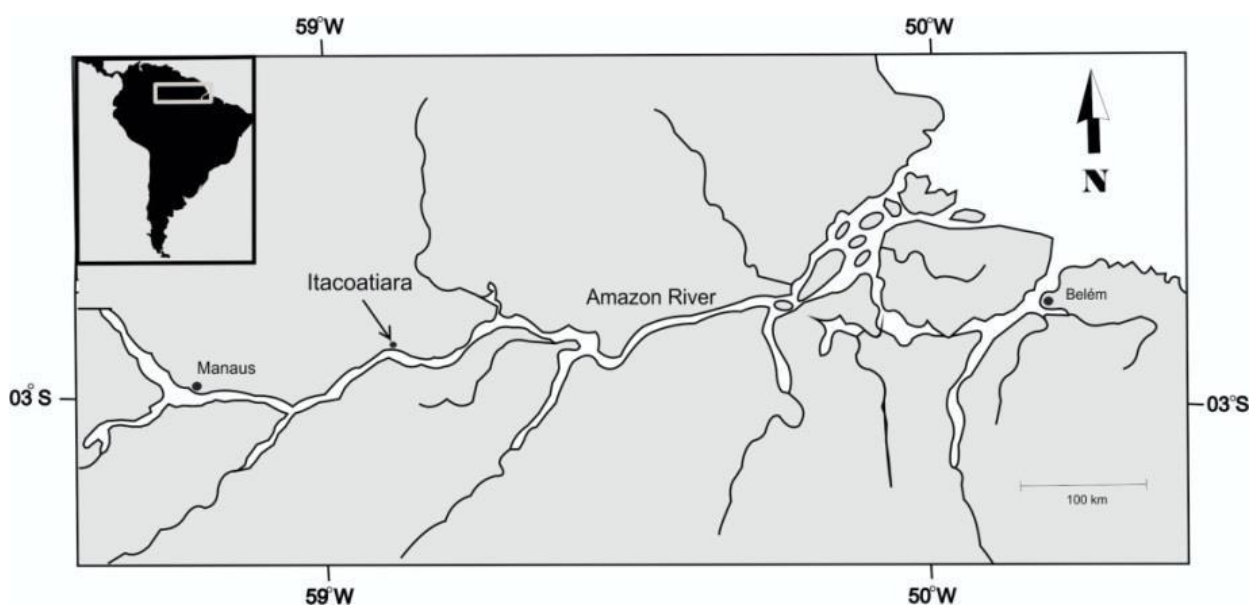


Figura 1. Mapa da região de estudo no Município de Itacoatiara (seta), Amazonas, Brasil. Fonte: Alison C. Wunderlich.

Foram coletados um total de 174 espécimes de gastrópodes de diferentes tamanhos e identificados de acordo com Simone (2006). Em seguida foram colocados em uma caixa plástica com capacidade para 310 L, com água, aeração e alimento (vegetação do local de origem). Durante as primeiras 48h os animais foram observados a cada hora e os casais que se formaram foram retirados deste tanque e transferidos para gaiolas individuais para isolamento (Figura 2).

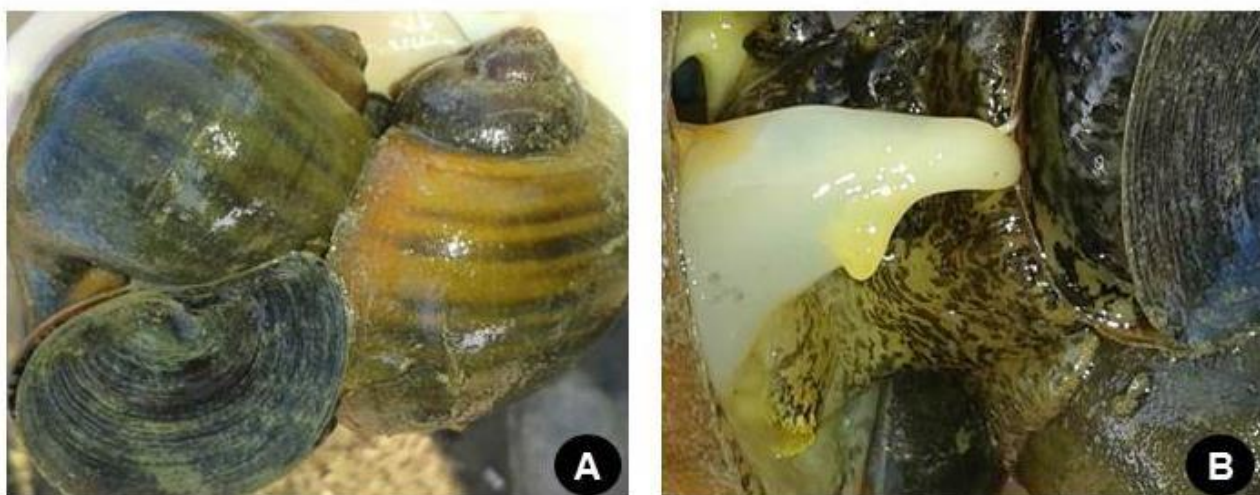


Figura 2. A – Cópula do casal de *Pomacea amazonica*, macho aderido na concha da fêmea; B – Abertura do opérculo da fêmea e a introdução do pênis do macho.

As gaiolas foram confeccionadas com material reciclado, garrafa de plástico (PET), medindo 32cm de circunferência, 9cm de diâmetro e 30cm de altura, perfuradas para facilitar a entrada de água e saída dos metabólitos do casal (Figura 3).



Figura 3. Gaiola utilizada no experimento para isolamento dos casais de *Pomacea amazonica*. A– Gaiola confeccionada com material reciclado de garrafa de plástico (PET); B – Detalhe dos três tipos de lixa que foram fixadas na parte interna das gaiolas para simular substratos com diferentes rugosidades e C – Detalhe da parte inferior da gaiola com os furos para passagem da água aerada e saída dos metabólitos.

Para identificação dos casais, foi observado a cópula e foram considerados casais quando o macho permaneceu imóvel sobre o lado direito do corpo da fêmea (Burela & Martín, 2009) e a bainha do pênis foi introduzido na cavidade do manto da fêmea (Albrecht *et al.*, 1996; Burela & Martín, 2011).

Para testar se as fêmeas de *P. amazonica* selecionam mais algum tipo de substrato para oviposição, foram fixadas 3 faixas (2,5 x 8 cm) de lixa de parede de diferentes rugosidades L 1 (rugosidade 80), L 2 (rugosidade 180) e L 3 (rugosidade 360) e a própria parede da gaiola que é lisa (Figura 3).

Em 4 caixas plásticas (39 x 55 x 20 cm), foram colocados 8 L de água com aeração contínua (5 cm de altura da caixa), e 15 gaiolas com os casais dos gastrópodes foram colocadas em cada caixa (Figura 4).



Figura 4. Caixas Plásticas contendo 15 gaiolas com os casais de *Pomacea amazonica* formados e alimento, vegetação do ambiente natural.

A água dos aquários e a alimentação dos gastrópodes mantidos nas gaiolas e na caixa com todos os indivíduos da população foram trocadas diariamente. Durante esse procedimento, cada gaiola foi observada quanto à presença de postura de ovos (massa de ovos) (Figura 5). Após a oviposição, o casal foi separado da massa de ovos, sendo colocado em uma nova gaiola para evitar que o animal pudesse danificar ou comer a massa de ovos.



Figura 5. Massa de ovos de *Pomacea amazonica* na superfície lisa.

Os ovos foram contados para determinação da fecundidade da espécie e mantidos em caixa com água (igual ao descrito anteriormente) para determinação do tempo de desenvolvimento embrionário. Foram retirados 5 ovos de cada massa de ovos para realizar as médias do diâmetro do ovo (mm). Após a eclosão, foram retirados 5 indivíduos de dez das 29 massas de ovos, os quais foram medidos quanto ao comprimento da concha (mm) dos gastrópodes (Figura 6) para determinar o tamanho dos filhotes no dia da eclosão. Para realizar as medições dos ovos e dos filhotes foi utilizada câmera acoplada ao estereomicroscópio e computador, com “software” moticam 2300 3.0m pixel USB 2.0.

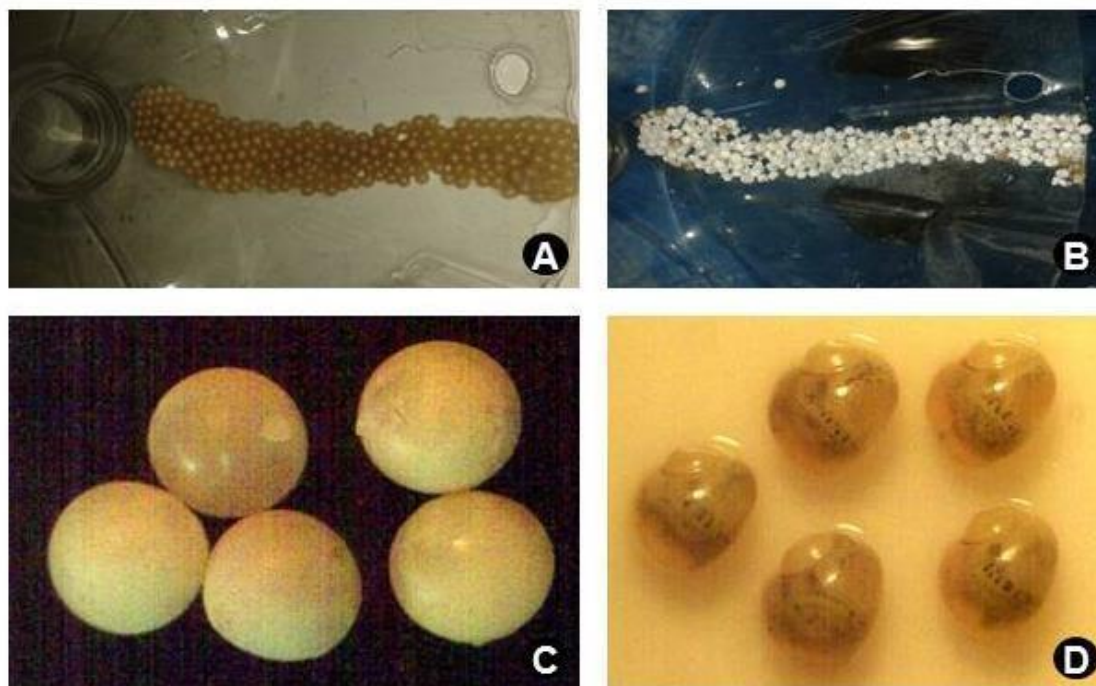


Figura 6. A - Massa de ovos na superfície lisa da gaiola do gastrópode *Pomacea amazonica*; B - Massa de ovos após a eclosão no substrato liso; C - Ovos individuais utilizados para as medidas; D - Filhotes recém-eclodidos.

Ao final do experimento todos os animais da caixa junto com os animais coletados inicialmente que não formaram casais e os casais do experimento foram anestesiados, com cloreto de magnésio ($MgCl_2$) em proporção de 1:1 de água dos aquários, determinados quanto ao sexo, medidos quanto ao comprimento da concha, utilizando-se paquímetro com precisão de 0,05 mm e classificados por classes de tamanho com intervalos de 8mm. Após os experimentos e as análises biométricas os animais foram devolvidos ao ambiente natural, onde foram capturados.

3.2 Análise dos dados

Antes das comparações entre os grupos de dados, os dados foram verificados quanto a normalidade por meio do teste de Kolmogorov Smirnov para as amostras de dados maiores que 30 valores e para as amostras como dados menores que 30 valores a normalidade foi

verificada pelo teste Shapiro Wilk. A relação entre o tamanho das fêmeas e a quantidade de ovos (fecundidade) foi analisada por meio de análise de regressão linear simples e teste F .

A seleção de substrato para oviposição Lixa 1, Lixa 2, Lixa 3 ou parte lisa (parede da gaiola), foi testada com teste de qui-quadrado (X^2). O tamanho entre machos e fêmeas da amostra da população coletada foi analisado por teste t . A média do número de ovos e o tamanho médio dos ovos das desovas múltiplas colocadas pelas fêmeas foram comparadas utilizando o teste t pareado. Para comparar o tamanho entre fêmeas e machos que formaram os casais foi usado teste de Wilcoxon (signed-rank) e o comprimento da concha dos filhotes recém-eclodidos de 10 fêmeas foi comparado por meio do teste *Kruskal-Wallis*. Para todos os testes foi adotado nível de significância de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Ao todo foram coletados 174 indivíduos do gastrópode *P. amazonica* de diferentes tamanhos, sendo 90 fêmeas e 84 machos. Na Figura 7 pode-se observar a estrutura da população dividida em classes de tamanho. A distribuição dos dados de tamanho de machos e fêmeas foram normais (KS, N=84; DM=0,0978; $P=0,1484$, e N=90; DM=0,0849; $P=0,1434$ respectivamente). As fêmeas apresentaram tamanho médio de $44,29 \pm 12,42$ mm, variando de 23,7 a 58,9mm e machos $42,42 \pm 9,42$ mm variando de 22,15 a 80,0mm. Em relação ao tamanho entre os sexos não houve diferença significativa ($t=-1,1289$; $DF=172$; $P=0,2605$).

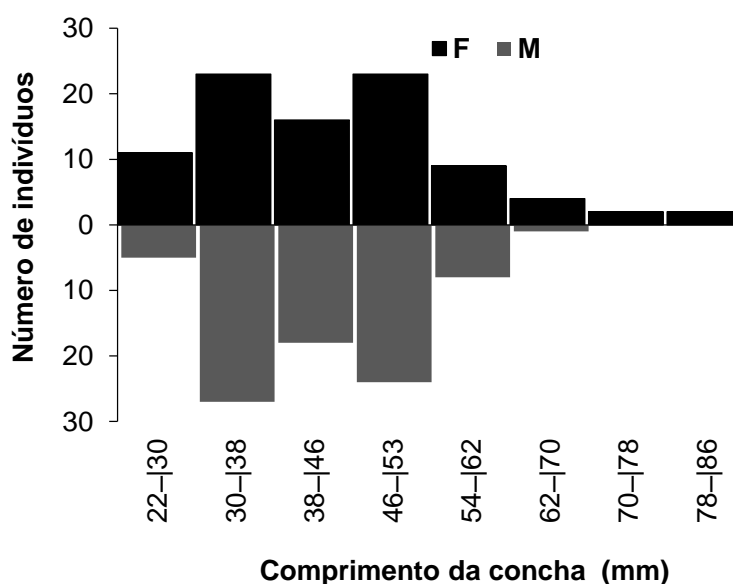


Figura 7- Estrutura da população amostra de *Pomacea amazonica*, em classes de tamanho de comprimento da concha (CC).

Foram isolados 60 casais durante o experimento, destes 29 reproduziram e colocaram massas de ovos. Em relação à escolha do parceiro, analisando o tamanho de machos e fêmeas de cada casal, as fêmeas apresentaram tamanho médio maior que os machos, com tamanho de $43,0,9 \pm 11,51$ mm para as fêmeas e de $37,70 \pm 9,96$ mm para os machos apresentando diferença significativa ($Z=2.4326$; $P=0.0150$) nos tamanhos.

No total 29 fêmeas colocaram massas de ovos, destas, 6 colocaram duas massas de ovos consecutivas. Com base apenas na primeira massa de ovos a fecundidade média da espécie foi de $130,79 \pm 96,30$, sendo a menor massa com 32 ovos e a maior com 433 ovos. Para a segunda desova, a massa de ovos teve média de $71,83 \pm 65,74$ ovos, com a menor massa contendo 5 ovos e a maior 194 ovos.

Foram comparadas as desovas múltiplas apenas das fêmeas que colocaram duas massas de ovos, e apesar do número máximo de ovos da segunda desova ter sido menor, na média não houve diferença significativa no número de ovos colocados entre desovas múltiplas ($Z=0,8090$; $P=0,4185$), embora a primeira massa tenha apontado a maior quantidade de ovos. Na primeira desova o diâmetro médio dos ovos foi de $2,31 \pm 0,28$ mm e na segunda desova foi de $2,17 \pm 0,21$ mm. Entre massas de ovos múltiplas colocadas pela mesma fêmea o diâmetro médio dos ovos não diferiu ($t=-0,1801$; $GL=5$; $P=0,8641$).

A duração média do desenvolvimento embrionário foi de $10,38 \pm 1,73$ dias, variando de 3 à 14 dias. A taxa de eclosão média da primeira desova do gastrópode *P. amazonica* foi de 88,96% e para a segunda desova 65%.

Quanto ao tamanho da massa de ovos observou-se que quanto maior a fêmea, maior a fecundidade (Figura 8). Contudo, obteve-se baixo coeficiente de determinação ($y=3,9272x-38,434$ ($R^2=0,22$)), porém estatisticamente significativo ($F=7,6382$; $GL=1$; $P=0,0099$) e o comprimento da concha dos filhotes recém-eclodidos das dez fêmeas foi em média $2,47 \pm 0,19$ mm apresentando diferença significativa ($H=-33,6480$; $GL=9$; $P=0,0001$)

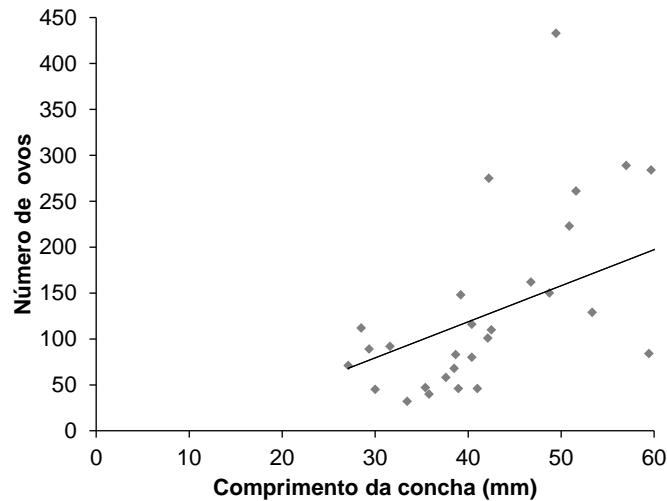


Figura 8 – Dispersão entre o tamanho das fêmeas e a quantidade de ovos de *Pomacea amazonica*.

A seleção de substrato para postura de ovos diferiu significativamente ($X^2=172,55$; $GL= 3$; $P<0,05$). Das 29 desovas depositadas nas gaiolas, 27 foram postas em superfície lisa e somente 2 foram registradas em superfícies com rugosidade intermediária, e nenhuma postura na superfície de maior rugosidade (Figura 10). No decorrer do experimento, a temperatura média do ambiente foi de $28,07\pm 2,32^\circ\text{C}$ e a temperatura da água foi de $27,02\pm 1,32^\circ\text{C}$ com umidade relativa do ar de $75,41\pm 5,30\%$.

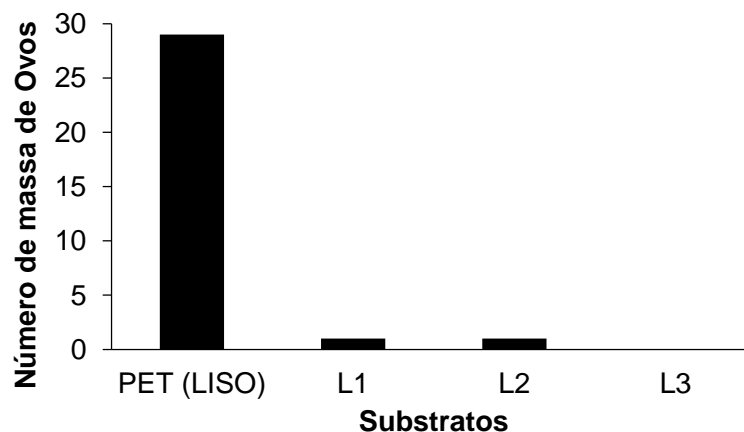


Figura 9. Número de massas de ovos de *Pomacea amazonica* colocadas nos diferentes tipos de substratos com rugosidade diferente. LISO= parede da gaiola de PET; L1= lixa com rugosidade fina (L 360); L2= lixa com rugosidade intermediária (L 180); L3= lixa com rugosidade grossa (P 80).

5 DISCUSSÃO

Em estudo com *P. haustum* Milward de Andrade *et al.* (1978) registrou que o tamanho médio da população foi maior para os machos (40mm), variando de 35 a 55mm e para fêmeas média de 31,5mm, variando de 28 a 35mm. No entanto para o gastrópode *P. amazonica* o tamanho médio da população foi maior para as fêmeas. Ao compararmos com estudos realizados com *P. cananiculata* as fêmeas alcançam tamanhos maiores do que os machos (Estebenet & Cazzaniga, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Martín e Estebenet, 2002; Estebenet *et al.*, 2006; Burela & Martín, 2011, Gamarra-Luques *et al.*, 2013), mostrando similaridade aos resultados obtidos em *P. amazonica*.

Apesar do tamanho dos indivíduos entre os sexos não apresentar diferença na amostra da população coletada para o estudo, para os casais formados, as fêmeas foram maiores que os machos. Este resultado apresentou similaridade ao estudo de Estebenet & Pizani (1999) com *P. cananiculata*, e Guimarães, (1981) ao estudar *P. haustum* ressalta a diferença de tamanho para escolha do parceiro para a cópula. Tamburi & Martín (2009) relataram que o tamanho dos machos não tem nenhum efeito sobre o número total de ovos definido por uma fêmea e a sua viabilidade de eclosão.

Quanto à formação dos casais, as fêmeas de *P. amazonica* preferiam machos menores, semelhante ao encontrado por Guimarães (1981) em estudo com *P. haustum* que na formação do casal para a cópula o macho é normalmente de menor porte. Guimarães (1981) & Albrecht *et al.* (1996) observaram ainda que a maioria das cópulas ocorrem pela manhã.

Estudos indicam que o crescimento da concha influencia na primeira oviposição, apontando que o tamanho mínimo da fêmea de *P. canaliculata* para a reprodução é de 25mm (Estebenet & Cazzaniga, 1992; Tanaka *et al.*, 1999; Estebenet & Martín, 2002), esse tamanho pode variar entre as espécies do gênero. O menor indivíduo de *P. amazonica* utilizado no experimento foi de 22mm, sendo fêmea. Considerando somente o tamanho

os casais que reproduziram, a menor fêmea foi de 27,10mm e o menor macho foi de 23mm. Para Yusa *et al.* (2006) os indivíduos de *P. canaliculata* são considerados adultos quando atingem o tamanho de 20mm de comprimento da concha. A oviposição começa entre 20-25mm em *P. canaliculata* (Gamarra-Luques *et al.*, 2013) afirma que a oviposição começa entre 20-25mm para *P. cananiculata*. Dessa forma, provavelmente para *P. amazonica* a maturidade sexual deve ocorrer com tamanho inferior ao observado nos experimentos.

Dos casais formados, 6 colocaram massas de ovos consecutivas confirmando que o *P. amazonica* apresenta desova múltipla. Essa característica foi encontrada nos ensaios com *P. canaliculata* (Estebenet & Martín, 2002; Burela & Martín, 2011) garantindo que uma fêmea durante estação reprodutiva pode realizar várias desovas.

Ao comparar a fecundidade de *P. amazonica* constatamos que os valores foram próximos aos encontrados por Milward de Andrade *et al.* (1978), que registrou número médio de ovos por desova de 209,7, sendo o mínimo de 74 e o máximo de 485 para *P. haustum*. Já para *P. canaliculata* em áreas nativas a fecundidade média dos ovos foi inferior a 400 ovos por desova (Kyle *et al.*, 2013).

Em outro estudo envolvendo *P. canaliculata* em área nativa, foram registrados entre 120 a 478 ovos (Cazzaniga *et al.*, 1998), uma alta fecundidade dessa espécie foi obtido em estudo de densidade, crescimento e reprodução na Ásia onde as massas de ovos apresentaram em média 3.000 ovos. Por outro lado Hayes (2012) em estudo de diferenciação entre as espécies do gênero *Pomacea* sugere que pode ter ocorrido um erro de identificação e que a quantificação desses ovos seja uma característica reprodutiva de *P. maculata*, uma vez que *P. maculata* apresenta elevada fecundidade, sendo ovos de tamanho reduzidos (kyle *et al.*, 2013)

Guimarães (1981) ao investigar *P. haustum* revelou que a oviposição ocorreu com pouca frequência durante o dia, sendo registrada preferencialmente durante à noite no horário

entre 20 a 00 horas. Nossos registros de oviposição para *P. amazonica* corroboram os de *P. haustum*, ocorrendo no período noturno. Essa característica pode está associado à atividade noturna que a espécie apresenta (Heiler *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2015) ou ainda a uma estratégia de realizar a desova no período noturno para reduzir o risco de predação por predadores diurnos (Wada & Yoshida; 2000; Tanaka *et al.*, 2006; Horn *et al.*, 2008).

Para Horn (2008) ovos de *P. maculata* não são capazes de suportar exposição à água ao serem submersos, diminuindo o potencial de eclosão, pois a água pode inibir a incubação dos ovos e a deficiência de oxigênio para o embrião pode prejudicar no desenvolvimento embrionário adequado (Turner, 1998; Pizani *et al.*, 2005; Horn, 2008). A inabilidade do ovo permanecer viável dentro da água é uma forma de adaptação para ambiente secos (Turner, 1998; Horn, 2008) ou ainda uma forma de prevenção e predadores aquáticos. Além, disso a postura da massa de ovos acima da água, diminui o custo de energia para as fêmeas (Schnorbach, 1995; Albrecht *et al.*, 1996), provavelmente diminuindo a predação e os riscos de dessecação

O tempo de desenvolvimento embrionário registrado no presente estudo foi em média $10,38 \pm 1,73$ dias, menor do que para *P. haustum*, que segundo Milward de Andrade *et al.* (1978), que variou de 14 a 17 dias, sendo o valor médio igual a 15,6 dias. No estudo de Guimarães (1981) o desenvolvimento embrionário variou entre 15 e 23 dias. A taxa de eclosão foi acima de 80%, em condições de laboratório, maior que a registrada para *P. maculata*, cuja a taxa de eclosão variou de 40 a 70% eclodiram (Kyle *et al.*, 2011; Barnes, *et al.*, 2008; Burks *et al.*, 2010).

Quanto ao diâmetro dos ovos, a espécie de *P. haustum* investigada por Milward de Andrade *et al.* (1978), apresentou diâmetro médio de 3,0mm. Por outro lado Guimarães (1981) observou em uma mesma desova que a dimensão dos ovos é variável, apresentando ovos com diâmetro variando de 2,4 a 3,5mm para *P. haustum*; neste estudo com *P.*

amazonica o diâmetro dos ovos variou de 2,17mm a 2,4mm. Porém, o diâmetro dos ovos não diferiu entre as desovas com relação às massas de ovos.

O sucesso da estabilidade de populações de *P. canaliculata* se deve pela capacidade de uma fêmea colocar milhares de ovos considerando um fator importante para espécie (Keller *et al.*, 2007; Jerde *et al.*, 2009). No presente estudo foi observado que quanto maior a fêmea, maior a massa de ovos e maior a fecundidade. Apesar de significativo o baixo coeficiente de determinação ($R^2=0,22$), pode ser explicado pelo fato das fêmeas colocarem massas de ovos consecutivas, como registrado a segunda desova apresenta menor número de ovos.

Os juvenis de *P. amazonica* apresentam tamanho médio de 2,4mm após a eclosão e, apesar de serem semelhantes aos adultos, estes são transparentes, sendo possível observar as estruturas internas, fato corroborado por Gamarra-Luques *et al.* (2013) ao estudar *P. canaliculata*.

As massas de ovos de caramujos de água doce são postas em estruturas diferentes, como plantas emergentes, árvores, pilares de concreto, e cisternas de esgoto, metal (Joshi, 2006; Burks *et al.*, 2010) quando investigaram *P. insularum* (d'Orbigny, 1835). Kyle *et al.* (2013) em estudo com *P. maculata* e *P. canaliculata* usou madeira, planta e plástico como substrato, além disso todos os substratos citados apresentam diferentes tipos de rugosidade. *Pomacea amazonica* selecionou preferencialmente o substrato com superfície lisa. No trabalho realizado por Milward de Andrade *et al.* (1978), onde as informações foram registradas no campo, os indivíduos de *P. haustum* fixaram suas desovas aos suportes como hastes e vegetais. Guimarães (1981), apesar de proporcionar somente o recipiente de plástico ao isolar os espécimes, comprovou que os animais ficaram fixos ao substrato. Por outro, apesar de diferentes substratos *P. amazonica* selecionou a superfície lisa da gaiola para realizar suas desovas.

REFERENCIAS

- ALBRECHT, E.A.; CARRENO, N.B.; CASTRO-VASZQUEZ, A. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger*, v. 39, p. 142-147. 1996.
- ALBRECHT, E.A.; CARRENO, N.B.; CASTRO-VAZQUEZ, A. A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, v. 65, n. 2, p. 241-250. 1999.
- BARNES, M.A. et al. Fecundity of the exotic apple snail, *Pomacea insularum*. *J N Benthol Soc*, v. 27, p. 738-745. 2008.
- BERTHOLD, T. Comparative conchology and functional morphology of the copulatory organ of the Ampullariidae (Gastropoda, Monotocardia) and their bearing upon phylogeny and palaeontology. *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)*, 28, p. 141-164. 1989.
- BOCANEGRA, F.A.; VALVERDE, N.K.; PEREA, E.Z. Características del desove de churo, *Pomacea maculata* en ambiente controlado. *Folia Amazonica*, v. 8, n. 2, p. 7-11. 1996.
- BURKS, R.L.; KYLE, C.H.; TRAWICK, M.K. Pink eggs and snails: field oviposition patterns of an invasive snail, *Pomacea insularum*, indicate a preference for an invasive macrophyte. *Hydrobiologia*, 64, p. 243-251. 2010.
- BURLAKOVA, L.E. et al. Differences in population dynamics and potential impacts of a freshwater invader driven by temporal habitat stability. *Biological Invasions* 12: p. 927-941. 2010.
- BURELA, S.; MARTÍN, P. Nuptial feeding in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, v. 49, n. 2, p. 465-470. 2007.
- BURELA, S.; MARTÍN, P.R. Sequential pathways in the mating behavior of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, v. 51, n. 1, p. 157-164. 2009.
- BURELA, S.; MARTÍN, P.R. Evolutionary and functional significance of lengthy copulations in a promiscuous apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*, v. 77, n. 1, p. 54-64. 2011.
- CAZZANIGA, N. Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Veliger*, v. 33, n. 4, p. 384-388. 1990.
- COWIE, R.H. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. *In: MOLLUSCS AS CROP PESTS* (ed. G.M. Barker), CABI Publishing, Wallingford, p. 145-192. 2002.
- DREON, M.S.; CEOLÍN, M.; HERAS, H. Astaxanthin binding and structural stability of the apple snail carotenoprotein ovorubin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 460, p. 107-112. 2007
- DREON, M.S.; ITUARTE, S.; HERAS, H. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. 1-9. 2010.
- DREON, M.S. et al. Novel animal defenses against predation: a snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. 1-11. 2013.
- DREON, M.S. et al. Insights into Embryo Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata*: Egg Mass Ingestion Affects Rat Intestine Morphology and Growth. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 6, p. 1-10. 2014.
- ESTEBENET, A.L., PIZANI N. V. Elección de pareja, cópula y desove en *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *IV Congr Latinoamer Malacol (Resúmenes)*: 91, Coquimbo, Chile. 1999.

- ESTEBENET, A.L.; CAZZANIGA, N.J. Growth and demography of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under laboratory conditions. *Malacological Review*, v. 25, p. 1-12. 1992.
- ESTEBENET A. L.; CAZZANIGA, N.J. Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Apex* 8: p. 129-138. 1993.
- ESTEBENET, A.L.; MARTÍN, P.R. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell*, v. 26, n. 1, p. 83-89. 2002.
- ESTEBENET, A.L.; MARTÍN, P.R.; BURELA, S. Conchological variation in *Pomacea canaliculata* and other South American Ampullariidae (Caenogastropoda, Architaenioglossa). *Biocell*, v. 30, p. 329-335. 2006.
- ESTEBENET, A.L.; MARTÍN, P.R. Shell interpopulation variation and its origin in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from southern Pampas, Argentina. *Journal of Molluscan Studies*, v. 69, p. 301-310. 2003.
- FASULO, T.R. Applesnails da flórida *Pomacea* spp. (Gastropoda: Ampullariidae). EENY-323, UF/IFAS Extension. Published March 2004. Revised July 2014. *Entomology Circular*, 388. 2, p. 1-5. 2014.
- FRASSA, M.V. et al. Structure and stability of the neurotoxin PV2 from the eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, p. 1492-1499. 2010.
- GAMARRA-LUQUES, C.; GIRAUD-BILLOUD, M.; CASTRO-VÁZQUEZ, A. Reproductive organogenesis in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), with reference to the effects of xenobiotics. *Journal of Molluscan Studies*, v. 79, n. 2, p. 147-162. 2013.
- GAMARRA-LUQUES, C. et al. An integrative view to structure, function, ontogeny and phylogenetical significance of the male genital system in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell*, v. 30, p. 345-357. 2006.
- GIRAUD-BILLOUD, M.; GAMARRA-LUQUES, C.; CASTRO-VAZQUEZ, A. Functional anatomy of male copulatory organs of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Zoomorphology*, v. 132, 129-143. 2013.
- GUIMARÃES, T.C. Algumas observações de laboratório sobre biologia e ecologia de *Pomacea haustum* (Reeve, 1856). *Memorial Instituto Oswald Cruz, Rio de Janeiro*, V. 76, n. 1. p. 33-46. 1981.
- HEILER, K.C.M. et al. Caught in the act: insights into the sex life of *Lanistes ovum* (Gastropoda: Ampullariidae). *World Congress of Malacology, Antwerp*, p. 94. 2007.
- HEILER, K.C.M. et al. Studies on the temperature dependence fo activity and on the diurnal activity rhythm of the invasive *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mollusca*, v. 26, n. 1, p. 73-81. 2008.
- HAYES, K.C.M. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions*, v. 14, p. 701-712. 2008.
- HAYES, K.C.M. Molluscan models in evolutionary biology: apple snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. *American Malacological Bulletin*, v. 27, p. 47-58. 2009a.
- HAYES, K. et al. Comparing apples to apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae. *Zool J Linn Soc* v. 166, n. 4, p. 723-753. 2012
- HERAS, H.; GARÍN, C.F.; POLLERO, R.J. Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Zool*, v. 280, p. 375-383. 1998.
- HERAS, H. et al. Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Architaenioglossa). *Comp. Biochem. Physiol*, v. 146, p.158-167. 2007

- HERAS, H. et al. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon*, v. 52, p. 481-488. 2008.
- HORN, K.C. et al. Factors affecting hatching success of golden apple snail eggs: effects of water immersion and cannibalism. *The Society of Wetland Scientists Wetlands*, v. 28, p. 544-549. 2008.
- HOWELLS, R.G. et al. Native and introduced Ampullariidae in North America: history, status, and ecology. *In* Joshi, R. & L. Sebastian (eds), *Global Advancements in Ecology and Management of Golden Apple Snails*. Philippine Rice Research Institute, Nueva Ecija, Philippines, v. p. 73-112. 2006.
- JERDE, C.L.; BAMPFYLDE, C.J; LEWIS, M.A. Chance establishment for sexual, semelparous species: overcoming the Allee effect. *American Naturalist*, v. 173, p. 734-746. 2009.
- JOSHI, R.C.; SEBASTIAN, L.S. Global advances in ecology and management of golden apple snails. *Phillipines Rice Research Institute*. 2006. 588 p.
- KELLER, R.P.; DRAKE, J.M.; LODGE, D.M. Fecundity as a basis for risk assessment of nonindigenous freshwater mollusks. *Conservation Biology*, v. 21, p. 191-200. 2007.
- KOCH, E.; WINIK, B.C.; CASTRO-VAZQUEZ, A. Development beyond the gastrula stage and digestive organogenesis in the apple-snail *Pomacea canaliculata* (Architaenioglossa, Ampullariidae). *Biocell*, v. 33. p. 49-65. 2009.
- KYLE, CH.; KROPF A.W, BURKS R.L. Prime waterfront real estate: Apple snails choose wild taro for oviposition sites. *Curr Zool*, v. 57, p. 630-641. 2011.
- KYLE, C.H. Count Your Eggs Before They Invade: Identifying and Quantifying Egg Clutches of Two Invasive Apple Snail Species (*Pomacea*). *PloS One*, v. 8, n. 10, p. 1-11. 2013.
- MARTELLO, A.R. et al. Quantitative fidelity of Recent freshwater mollusk assemblages from the Touro Passo River, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, v. 96, p. 453-465. 2006.
- MARTÍN, P.R.; ESTEBENET, A.L. Inter-population variation of life-history traits in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Malacologia*, v. 44, p. 153-163. 2002.
- MILWARD de ANDRADE, R.; CARVALHO, O.S.; GUIMARAES, C.T. Alguns dados bioecológicos de *Pomacea haustrum* (REEVE, 1856) predador competidor de hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*, (Sambon, 1907). *Revista Saúde pública*. São Paulo, v. 12, p. 78-89. 1978.
- PASQUEVICH, M.Y.; DEON, M.S.; HERAS, H. The major egg reserve protein from the invasive apple snail *Pomacea maculata* is a complex carotenoprotein related to those of *Pomacea canaliculata* and *Pomacea scalaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 169, p. 63-71. 2014.
- PIZANI, N.V.; ESTEBENET, A.L.; MARTÍN, P.R. Effects of submersion and aerial exposure on clutches and hatchlings of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *American Malacological Bulletin*, v. 20, p. 55-63. 2005.
- RAWLINGS, T.A. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 97. 2007.
- SEUFFERT, M.E.; MARTÍN, P.R., Influence of temperature, size and sex on aerial respiration of on *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from southern Pampas, Argentina. *Malacologia*, v. 51, 191-200. 2009a.
- SEUFFERT, M.E.; MARTÍN, P.R. Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) reared at different constant temperatures. *SpringerPlus*, v. 2, p. 312. 2013.
- SIMONE, L.R.L. Land and freshwater Molluscs of Brasil. São Paulo, EGB/Fapesp, 2006. 390 p.

- SUN, J. et al. Protein expression during the embryonic development of a gastropod. *Proteomics*, v. 10, p. 2701-2711. 2010
- SCHNORBACH, H.J. The golden apple snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck), an increasingly important pest in rice, and methods of control with Bayluscid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, v. 48, p. 313-346. 1995.
- SNYDER, N.F.R.; SNYDER, H.A. Defenses of the Florida apple snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour*, v. 40, p. 175-185. 1971.
- TAMBURI, N.E., MARTÍN, P.R. Feeding rates and food conversion efficiencies in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, v. 51, p. 221-232. 2009.
- TAMBURI, N.E.; MARTÍN, P.R. Effects of food availability on reproductive output, offspring quality and reproductive efficiency in the apple snail *Pomacea canaliculata*. Springer Science+Business Media B.V., v. 13, p. 2351-2360. 2011.
- TANAKA, K. et al. Density dependent growth and reproduction of the apple snail, *Pomacea canaliculata*: a density manipulation experiment in a paddy field. *Res Popul Ecol*, v. 41, p. 253-262. 1999.
- TANAKA, M.O.; Souza, A.L.T.; Módena, E.S. Habitat structure effects on size selection of snail kites (*Rostrhamus sociabilis*) and limpkins (*Aramus guarauna*) when feeding on apple snails (*Pomacea* spp.). *Acta Oecologica*, v. 30, p. 88-96. 2006.
- TURNER, R.L. Effects of submergence on embryonic survival and developmental rate of the Florida apple snail, *Pomacea paludosa*: implications for egg predation and marsh management. *Florida Scientist*, v. 61, p.118-129. 1998.
- THIENGO, S.C. et al. A família Ampullariidae no Brasil: Aspectos morfológicos, biológicos e taxonômicos. In: FERNAN-DEZ, M.L.A., SANTOS, S.B.; PIMENTA, A.D.; THIENGO SC, eds. In: Tópicos em Malacologia. XIX Encontro Brasileiro em Malacologia. Rio de Janeiro, Brazil: Editora Technical Books, 95-111 p. 2011.
- YUSA, Y. Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. *Journal of Molluscan Studies*, v. 67, p. 275- 279. 2001.
- YUSA, Y.; WADA, T.; TAKAHASHI, S. Effects of dormant duration, body size, self-burial and water condition on the long-term survival of the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Applied entomology and zoology*, v. 41, n. 4, p. 627-632. 2006.
- WADA, T.; YOSHIDA, K. Burrowing by the apple snail, *Pomacea canaliculata* (LAMARCK); daily periodicity and factors affecting burrowing. *Kyushu Plant Prot. Res.*, v. 46, p. 88-93. 2000.
- WATANABE, T.T.; HATTORI, G.Y.; SANT'ANNA, B.S. *in press*. Activity, substrate selection, and effect of simulated Amazon flood regime on the behavior of the apple snail *Pomacea bridgesii* (Reeve, 1856). *Marine and Freshwater Research*.

CAPÍTULO III

ATIVIDADE DIÁRIA E REPRODUÇÃO DO GASTRÓPODE

Pomacea amazonica (REEVE, 1856)

CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gastrópode *Pomacea amazonica* durante o dia permaneceu imóvel no substrato liso, por outro lado a sua maior atividade ocorreu principalmente durante o período noturno, quando os animais passaram a explorar o seixo como substrato mostrando que a espécie possui hábito noturno.

Na reprodução desses animais, o tamanho de machos e fêmeas não é diferente, no entanto, no acasalamento de *P. amazonica* as fêmeas preferem os machos menores. A espécie apresenta desovas múltiplas com a primeira desova apresentando maior número de ovos. A desova ocorre principalmente no período noturno e em superfície de substrato liso. A fecundidade está diretamente relacionada com o tamanho da fêmea, quanto maior a fêmea maior a fecundidade. O desenvolvimento embrionário apresenta período relativamente curto em relação a outras espécies do gênero *Pomacea*, e o diâmetro dos ovos não diferiu entre as desovas consecutivas.

Diante da carência de estudos na região Amazônica sobre os gastrópodes de água doce, o desenvolvimento desta pesquisa é fundamental para compreender a atividade e a reprodução da espécie *Pomacea amazonica*