



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**APERFEIÇOAMENTO DAS TÉCNICAS DE FERTILIZAÇÃO
DE OVÓCITOS DE DOURADO, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816
(Characiformes: Characidae), UTILIZANDO SÊMEN FRESCO E
CONGELADO DURANTE O PROCESSO DE REPRODUÇÃO
INDUZIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Dr. Evoy Zaniboni Filho

MARCOS WEINGARTNER

Florianópolis
2010

Weingartner, Marcos

Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida / Marcos Weingartner - 2010

81 f : 10 figs. 7 tab.

Orientador: Evoy Zaniboni Filho.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

1.Fertilização; 2.Ovócitos; 3.Sêmen; 4.Dourado; 5.*Salminus brasiliensis*.

**Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado
Salminus brasiliensis Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae),
utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de
reprodução induzida.**

Por

MARCOS WEINGARTNER

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Evoy Zaniboni Filho – *Orientador*

Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez

Dr. Danilo Pedro Streit Junior

Dra. Elizabeth Romagoza

Dr. David Augusto Reynalte Tataje

*O que não sabe é um ignorante, mas o que sabe
e não diz nada é um criminoso.*

Bertolt Brecht

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e orientador Evoy Zaniboni-Filho, pela orientação e pelo imensurável apoio e grande amizade da qual tenho o privilégio de compartilhar há alguns anos e por emprestar um teto quando estive fora do Brasil.

Aos professores do LAPAD, Professor Alex Pires de Oliveira Nuñez e Professora Débora Machado Fracalossi, pelo apoio nestes anos de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, os doutores, por suas valiosas sugestões.

Ao amigo do Lapad David Reynalte Tataje, por sua amizade e pelos prazerosos momentos de trabalho que realizamos no laboratório de Piscicultura de São Carlos, onde nasceu a idéia deste trabalho.

A Renata Maria Guereschi, grande amiga, companheira na elaboração de projetos e que sempre esteve prontificada a me ajudar quando o tempo me apertava.

A minha amiga Claudia Machado (Claudinha), pequena, mas enorme. Agradeço profundamente pelas horas dispensadas no auxílio na condução dos trabalhos e na leitura dos artigos.

A Samara Hermes Silva por tanto anos de convívio e em especial pela convivência nos EUA, que juntamente com o Evoy, tornaram um pouco mais fácil a distância de casa.

Aos técnicos do Lapad Pedro, Maurício e Ronaldo pelo auxílio nos trabalhos de campo e laboratório, e pela grande amizade, que tornaram a execução desta tarefa mais prazerosa.

A grande família LAPAD. A lista é grande.

Ao Juan Esquivel, grande amigo, e primeiro professor no caminho do cultivo dos peixes.

Ao Departamento de Aquicultura, em especial, ao Carlito, que sempre nos auxilia com grande presteza nas questões administrativas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa modalidade Doutorado Sanduíche.

A Tractebel Energia pelo financiamento deste projeto.

Para todos aqueles que emprestaram as suas mãos para agitação dos gametas, durante a execução dos testes. Às vezes usamos a frase “Um trabalho feito a várias mãos”, com certeza este foi um trabalho feito a várias mãos.

Finalmente, a todos que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

O dourado *Salminus brasiliensis* é um peixe nativo que tem despertado interesse para aquicultura. A reprodução induzida é dominada, mas as baixas taxas de fertilização dos ovos são constantes. Desta forma, objetivou-se desenvolver um protocolo para a fertilização de ovócitos de dourado durante a sua reprodução. Foram testados diferentes volumes de água na ativação dos gametas com distintas concentrações de oxigênio dissolvido, tempo de estocagem dos ovócitos após a extrusão e de contato de diferentes soluções ativadoras. Também foram avaliadas diferentes relações entre sêmen (fresco e criopreservado), ovócitos e soluções ativadoras. O volume da água de ativação influenciou significativamente os resultados, onde 10 g de ovócitos fertilizados utilizando 10 mL de água resultou em uma taxa de fertilização quatro vezes inferior onde se utilizou 50 mL ou mais. As diferentes concentrações de oxigênio dissolvido da água de ativação não afetaram a fertilização já a concentração de espermatozóides no meio fecundante afetou, sendo os melhores resultados obtidos quando a concentração foi de $7,10 \times 10^6$ espermatozóides.mL⁻¹, que foi conseguida quando se utilizou 0,05 mL de sêmen, 100 mL de água e 10 gramas de ovócitos. As taxas de fertilização caíram quando os ovócitos foram estocados por mais de 30 min e com o aumento do tempo de contato das soluções ativadoras por mais de 3 min para sêmen fresco e 1 minuto criopreservado. A metodologia para congelamento e descongelamento do sêmen foi eficiente para manter a motilidade espermática, no entanto, as taxas de fertilização obtidas com sêmen criopreservado foram inferiores ao sêmen fresco.

ABSTRACT

The dourado *Salminus brasiliensis* is a Brazilian fish that has attracted interest for aquaculture. The induced spawning has already been obtained, but the low fertilization rates of the eggs were evident. This work aimed to develop a protocol for dourado oocytes fertilization during the induced spawning. Different water volumes with different dissolved oxygen concentrations were tested for the gametes activation, storage time of oocytes after extrusion and different contact time between activation solution and gametes during insemination. Different relation between sperm (fresh and cryopreserved), oocytes and different types of activating solutions were also evaluated. The water volume influenced the fertilization rates, where 10 grams of oocytes fertilized by adding 10 mL of water had fertilization rates significantly lower than those where it was used 50 mL or more. Dissolved oxygen concentrations did not affect fertilization rates. The concentration of sperm in fertile solution affected the fertilization rates and the best results were obtained when the concentration was 7.10×10^6 spermatozoa.mL⁻¹, which was achieved using 0.05 mL of sperm, 100 mL of water and 10 g of oocytes. The fertilization rate decreased when the oocytes were stored for more than 30 minutes after extrusion and the time of contact of the activating solutions were harmful when kept for more than 3minutes to fresh sperm and 1 minute to cryopreserved sperm. The protocol for freezing and thawing of sperm cryopreserved were efficient to maintain good sperm motility, however, the fertilization rates with cryopreserved sperm were significantly lower when compared to fresh semen.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
A piscicultura no sul do Brasil	13
O dourado.....	14
Reprodução e fertilização em peixes migradores Sul-americanos	17
Criopreservação de sêmen.....	18
CAPÍTULO I - Razão entre os volumes de água de ativação, de sêmen, de ovócitos e concentração de oxigênio do meio fecundante na fertilização de ovos de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i>	20
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
<i>Experimento I – Volume de água de ativação.....</i>	<i>24</i>
<i>Experimento II - Consumo de oxigênio dissolvido durante a ativação dos gametas</i>	<i>25</i>
<i>Experimento III - Diferentes concentrações de oxigênio dissolvido da água de ativação dos gametas.....</i>	<i>25</i>
<i>Experimento IV - Proporção entre ovócitos, espermatozóides e água de ativação</i>	<i>26</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>27</i>
RESULTADOS.....	28
<i>Experimento I – Volume de água de ativação.....</i>	<i>28</i>
<i>Experimento II - Consumo de oxigênio dissolvido durante a ativação dos gametas</i>	<i>28</i>
<i>Experimento III – Efeito de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido da água de ativação dos gametas</i>	<i>30</i>
<i>Experimento IV - Relação entre a quantidade de ovócitos, espermatozóides e o volume da água de ativação (RGA)</i>	<i>31</i>
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
CAPÍTULO II - Efeito do tempo de estocagem dos ovócitos, qualidade e tempo de manutenção da água de ativação dos gametas sobre a taxa de fertilização de ovos de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i>	41
RESUMO	42
ABSTRACT.....	42

1. Introdução	43
2. Materiais e métodos	45
2.1. <i>Reprodutores</i>	45
2.2. <i>Efeito do tempo de estocagem sobre a taxa de fertilização</i>	46
2.3. <i>Efeito do tempo de manutenção da água de ativação e da concentração de oxigênio dissolvido</i>	47
2.4. <i>Análise dos dados</i>	47
3. Resultados	49
4. Discussão	49
5. Conclusões	53
6. Referências bibliográficas	54
CAPÍTULO III - Uso de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i>	57
Resumo	58
Resumo	58
Introdução	59
Materiais e métodos	60
<i>Criopreservação</i>	61
<i>Teste de motilidade do sêmen criopreservado</i>	62
<i>Diferentes soluções ativadoras na fertilização de ovócitos</i>	62
<i>Diferentes volumes de sêmen criopreservado na fertilização</i>	63
<i>Efeito da solução ativadora e da duração do tempo de ativação sobre a taxa de fertilização</i>	63
<i>Análise dos dados</i>	65
Resultados e discussão	65
<i>Teste de motilidade do sêmen criopreservado</i>	65
<i>Diferentes soluções ativadoras na fertilização de ovócitos</i>	66
<i>Diferentes volumes de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos</i>	67
<i>Efeito da solução ativadora e da duração do tempo de ativação sobre a taxa de fertilização</i>	69
Conclusão	71
Referências bibliográficas	71
CONCLUSÕES GERAIS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	77

INTRODUÇÃO

A piscicultura no sul do Brasil

O Sul do Brasil é o maior produtor de peixes de água doce do país com 30,73% da produção nacional (IBAMA, 2007). Dentre os três estados do sul, o maior produtor é o Rio Grande do Sul com 23,78 mil toneladas anuais, seguido de Santa Catarina e Paraná com 22,92 e 17,79 mil toneladas, respectivamente.

Nesta região, a produção esteve e ainda está baseada na piscicultura de espécies exóticas, com destaque para as carpas e tilápias (ZANIBONI-FILHO et al., 2009). Entre os três estados do sul, verifica-se uma pequena diferenciação nas proporções do cultivo destas espécies, onde no RS predominam o cultivo das carpas, em SC atualmente as proporções entre as carpas e tilápias são semelhantes e no PR predominam as tilápias (SILVA, 2005). Esta distribuição está diretamente relacionada às características climáticas de cada estado, pois quanto mais ao sul, menores são as temperaturas médias anuais, bem como as temperaturas mínimas durante o inverno, desfavorecendo o cultivo da tilápia.

De modo geral, nos últimos anos tem-se verificado incremento na produção da tilápia no sul do Brasil, fato este relacionado ao aumento da demanda deste peixe, e desta forma, possibilitando melhor remuneração ao produtor. Contudo, comparado ao Nordeste, onde mais de 85% da produção de peixes de água doce está baseada no cultivo da tilápia, a produção desta espécie no sul do Brasil ainda é baixa quando comparada ao cultivo das carpas, onde o principal fator para isto é a questão climática. No ano de 2001, quando se observou um inverno mais rigoroso em Santa Catarina, foi registrada por técnicos da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), para a região do alto vale do Itajaí, mortalidade de aproximadamente 57% dos peixes estocados em viveiros de terra, sendo a espécie predominante nestes cultivos a tilápia (SILVA, 2005).

Entre os anos de 2000 e 2007 o crescimento na produção de peixes de água doce cultivados no Brasil foi de aproximadamente 58% (IBAMA, 2000; IBAMA, 2007). Chama atenção neste período a queda na participação da região Sul, que no ano de 2000 participava com mais de 55% do total da produção e em 2007 diminuiu 31%. Apesar de ter sua produção total aumentada neste período, os aumentos nas regiões

Nordeste e Centro-Oeste foram ainda mais significativos, diminuindo a participação do Sul no total da produção brasileira. A região Nordeste teve impulso na produção devido às ótimas condições climáticas para o cultivo da tilápia, e o Centro-Oeste foi impulsionado pelos grandes investimentos no cultivo de espécies nativas, principalmente os peixes redondos e o híbrido produzido pelo cruzamento dos grandes bagres *Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*.

Analisando a evolução da produção de peixes no Sul do Brasil onde se observa limitações climáticas para a expansão do cultivo de tilápia, associado à baixa aceitação das carpas pelo mercado consumidor, o cultivo de espécies nativas adaptadas a região e que possam remunerar adequadamente o produtor poderá ser uma alternativa para a manutenção de boas taxas de crescimento para a produção dulceaquícola nesta região. Para tal, o investimento no desenvolvimento de tecnologias que possibilite o cultivo destas espécies é de suma importância. Uma realidade que já é possível de ser observada na expansão do cultivo de espécies nativas no Sul do Brasil é o cultivo do jundiá (*Rhamdia* sp.), que apresenta seu crescimento diretamente relacionado ao bom desempenho em regiões mais frias (FRACALOSSO et al. 2003; CARNEIRO, 2004).

O dourado

O dourado, *Salminus brasiliensis* é representante da família Characidae, ordem Characiformes e classe Actinopterygii. Até 2007, eram conhecidas três espécies para o gênero *Salminus*: *S. affinis* Steindachner, 1880; *S. hilarii* Valenciennes, 1850 e *S. brasiliensis* (CUVIER, 1816). *S. affinis* é nativo das bacias dos rios Magdalena na Colômbia, onde é conhecido como dorada ou rubia, e do rio Pachitea no Peru, onde é conhecido como sábalo macho. *S. hilarii* é originário das bacias do Alto Rio Paraná, São Francisco, Tocantins e Alto Amazonas, sendo conhecido como dourado ou mais comumente tabarana. Também está distribuído na Venezuela e Colômbia, sendo encontrado na bacia do rio Orinoco, comum a esses dois países, onde é chamado de dorada e dorado, respectivamente. A terceira espécie, denominada *S. brasiliensis*, possui ampla distribuição geográfica, encontrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, Alto rio Chaparé e Mamoré, ambos na Bolívia, e nas bacias ligadas ao sistema lagunar da Lagoa dos Patos (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; FROESE e PAULY, 2003). Os autores também incluíam a bacia do São Francisco como área de

distribuição de *S. brasiliensis*, porém, uma revisão feita por Lima e Britski (2007), considerou tratar-se de uma nova espécie. Anteriormente, considerava-se que o gênero possuía ainda outras espécies, como *S. cuvieri* (VALENCIENNES, 1850), *S. maxillosus* (VALENCIENNES, 1850) e *S. orbignyana* (VALENCIENNES, 1850), porém uma revisão feita por Géry e Lauzanne (1990) concluiu que essas espécies eram sinônimas de *S. brasiliensis* (CUVIER, 1816) (Figura 1).

Recentemente, uma revisão feita por Lima e Britski (2007) descreveu outra espécie para o gênero, o *S. franciscanus*, que apresenta distribuição restrita à bacia do rio São Francisco. Anteriormente, o dourado do rio São Francisco era conhecido como *S. brasiliensis*. Apesar da semelhança entre as espécies, *S. franciscanus* apresenta menor número de escamas em várias partes do corpo quando comparado com *S. brasiliensis* (LIMA e BRITSKI, 2007). Segundo os autores, *S. franciscanus* pode ser distinguida de suas congêneres pela combinação dos seguintes caracteres: presença de um dente da série externa do dentário consideravelmente maior que os demais dentes, ausência de uma faixa pós-orbital escura, contagens intermediárias de escamas (68-82 escamas na linha lateral, 11-14 séries de escamas horizontais entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral e 6-8 séries de escamas horizontais entre a linha lateral e a inserção da nadadeira pélvica) e um prolongamento mediano da nadadeira caudal bem desenvolvido.

Dentre as espécies do gênero, *S. brasiliensis* é a que possui maior número de trabalhos relacionados a produção, sendo considerada a espécie com grande potencial para a aquicultura. É um peixe de grande porte, com características organolépticas adequadas e, além disso, tem características indicadas para a pesca esportiva, sendo um excelente atrativo em estabelecimentos de pesque-pague. Segundo Castagnolli (1997), *S. brasiliensis*, bem como outras espécies carnívoras de grande porte, deverá ter sua produção aumentada na mesma proporção dos acréscimos da demanda dos pesque-pagues. Considerando-se que *S. franciscanus* pode atingir 1,4 m de comprimento e pesar até 30kg (SATO e GODINHO, 2003 – ainda chamado *S. brasiliensis*), bem como as demais semelhanças que apresenta com *S. brasiliensis*, possivelmente seja uma espécie que também apresenta potencial para o cultivo, apesar da falta de estudos.

Neste trabalho será abordada a espécie *S. brasiliensis*, anteriormente descrita como *S. maxillosus*, sendo atribuído o nome comum “dourado” para fazer referência a esta espécie (Figura 1).



Figura 1 – Exemplar adulto de dourado *Salminus brasiliensis*.

De acordo com Vazzoler (1996), *S. brasiliensis* é uma espécie de desova anual e total, que apresenta ovos semi-densos e não apresenta cuidado parental. É uma espécie que vive solitária a maior parte do ano e realiza migração ascendente no período reprodutivo, quando podem ser encontrados em grandes cardumes (MORAIS FILHO e SCHUBART, 1955; ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003) buscando as cabeceiras dos rios onde encontram águas caudalosas para realizar a desova (BARBIERI et al., 2000). Na região sudeste do Brasil, o período reprodutivo ocorre de novembro a janeiro, com pico no mês de dezembro, coincidindo com as cheias dos rios (BARBIERI et al., 2000). No sul do Brasil, na região do Alto Rio Uruguai, não existe um período de cheias bem definido, as maiores vazões do rio são constatadas nos meses de inverno, sem que haja reprodução do dourado. Com a elevação dos valores de temperatura e horas de luz, inicia o processo de maturação gonadal e aparentemente, as pequenas variações de nível do rio possibilitam o estímulo necessário para iniciar a migração ascendente, sendo assim, possível ultrapassar os obstáculos naturais (MACHADO, 2003). Nessa região, a reprodução acontece entre novembro e fevereiro (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003).

Por se tratar de espécie migradora, o dourado não se reproduz espontaneamente em cativeiro (WEINGARTNER e ZANIBONI-FILHO, 2005). No entanto, para peixes reofílicos, a maturação gonadal pode ocorrer nestas condições alcançando o estágio de vitelogênese (ANDRADE e YASUI, 2003). Uma vez atingida a fase de maturação gonadal, a maturação final, ovulação e desova podem ser obtidas através do uso das técnicas de indução hormonal em laboratório (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

Reprodução e fertilização em peixes migradores Sul-americanos

O desenvolvimento da técnica da indução hormonal através da técnica de hipofização iniciou por volta do ano de 1933 com os trabalhos realizados por Rodolpho Von Ihering que tomou por base as experiências realizadas em 1930 pelo argentino Bernardo Houssay que verificou o efeito da gonadotropina trabalhando com peixes da bacia do Prata (SILVA, 2005). A técnica desenvolvida por Rodolpho Von Ihering, que é considerado o pai da piscicultura no Brasil, passou a ser utilizada em laboratórios, principalmente no Nordeste, onde o DNOCS atuava no fomento da produção de alevinos para estocagem em reservatórios daquela região (CASTAGNOLLI, 2004). Na década de 70, com o intuito de impulsionar a piscicultura, alevinos de tilápia foram importados da Costa do Marfim. Por se tratar de uma espécie que se reproduz naturalmente em cativeiro, a técnica da hipofização não se fazia necessária e nos anos seguintes houve poucos avanços no aprimoramento desta técnica no Brasil. No mundo, esta técnica passou a ser conhecida quando os resultados dos trabalhos de Rodolpho Von Ihering foram apresentados no V Congresso Mundial de Fisiologia, na Rússia, em 1935. Seu uso se espalhou rapidamente pelo mundo, sendo aprimorada em países como a China e países do leste europeu (SILVA, 2005).

O uso da reprodução induzida de peixes voltou a ser novamente utilizado com maior intensidade na piscicultura nacional durante a década de 80, através de tecnologias trazidas por técnicos estrangeiros, principalmente os húngaros, devido a um programa de cooperação mantido com esse país (ANDRADE e YASUI, 2003). Neste período houve muitos avanços na reprodução de espécies exóticas no Brasil, principalmente as carpas comum e chinesas. Porém, foi devido a este período que muitos erros foram cometidos na tentativa de utilizar as mesmas técnicas desenvolvidas para as espécies exóticas na reprodução das espécies autóctones (ZANIBONI-FILHO, 2000).

De certa forma, os protocolos convencionais de indução hormonal funcionam bem para estimular a ovulação e desova da maioria das espécies de peixes (WOYNAROVICH e HORVARTH, 1983; BOMBARDELLI et al., 2006). Para as espécies migradoras, observou-se que pequenas modificações neste protocolo proporcionam melhorias significativas nas taxas de fecundidade e fertilização dos ovos (ZANIBONI-FILHO e BARBOSA, 1996). Os processos endócrinos e fisiológicos responsáveis pela formação e maturação das gônadas nos peixes seguem um padrão similar (BILLARD et al. , 1981; ZOHAR e MYLONAS, 2001), motivo pelo qual a técnica da hipofização tende a

funcionar para muitas espécies de peixes cultivados (BOMBARDELLI et al., 2006). No entanto, devido a variação nas estratégias e táticas reprodutivas observada nos peixes de água doce (VAZZOLER, 1996) durante a reprodução induzida, a manipulação dos gametas após a desova deve respeitar a biologia de cada espécie para alcançar taxas de fertilização elevadas (COWARD e PARRINGTON, 2003).

Segundo Coward e Parrington (2003) as taxas de fertilização obtidas durante o processo de reprodução artificial dos peixes tendem a ser menores do que aquelas observadas na reprodução natural dos exemplares selvagens no meio ambiente, e atribuem este fato a erros nos procedimentos utilizados durante a fertilização e incubação. Detalhes a respeito dos processos utilizados na fertilização artificial em peixes devem ser observados para que se obtenha sucesso, principalmente em relação ao volume, homogeneização e ativação dos gametas. A relação entre os gametas (ovócitos:sêmen), o volume de solução ativadora, qualidade de água, método seco ou úmido de fertilização, são fatores que podem ser decisivos para o sucesso na reprodução de peixes (CHEREGUINI et al., 1999; CIERESZKO et al., 2000; ALAVI e COSSON, 2006; SHIMODA et al., 2007; SANCHES et al., 2009). Desta forma, desenvolver protocolos espécie/específicos de fertilização pode ser um passo chave que possibilite a produção massiva das formas jovens dos peixes e venha a viabilizar o cultivo em larga escala.

Criopreservação de sêmen de peixes

O uso da técnica de criopreservação na aquicultura permite maximizar o uso dos machos de um plantel de reprodutores através de coletas sucessivas de sêmen durante o período reprodutivo, aumentando a produção de sêmen por indivíduo. Essa possibilidade permite diminuir o número de reprodutores necessários para a reprodução e conseqüentemente, diminuir os custos de manutenção do plantel, otimizando o processo reprodutivo (ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004). Outra vantagem está associada à variação da qualidade do sêmen ao longo do período reprodutivo, possibilitando que as coletas para armazenamento sejam feitas quando os machos estão no auge da produção de sêmen e qualidade ideal (YAO et al., 2000). A possibilidade de ter o sêmen criopreservado disponível evita problemas de falta de sincronismo na maturação gonadal entre machos e fêmeas, muitas vezes observado em peixes de cativeiro.

Esta técnica também favorece a realização de trabalhos de melhoramento genético pela facilidade de manipulação do sêmen, auxiliando no desenvolvimento de novas linhagens. Além disso, um dos

fatores mais importante dessa técnica é a possibilidade de armazenar germoplasma, garantindo a manutenção da variabilidade genética de populações ameaçadas de extinção (CAROLSFELD et al., 2003).

Os trabalhos referentes à criopreservação de sêmen de peixes foram iniciados na década de 1950 com a descoberta dos primeiros crioprotetores (TIERSCH, 2008). Foi empregada inicialmente na criopreservação de sêmen de salmonídeos (COSER et al., 1987). A adaptação dessa técnica para as espécies migradoras tropicais da América do Sul foi iniciada na Colômbia e Venezuela em 1994 (HARVEY, 2000). No Brasil, estudos sobre a criopreservação de sêmen de espécies nativas haviam sido conduzidos na década de 80 (KAVAMOTO et al., 1989), mas foi nos anos 90 que foram intensificados, impulsionados principalmente pela preocupação com a preservação da variabilidade genética das populações selvagens devido a construção de barragens de usinas hidrelétricas e a degradação dos habitats (CAROLSFELD et al., 2003).

Desta forma, nos últimos anos, grandes avanços foram obtidos no desenvolvimento de protocolos para criopreservação de sêmen das espécies nativas migradoras, entre elas, o dourado (CAROLSFELD et al., 2003). Resultados positivos foram obtidos com o uso de uma solução crioprotetora contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) (v/v), 5% glicose (p/v), água destilada e uma gema de ovo para 150 mL da solução (SILVA, 2000; CAROLSFELD et al., 2003). No entanto, estes trabalhos se limitaram a avaliar a qualidade do sêmen criopreservado pela medida de motilidade espermática. Segundo Viveiros e Godinho (2009), a forma ideal para verificar a qualidade do sêmen criopreservado é a avaliação da sua capacidade de fertilização dos ovócitos. Devido a possíveis prejuízos causados aos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento, especial atenção deve ser dada quanto ao uso do sêmen criopreservado, sendo necessário maior rigor em relação ao volume de sêmen e soluções ativadoras que permitam bons resultados. Sendo assim, estudos que visem a realização de protocolos que possibilitem taxas de fertilização com a utilização do sêmen criopreservado semelhantes a sêmen fresco são imprescindíveis para que haja difusão e ampla utilização desta tecnologia.

**CAPÍTULO I - RAZÃO ENTRE OS VOLUMES DE ÁGUA
DE ATIVAÇÃO, SÊMEN, OVÓCITOS E
CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DO MEIO
FECUNDANTE NA FERTILIZAÇÃO DE OVOS DE
DOURADO *Salminus brasiliensis***

Revista: Journal Fish Biology

A ser submetido

Razão entre os volumes de água de ativação, sêmen, ovócitos e concentração de oxigênio do meio fecundante na fertilização de ovos de dourado *Salminus brasiliensis*

Marcos Weingartner & Evoy Zaniboni Filho

Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/CCA/UFSC)

Rodovia SC 406, nº 3532, Armação, Florianópolis, SC, 88066-000. (marcos@lapad.ufsc.br)

RESUMO

O dourado *Salminus brasiliensis* é uma espécie reofílica cujo cultivo tem sido desenvolvido, no entanto, apresenta baixas taxas de fertilização dos ovos na reprodução induzida. Desta forma, objetivou-se avaliar as relações entre os volumes e a qualidade da água de ativação com distintas proporções de ovócitos e sêmen na taxa de fertilização dos ovos. Para tal, 10 g de ovócitos foram fertilizados com volumes de água variando entre 10 e 1000 mL e com concentração de oxigênio dissolvido variando entre 0,10 a 10,5 mg.L⁻¹. Além disso, um arranjo fatorial foi realizado fertilizando ovócitos (10 g) com diferentes volumes de água (10; 100 e 1000 mL) e de sêmen (0,01; 0,05; 0,10 e 0,21 mL). Também foi avaliado o consumo de oxigênio dissolvido durante a fertilização em dois volumes de água. A fertilização foi afetada pelo volume de água, tendo o volume de 10 mL as menores taxas, que aumento no volume de 50 mL, mantendo valores semelhantes até 1000 mL, o maior volume testado. O volume de água de ativação (100 e 1000 mL) contendo a mesma concentração de oxigênio dissolvido (7,15 mg.L⁻¹) afetou o consumo de oxigênio, sendo 2,5 vezes maior no maior volume de água. Decorridos 5 min da ativação do sêmen a concentração de oxigênio foi de 0,62 mg.L⁻¹ e 5,55 mg.L⁻¹ para o menor e maior volumes, respectivamente. Apesar disso, a concentração de oxigênio dissolvido da água de ativação não afetou a fertilização. Na relação entre o volume de água e sêmen, a interação mostrou ser mais significativa do que volume de água ou volume de sêmen isoladamente, sendo que a concentração de espermatozoides existente na solução de ativação foi determinante sobre a taxa de fertilização, com as maiores taxas de fertilização observadas em uma concentração de 7,10x10⁶ espermatozoides.mL⁻¹. Essa condição foi obtida quando 10 gramas de ovócitos foram fertilizados com 0,05 mL de sêmen e ativados com 100 mL de água.

Palavras-chave: peixe; migrador; fecundação; gametas.

ABSTRACT

The dourado *Salminus brasiliensis* is a rheophilic species with increasing interest to aquaculture; however, the induced reproduction of this species still presents lower fertilization rates when compared to other similar species. The aim of the present study was to evaluate the effect of the water: egg: sperm ratio and the water quality in the fertilization rate of the eggs of dourado. Samples of 10 grams of oocytes were fertilized using water volumes ranging from 10 mL to 1000 mL and dissolved oxygen (DO) concentration ranging from 0.10 to 10.5 mg.L⁻¹. Also a factorial design was carried out and 10 grams of oocytes were fertilized with different water volumes (10, 100 and 1000 mL) and sperm volumes (0.01, 0.05, 0.10 and 0.21 mL). The DO consumption was evaluated during fertilization using two water volumes (100 and 1000 mL) with the same DO concentration (7.15 mg.L⁻¹). The fertilization rate was strongly affected by water volumes; 10 mL produced the lowest fertilization rate, which increased with increasing water volumes, until 50 mL; stabilizing from 50 mL to 1000 mL. The water volume affected DO consumption; after five minutes in sperm activation, the dissolved oxygen concentration was 0.62 mg.L⁻¹ and 5.55 mg.L⁻¹ to 100 and 1000 mL, respectively. Nevertheless, DO concentration did not affect the fertilization rates. The effect of the water: egg: sperm ratio was more significant than the effect of water or semen volume by themselves, and the sperm concentration in the fertilization solution was decisive on the fertilization rate. The best result was observed at a concentration of approximately 7.10×10^6 spermatozoa.mL⁻¹. This condition was obtained when 10 grams of oocytes were fertilized with 0.05 mL of sperm and 100 mL of water.

Key-words: fish; migratory; fecundation; gametes.

INTRODUÇÃO

As técnicas empregadas na reprodução artificial de espécies de peixes migradores da América do Sul são similares entre si, tanto em relação à indução hormonal para promover a maturação final e ovulação, quanto aos protocolos de fertilização e incubação. A utilização do procedimento convencional de reprodução tem possibilitado sucesso da produção das formas jovens de muitas espécies de peixes migradores Sul-americanos (Woynarovich e Horvarth, 1980; Zaniboni-Filho e Barbosa, 1996; Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). A mesma metodologia vem sendo utilizada para a fertilização dos gametas na reprodução artificial de peixes migradores brasileiros.

Autores recomendam que um pequeno volume de água deva ser utilizado para induzir a fertilização, sendo esse volume o mínimo necessário para promover a ativação dos gametas sem diluir o sêmen, e assim não diminuir as chances de encontro dos espermatozoides com os ovócitos (Woynarovich e Horvarth, 1980; Furuya e Furuya, 2001). No entanto, o uso desse procedimento na reprodução de dourado *Salminus brasiliensis* tem resultado em baixas taxas de fertilização, e conseqüentemente, reduzida produção de larvas (Weingartner e Zaniboni-Filho, 2005).

O dourado *S. brasiliensis* é um peixe nativo da América do Sul, encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, no sistema lagunar da lagoa dos Patos e na bacia do alto Mamoré e Chaparé na Bolívia (Lima et al., 2003). Esta espécie se destaca na pesca esportiva por ser de grande porte e brigar ativamente quando capturada (Zaniboni-Filho e Schulz, 2003), e na pesca comercial pela grande demanda de mercado e elevado valor comercial. O potencial da espécie está associado ao valor econômico, à qualidade da carne e ao rápido crescimento inicial (Fracalossi et al, 2004). Contudo, a sua utilização em cultivos ainda é bastante restrita, situação atribuída à escassa disponibilidade das formas jovens aos criadores.

Sato et al. (1997) observaram em relação ao *Salminus franciscanus*, espécie com características reprodutivas muito similares ao *S. brasiliensis*, taxas de fertilização em torno de 50%, considerando estes valores baixos quando comparado as demais espécies nativas, quando utilizado protocolo convencional de reprodução de peixes reofílicos.

Devido às baixas taxas de fertilização dos ovos de dourado quando esse protocolo é utilizado, este estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes volumes da água de ativação dos gametas e da concentração de oxigênio dissolvido dessa água sobre a taxa de fertilização, bem como, definir a melhor proporção de sêmen e ovócitos no momento da fertilização para o dourado, *Salminus brasiliensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC). Os experimentos foram realizados durante o período reprodutivo da espécie – novembro a fevereiro – entre os anos de 2006 e 2009.

Foram utilizados peixes do plantel de reprodutores do LAPAD compostos por dourados selvagens capturados na região do alto rio

Uruguai, no sul do Brasil e de descendentes diretos destes. O plantel de reprodutores é mantido em tanques de terra de 2.000 metros quadrados, sendo alimentados diariamente com ração comercial contendo 40% de PB.

Para realização dos experimentos foram selecionados no campo matrizes que apresentavam características de maturação gonadal: fêmeas com abdômen abaulado/proeminente, macio e orifício genital saliente; e machos que liberavam sêmen sob leve pressão abdominal. Os animais selecionados foram conduzidos ao laboratório de reprodução e pesados individualmente para o cálculo das doses hormonais. Foram utilizadas oito fêmeas com peso médio (\pm desvio padrão) de 3.653 ± 1.792 gramas, obtendo-se 100% de desova das fêmeas induzidas e que produziram em média 592 ± 297 gramas de ovócitos. Cada grama de ovócito possuía em média 1.220 ± 205 ovócitos. Foram utilizados 10 machos com peso médio de 2.234 ± 1.237 gramas e que apresentaram a concentração espermática média de $10,23 \times 10^9 \pm 2,269 \times 10^9$. A contagem da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, com o sêmen diluído 200 vezes e a concentração final estimada pela média de três contagens por amostra. Nos experimentos foi utilizado apenas o sêmen que apresentou taxa de motilidade superior a 80% e tempo de motilidade maior que 40 segundos.

Para indução à maturação final e ovulação, as fêmeas receberam duas doses de extrato bruto hipofisário de carpa: $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ na primeira dose e 10 h depois a segunda, com $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$. Para facilitar a liberação do sêmen, os machos receberam 80% das doses aplicadas nas fêmeas.

As desovas ocorreram aproximadamente 5 h após a última aplicação, a uma temperatura média de $25,5^\circ\text{C}$ que corresponde a $127,5$ horas-grau. A coleta do sêmen foi realizada minutos antes da coleta dos gametas femininos, buscando-se agilizar os procedimentos de fertilização após a desova. Para a realização de cada experimento, foram utilizados ovócitos de uma única fêmea e um pool de sêmen contendo volumes idênticos provenientes de dois machos.

Para cumprir com os objetivos do trabalho foi necessária a realização de vários experimentos descritos a seguir:

Experimento I – Volumes de água de ativação

Para avaliar o efeito do volume de água de ativação dos gametas sobre a taxa de fertilização de dourado foram realizados dois experimentos (V-1 e V-2) (Tabela 1) onde a quantidade da água de ativação variou entre 10 e 90 mL em V-1 e entre 10 e 1000 mL em V-2, para ativar a homogeneização de 10g de ovócitos e 0,05mL de sêmen.

A coleta dos gametas femininos foi realizada através de extrusão, sendo os ovócitos acondicionados em beckers de dois litros, previamente pesados. Em cada becker foi adicionando sêmen na proporção de 5 mL por quilograma de ovócito. Após a adição e mistura do sêmen, amostras de 10 g foram distribuídas em recipientes plásticos com volumes que variaram entre 500 a 2.000 mL em função do volume de água utilizado para fertilização. Os tratamentos foram realizados em triplicata. Para evitar o efeito do tempo entre a coleta dos ovócitos e a fertilização, a adição da água foi realizada simultaneamente em todos os tratamentos, variando o tempo de adição da água entre as repetições. A água de fertilização foi mantida por três minutos em contato com os gametas, e posteriormente foi drenada com auxílio de uma peneira sendo os ovos acondicionados em incubadoras cilindro-cônicas de 10 L com circulação constante de água. A água utilizada na fertilização e incubação foi abastecida por um sistema de recirculação fechado com temperatura controlada mantida entre 25,5°C e 26,0°C e oxigênio dissolvido em 7,0 mg.L⁻¹.

A estimativa da taxa de fertilização foi realizada 7 h após a fertilização, quando os embriões se encontravam na fase de fechamento do blastóporo.

Experimento II - Consumo de oxigênio dissolvido durante a ativação dos gametas

Para avaliar o efeito do volume da água de ativação dos gametas sobre os valores de concentração de oxigênio dissolvido da solução foi realizado experimento que avaliou o consumo de oxigênio dissolvido durante o processo de fertilização. Amostras de 100 g de ovócitos foram homogeneizados a 0,5 mL de sêmen e os gametas ativados com 100 e 1000 mL de água (relação entre gametas e água de 1:1 e 1:10, respectivamente). Para proceder a fertilização, os gametas foram colocados em sacos plásticos de três litros e adicionada água de ativação contendo 7,15mg.L⁻¹ de oxigênio dissolvido. Uma sonda de oxímetro (modelo 550A YSI) foi inserida em cada saco plástico e sua abertura foi fechada após a retirada do ar existente. A leitura da concentração de oxigênio foi feita a cada 15 segundos até completar 300 segundos. Foram realizadas três repetições no tempo e utilizado gametas de diferentes peixes para cada uma delas.

Experimento III - Diferentes concentrações de oxigênio dissolvido da água de ativação dos gametas

Para avaliar o efeito da concentração do oxigênio dissolvido (OD) da água de ativação sobre a taxa de fertilização dos ovos de

dourado foram realizados os testes de fertilização variando a concentração de OD desde 0,1 até 10,5 mg.L⁻¹. Diferentes concentrações de OD foram testadas em três experimentos cujo detalhamento está apresentado na tabela 1 (OD-1, OD-2, OD-3). Os testes foram realizados utilizando-se três repetições para cada tratamento.

A preparação da água nas diferentes concentrações de OD foi feita com adição de nitrogênio gasoso (N₂) ou de oxigênio puro (O₂). Quando a concentração de OD atingiu o valor requerido, a água foi embalada em sacos plásticos sem a presença de ar atmosférico em seu interior.

Após a coleta e pesagem da desova foi adicionado sêmen na proporção de 5 mL/kg de ovócitos. Alíquotas de 10 g da foram distribuídos em sacos plásticos de 500 mL e, posteriormente foram adicionados 150 mL de água em diferentes concentrações de OD. A água foi mantida em contato com os gametas por três minutos, sendo drenada com o auxílio de uma peneira e os ovos liberados nas incubadoras, seguindo procedimento utilizado nos experimentos anteriores.

Experimento IV - Proporção entre ovócitos, espermatozóides e água de ativação

Para avaliar o efeito da proporção entre as quantidades dos gametas e volume de água de fertilização foi realizado um experimento que utilizou diferentes volumes de água de ativação e também variou a proporção entre ovócitos e sêmen (RGA) (Tabela 1). Três diferentes volumes de água (10; 100 e 1000 mL) foram utilizados para fertilizar 10 g de ovócitos, correspondendo a uma relação entre água e ovócitos de 1:1; 1:10 e 1:100, respectivamente. Para cada um dos volumes testados foi utilizado o volume de 0,01; 0,11 e 0,21 mL de sêmen para fertilizar 10 gramas de ovócitos. Um tratamento controle foi realizado utilizando 10g de ovócitos; 0,05 mL de sêmen e 100 mL de água. A desova da fêmea utilizada neste experimento apresentou 1.118 ovócitos por grama, enquanto os machos apresentaram concentração espermática média de $11,48 \times 10^9 \pm 1,31 \times 10^9$ espermatozóides.mL⁻¹.

Análise estatística

Os resultados da taxa de fertilização e do consumo de oxigênio dissolvido foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $\alpha=0,05$) a fim de verificar diferenças entre os tratamentos. Foi utilizado Tukey como teste separador de médias quando observadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$). Além da Anova, os experimentos foram

submetidos a análise de regressão a fim de avaliar a relação entre os tratamentos com as taxas de fertilização e consumo de oxigênio dissolvido.

Tabela 1 - Detalhamento dos experimentos realizados para testar a fertilização dos ovócitos de *Salminus brasiliensis* (em negrito estão representados os tratamentos).

Experimentos	Variáveis experimentais				
	Ovócitos (g)	Sêmen (mL)	Água de ativação (mL)	OD (O ₂ mg.L ⁻¹)	
I - Volume de água de ativação	V-1	10	0,05	10 / 50 / 90 / 130 / 170 / 210 / 250 / 290	7,15
	V-2	10	0,05	10 / 100 / 250 / 400 / 550 / 700 / 850 / 1000	7,15
II - Consumo de O ₂ durante ativação	C O ₂	100	0,05	100 e 1000	7,15
III - Concentração de OD da água de ativação	OD-1	10	0,05	150	0,9 / 1,5 / 3,0 / 4,5 / 6,0 / 7,5 / 9,0 / 10,5
	OD-2	10	0,05	150	0,2 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0 / 5,0 / 6,0 / 8,0 / 10,0
	OD-3	10	0,05	150	0,1 / 3,0 / 6,0 / 9,0
IV - Relação ovócitos : sêmen : água	RGA	10	0,01; 0,05; 0,11; 0,21	10; 100; 1000	7,15

RESULTADOS

Experimento I – Volume de água de ativação

O volume da água de ativação influenciou a taxa de fertilização dos ovos de *S. brasiliensis* (Figuras 1 e 2). Em ambos os testes realizados a relação entre água e ovócitos de 1:1 apresentou baixas taxas de fertilização ($27,70 \pm 12,74\%$). Houve um aumento de aproximadamente 3 vezes na taxa de fertilização quando o volume de água para fertilizar 10g de ovócitos foi acrescido desde 10 mL até 50 mL (relação de 1:5 entre quantidade de ovócitos e de água). A taxa de fertilização manteve valores semelhantes ($87,47 \pm 4,99\%$) em volumes de 50 mL e superiores da água de ativação (Fig. 1). Testando uma maior amplitude de variação do volume da água de ativação, a menor taxa de fertilização foi observada novamente na relação de 1:1 entre a quantidade de ovócitos e de água ($33,63 \pm 16,66\%$), mantendo valores semelhantes quando a relação entre a quantidade de ovócitos e o volume de água de ativação variou entre 1:10 e 1:100, com valor médio (\pm desvio padrão) de $79,80 \pm 6,93\%$ de taxa de fertilização (Fig. 2).

Experimento II - Consumo de oxigênio dissolvido durante a ativação dos gametas

A demanda de oxigênio dissolvido (OD) durante a fase de ativação dos gametas causa uma redução da concentração de oxigênio dissolvido da solução ativadora. A redução na concentração de OD foi mais pronunciada quanto menor o volume de água utilizado (Fig. 3). Observou-se diferença na concentração de OD após 15 s do início da ativação dos gametas ($P < 0,05$). Decorridos 5 minutos da ativação a concentração média de OD na solução foi de $5,55 \pm 0,59 \text{ mg.L}^{-1}$ na proporção de 1:10 (relação entre a quantidade de ovócitos e o volume de água da solução ativadora), sendo de apenas $0,62 \pm 0,39 \text{ mg.L}^{-1}$ quando a proporção foi de 1:1. Considerando-se a disponibilidade de OD na solução ativadora dos dois tratamentos ($100 \text{ mL} \times 7,15 \text{ mg.L}^{-1} = 0,715 \text{ mg}$ e $1000 \text{ mL} \times 7,15 \text{ mg.L}^{-1} = 7,150 \text{ mg}$ de OD), o consumo de OD durante o período de 5 minutos foi 2,5 vezes maior no tratamento onde a proporção de ovócito:volume de água foi de 1:10, quando comparado com a de 1:1.

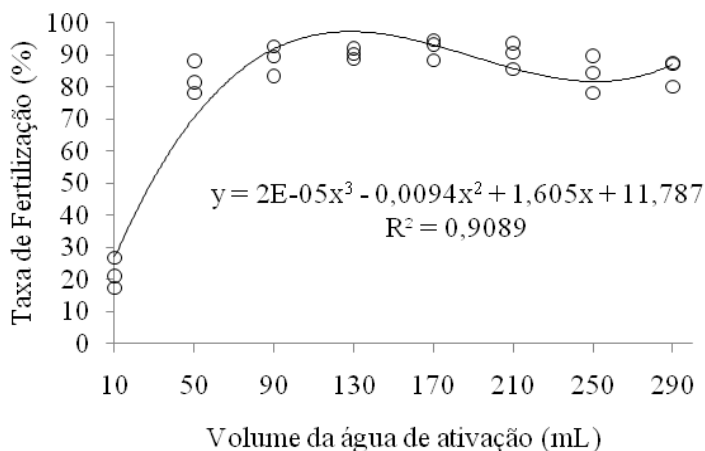


Figura 1 – Efeito do volume da água de ativação dos gametas na taxa de fertilização dos ovos de dourado, *Salminus brasiliensis*.

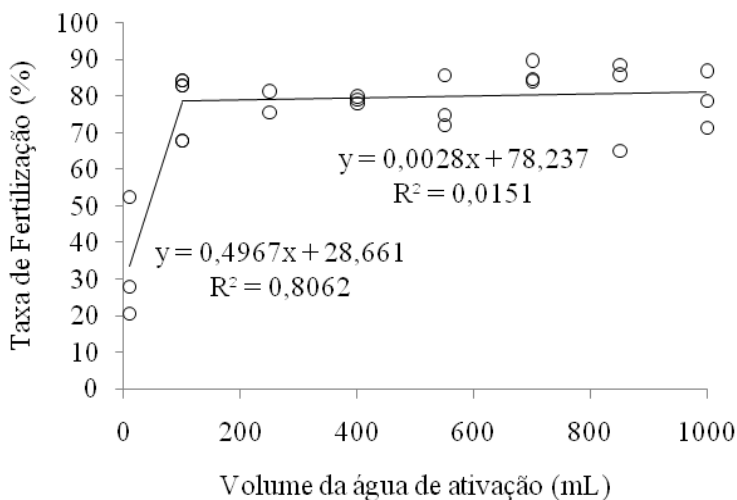


Figura 2 – Efeito do volume da água de ativação (10 a 1.000 mL) dos gametas na taxa de fertilização dos ovos de dourado, *Salminus brasiliensis*.

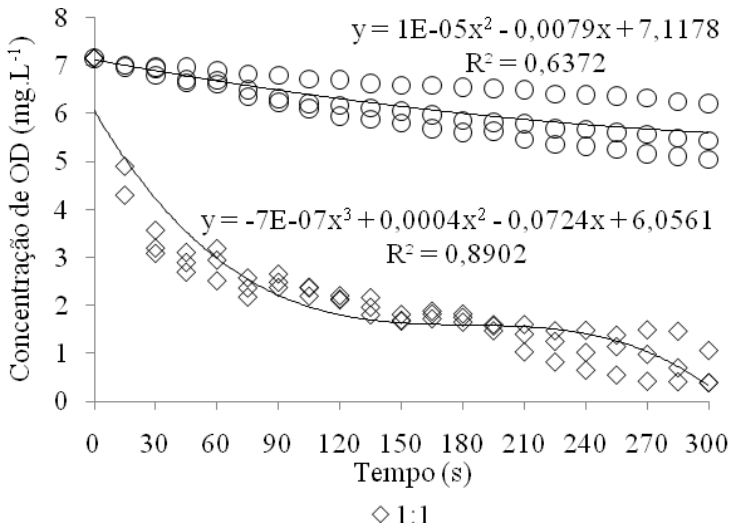


Figura 3 – Variação dos valores de concentração de oxigênio dissolvido da água de ativação dos gametas de dourado (*Salminus brasiliensis*) durante o tempo (segundos) para duas proporções (1:1 e 1:10) entre a quantidade de ovócitos (10g) e o volume de água de ativação (10 e 100 mL).

Experimento III – Efeito de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido da água de ativação dos gametas

A taxa de fertilização dos ovos de dourado não foi afetada pela variação dos valores de concentração de OD da água de ativação dos gametas entre de 0,10 a 10,50 mg.L⁻¹, quando utilizada uma proporção entre ovócitos e volume de água de 1:15 (Figura 4).

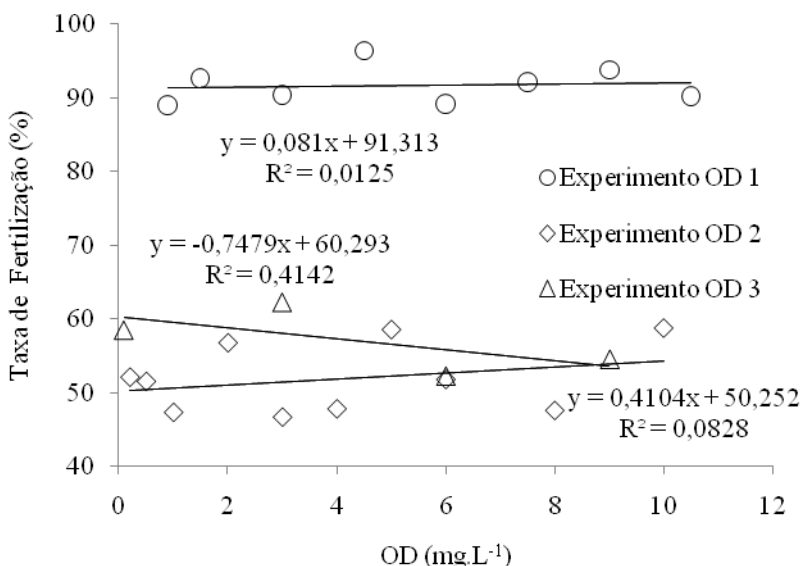


Figura 4 - Taxas de fertilização de ovos de dourado (*S. brasiliensis*) submetidos à diferentes concentrações de OD da água de ativação dos gametas. Cada experimento foi realizado com gametas oriundos de distintos reprodutores (OD-1: valores de OD variando entre 0,90 e 10,50 mg.L⁻¹; OD-2: entre 0,20 a 10,00 mg.L⁻¹; OD-3: entre 0,10 a 9,00 mg.L⁻¹).

A diferenças nas taxas médias de fertilização ($91,75 \pm 2,53\%$ e $51,88 \pm 4,70$) em cada um dos experimentos, provavelmente decorreram da variação na qualidade dos gametas utilizados, porém a concentração de OD da água de ativação não afetou a taxa de fertilização dos ovos de dourado em nenhum dos experimentos realizados.

Experimento IV - Relação entre a quantidade de ovócitos, espermatozoides e o volume da água de ativação (RGA)

Os maiores valores da taxa de fertilização foram registrados quando a relação entre ovócitos e água foi de 1:10 (10g de ovócitos fertilizados com 100 mL de volume da água de ativação), com valor médio (\pm desvio padrão) de $37,44 \pm 14,91\%$ ($P < 0,05$) (Fig. 5). A taxa de fertilização foi semelhante quando a proporção entre ovócitos e água de ativação foi de 1:1 e 1:100, com valor médio de $13,45 \pm 14,38\%$. Quando analisado o volume de sêmen, os melhores resultados foram observados

para o tratamento controle de 0,05 mL com $49,79 \pm 16,84\%$ de fertilização ($P < 0,05$). Nos demais volumes de sêmen não houve diferenças significativas com valor médio de $19,41 \pm 16,27\%$ ($P > 0,05$).

A quantidade de sêmen utilizada para fertilizar 10 g de ovócitos não afetou os valores da taxa de fertilização, apesar disso, houve correlação entre a quantidade de espermatozóides existentes no meio fecundante e a taxa de fertilização. Valores extremos testados apresentaram baixas taxas de fertilização, sugerindo haver um valor ideal para a concentração de espermatozóides para maximizar a fertilização. Considerando-se apenas os testes realizados com a proporção 1:10 (entre a quantidade de ovócitos e o volume da água de ativação), que proporcionou as maiores taxas de fertilização dentre as proporções testadas, a concentração de $7,10 \times 10^6$ espermatozóides.mL⁻¹ no meio fertilizante foi a que proporcionou a maior taxa de fertilização para gametas de dourado (Fig. 6).

DISCUSSÃO

A utilização de um volume de água para a ativação dos gametas superior a 5 vezes a quantidade de ovócitos de *S. brasiliensis* produz altas taxas de fertilização. Essa observação contraria o recomendado para a fertilização dos ovócitos de peixes de água doce, que sugere a inclusão de um pequeno volume de água (Woynarovich e Horvarth, 1980; Pereira et. al., 2006), havendo a recomendação de utilização de 15% de água sobre o peso total dos ovócitos para promover a ativação dos gametas e a fertilização adequada (Furuya e Furuya, 2001). Apesar disso, Woynarovich e Horvarth (1980) relatam que um baixo volume de água de ativação dos gametas pode causar problemas físicos, tais como o impedimento da penetração do espermatozóide devido à obstrução da micrópila pelo muco dos ovários ou mesmo pelo contato entre os ovócitos que podem cobrir a abertura da micrópila.

Coward e Parrington (2003) relataram que os protocolos de fertilização para peixes teleósteos devem ser específicos devido à grande variação nas estratégias reprodutivas adotadas pelas diferentes espécies. Esta afirmação é comprovada quando comparados os resultados satisfatórios obtidos com o uso das técnicas convencionais de fertilização aplicada para a maioria das espécies de peixes de água doce produzidas comercialmente, mas que não tem sido eficientes na fertilização de dourado, conforme os dados apresentados por Sato (1997) e observados neste trabalho.

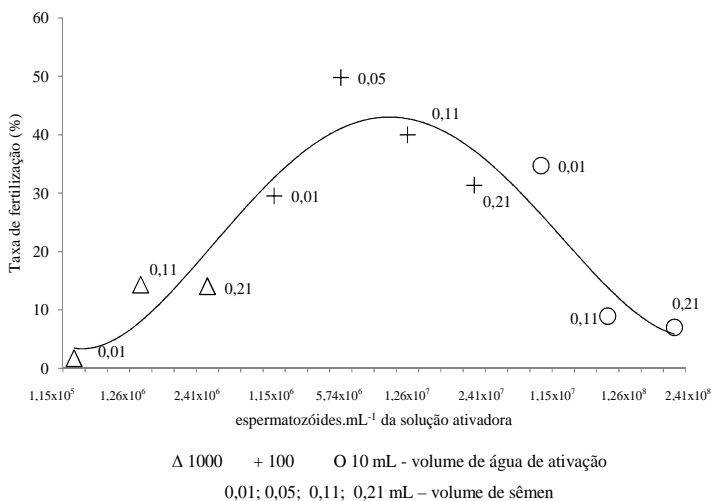


Figura 5 – Efeito do volumen da água de ativação e do volumen de sêmen utilizado para fertilizar 10 gramas de ovócitos de dourado (*Salminus brasiliensis*) sobre a taxa de fertilização (valor indicado ao lado do símbolo que indica o volumen de água de ativação representa o volumen de sêmen utilizado).

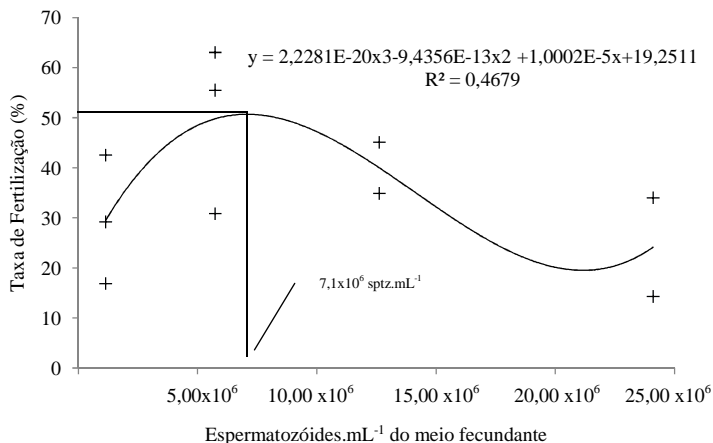


Figura 6 – Efeito da concentração de espermatozoides (sptz.mL⁻¹) no meio fecundante sobre a taxa de fertilização de ovos de dourado (*Salminus brasiliensis*) (proporção de 1:10 - 10 gramas de ovócitos e 100 mL da água de ativação).

As baixas taxas de fertilização observadas no presente trabalho quando foi utilizado um pequeno volume de água de ativação dos gametas podem estar relacionadas à ativação deficiente dos espermatozoides. A motilidade espermática é um fator que afeta a taxa de fertilização dos peixes, sendo utilizada para medir a qualidade do sêmen (Ciereszko et al. 2000; Coward et al, 2002; Streit et al, 2008). Apesar disso, a motilidade pode ser afetada não apenas pela qualidade do sêmen, mas também pela forma como o mesmo é ativado.

Foi observada uma diminuição no tempo e na porcentagem de motilidade do sêmen de esturjão (*Acipenser persicus*) quando utilizado uma diluição de 1:10 (sêmen/água) quando comparado com a proporção de 1:50 (Alavi e Cosson, 2005). De modo semelhante, o tempo de motilidade do sêmen de dourado foi 50% menor quando foi ativado numa relação de 1:1 quando comparado aos resultados de 1:1500 (Sanches et al., 2009). Em ambos os trabalhos, a justificativa para explicar o fato está associada à concentração iônica da solução ativadora, que mantém altos níveis de osmolaridade quando o volume da água de ativação é pequeno.

Alavi e Cosson (2006) descreveram que Na^+ , K^+ , e Cl^+ são os íons predominantes no plasma seminal de peixes de água doce e que a motilidade do espermatozoide está diretamente relacionada à quebra da pressão iônica destes íons. Viveiros et al (2009) verificaram redução de 22% na taxa de motilidade de sêmen de dourado quando foi ativado com uma solução contendo 154 mM de NaCl em comparação com o sêmen ativado com água.

De acordo com Cosson (2010), a concentração osmótica do plasma seminal dos peixes de água doce é de 300 mOsm.L^{-1} , sendo que uma motilidade adequada é observada quando a osmolaridade do meio em que ocorre a ativação apresenta valor em torno de 10 mOsm.L^{-1} . Dessa forma, desconsiderando-se os fluidos provenientes dos ovários, o sêmen deve ser diluído 30 vezes para uma adequada ativação. Estes dados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, visto que as taxas de fertilização foram crescentes com o aumento do volume de água de ativação dos gametas de dourado.

Neste trabalho, o consumo de oxigênio dissolvido durante a ativação dos gametas de dourado ficou evidente, revelando que pode haver uma grande redução na concentração dos valores de oxigênio dissolvido quando o volume da solução ativadora for pequeno. Os espermatozoides de dourado apresenta um curto tempo de vida (Streit et al, 2008; Sanches et al, 2009), iniciando antecipadamente a decomposição do sêmen e o gradativo consumo de oxigênio pela

oxidação. O prejuízo da qualidade de água pela decomposição do sêmen de peixes no momento posterior a fertilização é bem conhecido, sendo recomendadas várias lavagens dos ovos e trocas de água logo após a fertilização (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004).

Apesar de ser observada uma significativa redução na concentração dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação durante a fertilização, a taxa de fertilização de ovos de dourado não foi afetada quando utilizada água com diferentes valores de oxigênio na ativação dos gametas. Esta é uma constatação interessante para a espécie, pois segundo Barbieri et al. (2001), a reprodução do dourado em ambiente natural ocorre em águas caudalosas contendo elevado teor de oxigênio dissolvido.

Autores descreveram consumo mínimo de oxigênio por ovos recém-fertilizados (Parra et al, 1999; Green, 2004), verificando consumo crescente de oxigênio a medida que ocorre o desenvolvimento embrionário e larval. Pelster (1999) cita que *Amphiprion melanopus* tolera um curto período de anóxia na fase inicial embrionária sem afetar o desenvolvimento normal do embrião. Os gametas de dourado não foram afetados pela condição de hipóxia na fase de ativação mantendo elevadas taxas de fertilização. Provavelmente, a necessidade do dourado de buscar águas caudalosas com elevada concentração de oxigênio para a reprodução no ambiente natural pode estar associada a rápida diluição do sêmen no momento de ativação ou mesmo à crescente demanda de oxigênio com o desenvolvimento embrionário e larval.

Avaliando os valores da taxa de fertilização obtidos nas diferentes proporções entre sêmen, ovócitos e água de ativação, verificou-se que a concentração de espermatozóides no meio fecundante (número de espermatozóides por volume da água de ativação) é a condição que mais influencia a taxa de fertilização de dourado. Resultados semelhantes foram observados para outras espécies de peixes (Hoysak e Liley, 2001; Casselman et al. 2006). Os melhores resultados de fertilização foram obtidos numa relação de $7,10 \times 10^6$ espermatozóides por mililitro da solução ativadora, onde concentrações maiores e menores afetaram negativamente a taxa de fertilização. Resultado semelhante foi observado por Sanches et al. (2009) para o dourado, que encontrou uma relação ideal de 30 mil espermatozóides/ovócitos, para obter as máximas taxas de fertilização. Transformando os dados dessa relação ideal apresentada por Sanches et al. (2009), a concentração de espermatozóides por volume de solução ativadora é de $5,76 \times 10^6$ espermatozóides.mL⁻¹, valor um pouco inferior ao observado no presente trabalho.

Algumas espécies de peixes apresentam uma relação mínima de espermatozóides/ovócitos para a obtenção de uma taxa de fertilização máxima, sem que ocorram prejuízos a fertilização quando o volume de sêmen é aumentado (*Sander vitreus*, Rinchard et al., 2005; *Brycon insignis*, Shimoda et al., 2007), enquanto outras, semelhantes ao dourado, apresentam uma relação ideal, a partir da qual, apresentam redução da taxa de fertilização, tais como *Clarias gariepinus* (Rurangwa et al., 1998).

O fator limitante para o sucesso da fertilização está relacionado com a probabilidade do encontro do espermatozóide com a micrópila do ovócito. Dessa forma, ovócitos menores ampliam a chance de fertilização em relação aos maiores, bem como, a ampliação do tempo de viabilidade e a velocidade de natação dos espermatozóides (Cosson, 2010).

Provavelmente, os resultados das baixas taxas de fertilização em consequência da elevada concentração de espermatozóides pode ser devido a polispermia (Blanc, 1892; Kanoh, 1953), embora essa possibilidade seja amplamente questionada (Ginzburg, 1972; Coward et al., 2002; Murata, 2003; Psenicka et al., 2010). Talvez o aumento da concentração espermática possa ter influenciado por meio da elevação da concentração iônica do meio fertilizante, resultando em problema semelhante ao que é observado quando é utilizado um pequeno volume de água para a ativação dos gametas. Essa condição causa uma redução na taxa de fertilização de algumas espécies, entre elas o dourado.

CONCLUSÃO

A taxa de fertilização do dourado foi afetada pela relação entre a quantidade de ovócitos, sêmen e o volume da solução ativadora, embora o fator preponderante tenha sido a concentração de espermatozóides da solução fertilizante, sendo recomendada a concentração espermática de $7,10 \times 10^6$ espermatozóides por mL para obtenção da máxima taxa de fertilização. Adicionalmente, é recomendada a manutenção de uma razão 1:10 (ovócitos : água de ativação) e a adição de aproximadamente 5 mL de sêmen por quilo de desova. A concentração dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação não interferiu sobre a taxa de fertilização do dourado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alavi, S.M.H.; Cosson, J. (2005). Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research* **36**, 841-850.

- Alavi, S.M.H.; Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* **30**, 1-14.
- Andrade, D. R.; Yasui, G. S. (2003). O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **27**, 166 - 172.
- Barbieri, G.; Salles, F. A.; Cestarolli, M. A. (2001). Reproductive and nutritional dynamics of *Salminus maxillosus* Valenciennes (Pisces, Characidae) at Mogi-Guaçu River. São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum* **23**, 441-444.
- Blanc, H. (1892). Note préliminaire sur la maturacion et la fecundation de l'oeuf de La truite. *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles* **25**, 272-275.
- Butts, I.A.E.; Trippel, E.A.; Litvak, M.K. (2009). The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture* **286**, 89–94.
- Casselman, S. J.; Schulte-Hostedde, A. I.; Montgomerie, R. (2006). Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences* **63**, 2119–2125.
- Ciereszko, A.; Glogowski, J.; Dabrowski, K. (2000). Fertilization in landlocked sea lamprey: storage of gametes, optimal sperm: egg ratio, and methods of assessing fertilization success. *Journal Fish Biology* **56**, 495–50
- Cosson, J. (2010). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology* **76**, 240-279.
- Coward, K.; Bromage, N.R.; Hibbitt, O.; Parrington, J. (2002). Gametogenesis, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **12**, 33 – 58.
- Coward, K.; Parrington, J. (2003). New insights into the mechanism of egg activation in fish. *Aquatic Living Resource* **16**, 395-398.
- Fracalossi, D. M.; Meyer, G.; Weingartner, M.; Santamaria, F. M.; Zaniboni-Filho, E. (2004). Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum* **26**, 345-352.
- Furuya, W.M.; Furuya, V. R. B. (2001). Espécies nativas. In: Fundamentos da moderna aquicultura (Marques-Moreira, H.L.; Vargas, L. Ribeiro, R. P.; Zimmermann, S., Orgs.) pp. 83-90. Canoas, Ed. ULBRA.

- Ginzburg, A.S. (1972). *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translocation Ltda.
- Green, B.S. (2004). Embryogenesis and oxygen consumption in benthic egg clutches of a tropical clownfish, *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **138**, 33-38.
- Hoysak, D. J.; Liley, N. R. (2001). Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. *Journal of Fish Biology* **58**, 1286–1300.
- Kanoh, Y. (1953). Über den japanischen hering (*Clupea pallasii* Cuvier et Valenc.). II. Veränderung im Ei bei der Befruchtung oder Aktivierung. *Cytologia* **18**, 67-79.
- Lima, F. C. T.; Malabarba, L. R.; Buckup, P. A.; Silva, J. F. P.; Vari, R. P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakalwa, O. T.; Pavanelli, C. S.; Menezes, N.A.; Lucena, C. A. S.; Malabarba, M. C. S. L.; Lucena, Z. M. S.; Reis, R. E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V. A.; Moreira C.; Lucinda, P.H.F. (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris Jr., Eds) pp. 106–169, Porto Alegre, Edipucrs.
- Morais Filho, M.B.; Schubart, O. (1955). *Contribuição ao estudo do dourado (Salminus maxillosus Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)*. São Paulo, SP: Ministério da Agricultura – Divisão de Caça e Pesca.
- Murata, K. (2003). Blocks to polyspermy in Fish: A Brief Review. In. *32nd Meeting Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species*. Proceedings of the thirty-second UJNR Aquaculture Panel Symposium, Davis and Santa Barbara, California, U.S.A., November 17-18th and 20th.
- Nakano, E. (1953). Respiration during maturation and at fertilization of fish eggs. *Embryologia* **2**, 21-31.
- Parra G., Rønnestad I., Yúfera M. (1999). Energy metabolism in eggs and larvae of Senegal sole. *Journal of Fish Biology* **55**, 205-214.
- Pelster, B. (1999). Environmental influences on the development of the cardiac system in fish and amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* **124**, 407–412.
- Pereira, C. R.; Barcellos, L. J. G.; Kreutz, L. C.; Quevedo, R. M.; Ritter, F.; Silva, L. B. (2006). Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces,

- Teleostei), a south american catfish. *Brazilian Journal Biology* **66**, 1057-1063.
- Psenicka, M.; Rodina, M.; Linhart, O. (2010). Ultrastructural study on fertilization process in sturgeon (Acipenser), function of acrosome and prevention of polyspermy, *Animal Reproduction Science* **117**, 147–154.
- Rinchard, J.; Dabrowski, K.; Van Tassell, J. J.; Stein, R. A. (2005). Optimization of fertilization success in *Sander vitreus* is influenced by the sperm:egg ratio and ova storage. *Journal of Fish Biology* **67**, 1157–1161.
- Rurangwa, E.; Roelants, I.; Huyskens, G.; Ebrahimi, M.; Kime, D. E.; Ollevier, F. (1998). The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology* **3**, 402–413.
- Sanches, E. A.; Bombardelli, R. A.; Baggio, D. M. and Souza, B. E. (2009). Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 2091-2098.
- Sato, Y. ; Fenerich-Verani, N. ; Verani, J. R.; Godinho, H. P.; Vieira, L. J. S. (1997). Artificial reproduction of the dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces: Characidae) from the São Francisco river basin. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **21**, 113-116.
- Shimoda, E.; Andrade, D. R.; Vidal Júnior, M. V.; Godinho, H. P.; Yasui, G. S. (2007). Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the *piabanha* *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **59**, 877-882.
- Streit Jr, D. P.; Sirol, R. N.; Ribeiro, R. P.; Moraes, G. V.; Galo, J. M.; Digmayer, M. (2008). Qualitative parameter of dourado (*Salminus maxillosus*) semen in captivity. *Boletim do Instituto de Pesca* **34**, 337-344.
- Viveiros, A. T. M.; Oliveira, A.V.; Maria, A.N.; Orfão, L.H.; Souza J.C. (2009). Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **61**, 883-889.
- Walsh, W.A.; Swanson, C.; Lee, C-S; Banno, J.E.; Eda, H. (1989). Oxygen consumption by eggs and larvae of striped mullet, *Mugil cephalus*, in relation to development, salinity and temperature. *Journal Fish Biology* **35**, 247-289.

- Weingartner, M.; Zaniboni Filho, E. (2005). Dourado. In *Espécies nativas para a piscicultura do Brasil* (Baldisserotto, B.; Gomes L. C. Orgs.). pp. 257-286. Santa Maria, RS, Editora UFSM.
- Woynarovich, E.; Horváth, L. (1980). The artificial propagation of warm-water finfishes - a manual for extension. *FAO Fisheries Technical Paper* **201**, 183 p.
- Zaniboni-Filho, E.; Barbosa, N. D. C. (1996). Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia* **56**, 655-659.
- Zaniboni-Filho, E.; Schulz, U. H. (2003). Migratory Fishes of the Uruguay River. In *Migratory Fishes of the South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*. (Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A., Orgs.). pp.135-168. Victoria, World Fisheries Trust/IDRC/World Bank.
- Zaniboni-Filho, E.; Nuñez, A.P.O. (2004). Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva* (Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. Orgs.). pp.45-73, São Paulo, SP. AQUABIO.

CAPÍTULO II - EFEITO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DOS OVÓCITOS, QUALIDADE E TEMPO DE MANUTENÇÃO DA ÁGUA DE ATIVAÇÃO DOS GAMETAS SOBRE A TAXA DE FERTILIZAÇÃO DE OVÓCITOS DE DOURADO *Salminus brasiliensis*

Revista: Aquaculture

A ser submetido

Efeito do tempo de estocagem dos ovócitos, qualidade e tempo de manutenção da água de ativação dos gametas sobre a taxa de fertilização de ovócitos de dourado *Salminus brasiliensis*

Marcos Weingartner e Evoy Zaniboni Filho

Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/CCA/UFSC)

Rodovia SC 406, nº 3532, Armação, Florianópolis, SC, 88066-000. (marcos@lapad.ufsc.br)

RESUMO

Vários fatores podem afetar a taxa de fertilização dos ovos durante a reprodução induzida de peixes, sendo que além da qualidade dos gametas, o manejo utilizado pode ser determinante para o sucesso da fertilização. Este trabalho objetiva avaliar o efeito de um curto tempo de estocagem dos ovócitos e o tempo de manutenção da água de ativação dos gametas contendo diferentes concentrações de oxigênio dissolvido sobre a taxa de fertilização de ovos de dourado *Salminus brasiliensis*. Para isso, ovócitos obtidos através de reprodução induzida de duas fêmeas foram fertilizados com diferentes intervalos de tempo (10, 30, 60, 90 e 120 minutos) após a extrusão. Em outro experimento, ovócitos de uma fêmea foram fertilizados com distintos períodos de tempo de manutenção da água de ativação (3, 13 e 23 minutos) e com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (0,1; 3; 6 e 9 mg.L⁻¹). Houve redução na taxa de fertilização com o aumento do tempo entre a extrusão e a inseminação dos ovócitos. Para uma das fêmeas, a queda foi bastante acentuada, sendo diferente entre o controle (10 minutos) e 30 minutos de estocagem com valores (média ± desvio padrão) de fertilização de 63,09±1,11% e 14,66±5,50%, respectivamente. Para a segunda fêmea, não ocorreu diferença significativa entre o controle (10 minutos) e 30 minutos de estocagem com taxa média de fertilização de 90,54±7,35%, que foi superior a observada nos demais tempos de estocagem. A taxa de fertilização do dourado não foi afetada pelas diferentes concentrações dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação, com valor médio de 50,20±8,66%. O tempo de manutenção da água de ativação alterou a taxa de fertilização, sendo de 56,91±4,46% com 3 minutos de exposição e com valores reduzidos com o aumento do tempo de manutenção da água de ativação.

Palavras chaves: água doce; gametas; manutenção; peixes

ABSTRACT

Several factors can affect the fertilization rate of fish eggs during an induced reproduction; besides the quality of the gametes, the management used may be determinant to the fertilization success. This study evaluates the effect of short-term storage of the oocytes in environmental conditions and the time of maintenance of gametes in activation water containing different dissolved oxygen concentrations, to the fertilization of eggs of the dourado *Salminus brasiliensis*. For this, oocytes obtained from two females induced spawning were fertilized with different intervals of time (10, 30, 60, 90 and 120 minutes) after extrusion (experiment 1A and 1B). And in the second experiment, oocytes were fertilized with different time of maintenance in the activation water (3, 13 and 23 minutes) with different dissolved oxygen concentrations (0.1, 3, 6 and 9 mg L⁻¹). The fertilization rate was reduced with increasing time between extrusion and insemination of the oocytes. In experiment 1A (female 1), the decrease in fertilization rates was significant between control (10 minutes) and 30 minutes of storage with fertilization rates (mean ± SD) of 63.09±1.11% and 14.66±5.50%, respectively. Nevertheless, in experiment 1B (female 2), no significant difference was observed between the control (10 minutes) and 30 minutes of storage with an average fertilization rate of 90.54 ± 7.35%, higher than observed in the remaining storage times. The fertilization rate of dourado was not affected by the different dissolved oxygen concentrations of the activation water tested with a mean value of 50.20± 8.66%. The time of maintenance in the activation water altered the fertilization rate, being 56.91±4.46% with 3 minutes of exposure and lower values with increasing time of maintenance in the activation water.

Key-words: fish; freshwater; gametes; short-term storage

1. Introdução

O Brasil possui uma fauna de peixes de água doce diversificada, para a qual são citadas mais de 3.000 espécies conhecidas (McAllister et al., 1997). Diante de tantas espécies, algumas tem se destacado na piscicultura, sendo atualmente amplamente cultivadas, enquanto outras se mantêm como promissoras. Entre os entraves que impedem a expansão da criação das espécies nativas, encontra-se a falta de tecnologia que possibilite a produção massiva das formas jovens. Para muitas espécies de peixes, a obtenção da desova por indução hormonal é facilmente possível, porém, devido à incorreta manipulação dos gametas

é obtida uma baixa taxa de fertilização e, conseqüentemente, uma pequena produção de juvenis. Segundo Coward et al. (2002), incrementar o conhecimento sobre os processos que envolvem a ativação dos gametas e fertilização para o grupo de peixes de interesse para a aquicultura promoverá uma significativa contribuição à expansão dos cultivos.

Entre as espécies amplamente cultivadas no mundo, muito se conhece das exigências dos gametas pós-ovulação para obtenção de razoáveis taxas de fertilização (Rottmann et al., 1991). No entanto, para as espécies nativas brasileiras, faltam conhecimentos essenciais para o sucesso da reprodução em cativeiro. Segundo Zaniboni-Filho (2000), a falta de conhecimento para o cultivo de espécies nativas está relacionado ao fato de que o desenvolvimento inicial da piscicultura brasileira se deu pela criação de espécies exóticas, sendo que, por muito tempo, as espécies autóctones não foram consideradas para a piscicultura nacional. Desta forma, muitas das técnicas utilizadas na reprodução induzida dos peixes nativos ainda estão sendo desenvolvidas, sendo que os principais pacotes tecnológicos voltados à reprodução destes peixes são os mesmos utilizados para as espécies exóticas (Andrade e Yasui, 2003).

Entre as espécies de peixes autóctones que tem despertado interesse entre os piscicultores e centros de pesquisa, destaca-se o dourado, *Salminus brasiliensis*. O interesse por esta espécie se dá pelo seu elevado valor comercial, grande porte e rápido desenvolvimento inicial (Fracalossi et al. 2004).

O dourado (*S. brasiliensis*) é originário da América do Sul, encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, sistema lagunar da lagoa dos Patos e bacia do alto Mamoré e Chaparé na Bolívia (Lima et al., 2003). Esta espécie pode atingir um comprimento total superior a um metro (Morais Filho e Schubart, 1955). Segundo Vazzoler (1996), é uma espécie migradora de desova total anual, possui ovos semi-densos e não apresenta cuidado parental. Por ser uma espécie de piracema, não reproduz naturalmente em cativeiro, necessitando de indução hormonal para atingir a maturação final, ovulação e desova.

De acordo com Weingartner e Zaniboni-Filho (2005), historicamente é descrito que para o dourado baixas taxas de fertilização são obtidas durante o processo de reprodução induzida para diferentes centros de reprodução de peixes no Brasil. Os autores sugerem que as baixas taxas de fertilização estão associada ao uso de procedimentos inadequados no manejo dos gametas, e que a aplicação das técnicas desenvolvidas para as espécies exóticas é inadequada para aplicá-la a

esta espécie. Sato et al. (1997), tendo trabalhado com a reprodução induzida de várias espécies nativas, indica para o dourado (*S. franciscanus*), espécie com características reprodutivas bastante semelhante ao *S. brasiliensis*, há necessidade de melhoria das técnicas de reprodução devido às baixas taxas de fertilização.

Dos processos envolvidos durante a reprodução, as condições em que ocorre a fertilização são determinantes para a obtenção de altas taxas de fertilização, para a garantia da produção final e da qualidade das larvas (Sawada et al., 2006). Notadamente, dentre estes processos o tempo transcorrido entre o momento da liberação dos gametas e a sua ativação pode afetar as taxas de fertilização, sendo um fator importante que deva ser considerado para o sucesso na reprodução (Yang e Chen, 2006).

Este trabalho objetiva avaliar a viabilidade dos ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis*, estocados por curto período após a desova, e o efeito do tempo de manutenção da água de ativação dos gametas com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido sobre esta viabilidade.

2. Materiais e métodos

2.1. Reprodutores

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/UFSC), durante o período reprodutivo 2008/2009. Foram utilizados reprodutores de dourado do plantel mantido pelo LAPAD composto por exemplares selvagens e por seus descendentes diretos (F1 - produto do cruzamento dos indivíduos selvagens). Os indivíduos selvagens foram capturados no alto rio Uruguai, na divisa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os peixes foram individualmente marcados, o que possibilita um controle dos cruzamentos para evitar problemas decorrentes da consanguinidade. Os reprodutores foram mantidos em viveiros de terra de 1.600 metros quadrados numa densidade de estocagem de 1 peixe para cada 25 metros quadrados. Foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial contendo 40% proteína bruta.

Exemplares em maturação final foram selecionados e transferidos para o laboratório, onde foram pesados e mantidos em tanques circulares de 1.000 litros. Para promover à maturação final e ovulação foram aplicadas duas doses do hormônio de extrato bruto de pituitária de carpa, 0,5 mg.kg⁻¹ e 5,0 mg.kg⁻¹, com intervalo de 10 horas entre as aplicações. A água dos tanques de indução foi mantida a uma temperatura de 25,5°C e o oxigênio dissolvido (OD) em

aproximadamente $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Em cada experimento foram utilizados os ovócitos de uma fêmea fertilizados com sêmen homogeneizado provenientes de dois machos (Tabela 1).

A extrusão dos ovócitos nos experimentos que avaliou o tempo de estocagem ocorreu 5,5 horas após a última aplicação hormonal em uma temperatura média de $25,5^\circ \text{C}$, o que representa 140,25 horas-grau para uma das fêmeas utilizadas e para outra, 4,7 horas nessa mesma temperatura, o que representou 123,16 horas-grau. Para o experimento que avaliou a qualidade e tempo de manutenção da água de ativação dos gametas, a extrusão ocorreu em situação similar à primeira fêmea descrita acima.

Nos experimentos os tratamentos foram realizados em triplicata, sendo utilizadas amostras de 10 g de ovócitos e 150 mL de água de ativação em recipientes de 500 mL. Igual volume de sêmen proveniente de dois machos foi previamente homogeneizado e posteriormente misturado aos ovócitos, mantendo uma proporção de 5 mL de sêmen por quilo de ovócitos.

2.2. Efeito do tempo de estocagem sobre a taxa de fertilização

Em dois experimentos (1A e 1B) foram avaliadas a influência do tempo de estocagem dos ovócitos, entre a extrusão e a ativação dos gametas sobre a taxa de fertilização. Os ovócitos foram estocados em temperatura ambiente por distintos intervalos de tempo: 10 minutos (controle), 30, 60, 90 e 120 minutos entre a extrusão dos ovócitos e a indução à fertilização. O tempo de 10 minutos foi utilizado como controle pelo fato deste ser o tempo mínimo necessário para a manipulação dos gametas entre a extrusão e o início da fertilização. O tempo de manutenção da água de ativação até os ovos serem lavados foi de 3 minutos, tendo a água de ativação uma concentração de oxigênio dissolvido de $7,50 \text{ mg.L}^{-1}$. Posteriormente os ovos foram estocados em incubadoras cilindro-cônicas de 10L, mantidas com fluxo constante de água. Durante a estocagem em condição ambiente, 640 e 474 gramas (respectivamente experimentos 1A e 1B) de ovócitos foram mantidos em becker de 2 L, coberto com uma toalha umedecida e estocados a uma temperatura de $22,8^\circ \text{C}$. A motilidade do sêmen foi avaliada no início e no final do tempo de estocagem dos ovócitos, mantendo motilidades semelhantes durante este período, com tempo de motilidade superior a 40 segundos. Essa condição experimental permitiu garantir que as eventuais diferenças nas taxas de fertilização fossem atribuídas somente ao tempo de estocagem dos ovócitos. Durante o período de estocagem dos ovócitos, o sêmen de dois machos (5 mL de cada macho)

foi armazenado em tubo de falcon de 12 mL e mantido em gelo, sendo misturados com os ovócitos apenas no momento da fertilização.

2.3. Efeito do tempo de manutenção da água de ativação e da concentração de oxigênio dissolvido

Outro experimento foi realizado para avaliar o efeito do tempo de manutenção da água de ativação e a influência da concentração de oxigênio dissolvido dessa água na taxa de fertilização. A água de ativação é aquela adicionada aos gametas para desencadear o processo de hidratação dos ovócitos e motilidade do sêmen, técnica conhecida como fertilização à seco (Lahnsteiner et al., 2003). Para retirada do excesso de sêmen lavou-se os ovos imediatamente após a fertilização, do contrário, pode haver o comprometimento da qualidade da água durante a incubação dos ovos pela oxidação e decomposição do sêmen remanescente.

Neste experimento, os ovócitos foram fertilizados 10 min após a extrusão com diferentes intervalos de tempo de manutenção da água de ativação (3, 13 e 23 min), e variando a concentração de oxigênio dissolvido da água de ativação (0,1; 3,0; 6,0 e 9,0 mg.L⁻¹). Decorrido o tempo de manutenção da água de ativação, conforme cada um dos tratamentos, a água de ativação foi drenada para retirada do excesso de sêmen e os ovos liberados nas incubadoras, semelhante ao descrito no experimento anterior.

2.4. Análise dos dados

Foi utilizada a taxa de fertilização para avaliar o efeito do tempo de estocagem dos ovócitos e a influência do tempo de manutenção e concentração de OD da água de ativação. A avaliação da taxa de fertilização foi realizada sete horas após a inseminação, quando foi observada a fase de fechamento do blastóporo. Para tal, foram amostrados cerca de 260 ovos de cada incubadora. A taxa de fertilização foi calculada pela fórmula:

$$\text{Taxa de fertilização (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ovos fertilizados}}{\text{N}^\circ \text{ total de ovos observados}} \times 100$$

Em ambos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de regressão para avaliar o efeito dos tratamentos sobre as taxas de fertilização. Foi utilizada ANOVA NESTED no experimento no experimento que avaliou o tempo de estocagem para verificar a existência de diferença estatística nas taxas de fertilização entre os

tratamentos, bem como dos diferentes peixes utilizados nos experimentos, e o Teste de Tukey como teste de separação de médias. Uma ANOVA BIFATORIAL também foi usada para analisar a interação entre tempo de manutenção da água de ativação dos gametas e a concentração de oxigênio da mesma.

3. Resultados

Foi observada a redução na taxa de fertilização com o aumento do tempo de estocagem dos ovócitos em ambos os experimentos (Figura 1). No experimento 1A, a queda foi acentuada, com diferença significativa ($P < 0,01$) entre o controle (10 minutos) e a estocagem de 30 minutos. Decorridos 30 minutos de estocagem a taxa de fertilização foi menor que $\frac{1}{4}$ daquela observada no tratamento controle ($63,09 \pm 1,11\%$). Esse valor foi reduzido para $4,16 \pm 2,34\%$ depois de 60 minutos de estocagem e nulo após 90 minutos. Apesar disso, no experimento 1B, não ocorreram diferenças significativas entre o tratamento controle (10 minutos) e aquele com 30 minutos de estocagem, com taxa de fertilização média de $90,54 \pm 7,35\%$. Esses tratamentos apresentaram taxas de fertilização maiores que as observadas quando o tempo de estocagem dos ovócitos foi igual ou superior a 60 minutos ($P < 0,01$). Após o tempo de estocagem de 30 minutos, houve uma gradativa redução dos valores com o aumento do tempo de estocagem, atingindo o valor médio de $8,67 \pm 5,20\%$ após 120 minutos de estocagem.

A análise da variância aninhada (ANOVA, NESTED) mostrou haver efeito do tempo de estocagem e da fêmea na taxa de fertilização dos ovócitos estocados por diferentes tempos.

Tabela 1 – Dados biométricos dos reprodutores e detalhes dos gametas utilizados nos experimentos.

Experimentos	Peso dos peixes (g)	Peso desova (g) ou vol. sêmen (mL) ¹	Número de ovócitos por grama	Fecundidade total (Nº de ovócitos)	Concentração de espermatozóides.m L ⁻¹	
1A	Fêmea	10.150	640	1.208	773.120	-
	Macho 1	3.000	5	-	-	9,35 x 10 ⁹
	Macho 2	3.100	5	-	-	9,65 x 10 ⁹
1B	Fêmea	8.070	474	1.111	526.614	-
	Macho 1	3.500	5	-	-	8,85 x 10 ⁹
	Macho 2	3.180	5	-	-	8,20 x 10 ⁹
2	Fêmea	2.600	435	1.220	530.700	-
	Macho 1	1.300	5	-	-	12,40 x 10 ⁹
	Macho 2	1.100	5	-	-	10,55 x 10 ⁹

– foi retirado apenas 5 mL de sêmen de cada macho, sem esgotá-los.

O tempo de manutenção da água de ativação apresentou influência na taxa de fertilização ($P < 0,05$), que foi maior quando mantida por 3 minutos (Figura 2). Esse valor foi reduzido em cerca de 20% quando a água de ativação foi mantida por 13 ou 23 minutos. A concentração dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação não afetou a taxa de fertilização dos ovos de dourado ($P > 0,05$), nem mesmo quando a água de ativação foi mantida por um tempo prolongado (23 minutos).

4. Discussão

A taxa de fertilização apresentou redução quando os ovócitos de dourado foram estocados por curto período de tempo, sendo afetada depois de 30e 60 minutos nos experimentos 1A e 1B respectivamente. Aparentemente, a qualidade dos ovócitos estocados interferiu no tempo de viabilidade dos ovócitos.

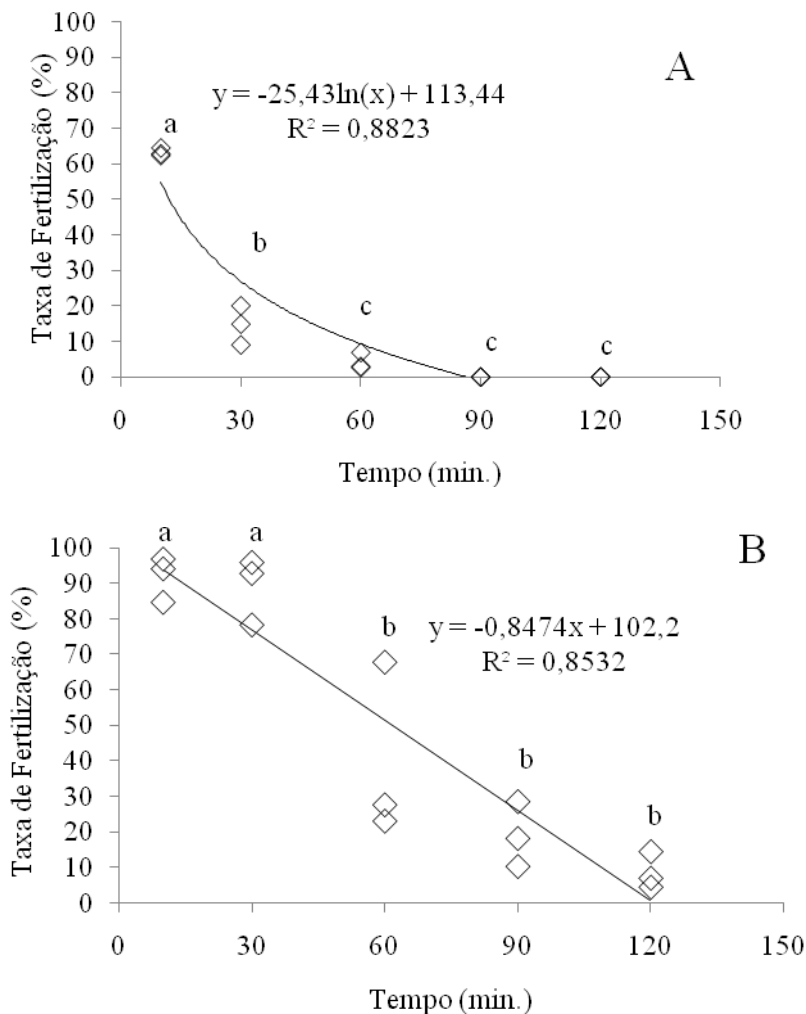
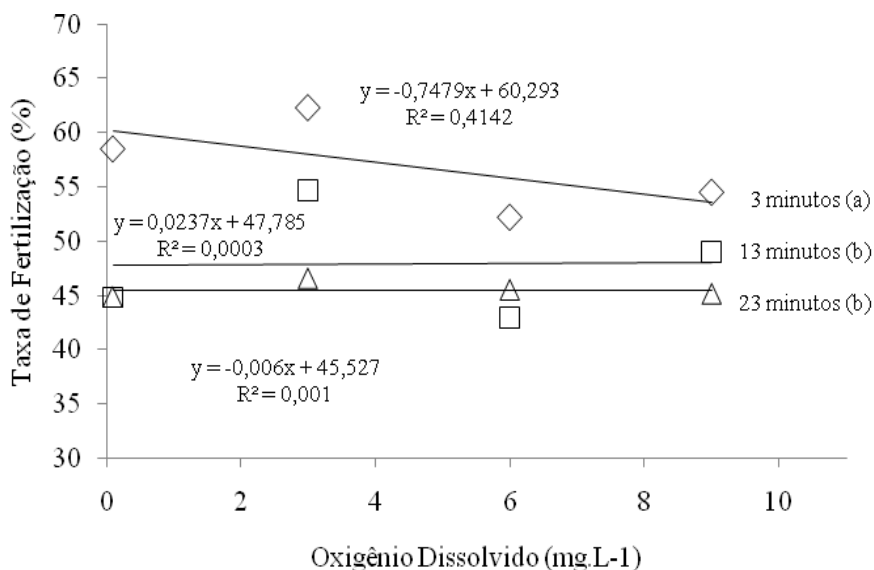


Figura 1 – Taxas de fertilização de ovos de dourado, *Salminus brasiliensis*, fertilizados em diferentes períodos de tempos após a extrusão (A: experimento 1A; B: experimento 1B). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.



◇ 3 minutos □ 13 minutos △ 23 minutos

Figura 2 – Efeito do tempo de manutenção da água de ativação dos gametas e da concentração de OD contida na água sobre a taxa de fertilização de ovos de dourado, *Salminus brasiliensis*. (Letras diferentes demonstram diferença estatística para tempo de manutenção da água de ativação - $P < 0,01$, teste de Tukey).

O experimento em que os ovócitos permaneceram viáveis por um tempo superior apresentou uma taxa de fertilização cerca de 30% superior no tratamento controle, quando comparado com o taxa do experimento 1A. Durante a reprodução induzida, enquanto a extrusão da fêmea do experimento 1A ocorreu depois que já haviam sido observados alguns poucos ovócitos liberados no tanque de indução, a fêmea do experimento 1B não havia liberado ovócitos no tanque antes da extrusão, sendo possível observar a ruptura da membrana que recobre a saída do canal do oviduto na região do orifício urogenital. Essas observações indicaram que o tempo entre a ovulação e a coleta dos ovócitos foi diferente entre as fêmeas, podendo este tempo ter interferido na qualidade dos ovócitos no início da experimentação. Em teste de estocagem dos ovócitos de *Prochilodus marginatus*, Rizzo et al. (2003), observaram que o prejuízo na taxa de fertilização é maior quando os ovócitos são mantidos no interior dos ovários, quando

comparada aos ovócitos coletados e mantidos em condições semelhantes às utilizadas neste trabalho. Por outro lado, essa diferença observada entre as fêmeas pode ser atribuída a simples diferença da qualidade dos ovócitos produzidos por cada uma delas, como sugerido por Nguenga et al. (2004) para o bagre africano, *Heterobranchus longifilis*.

A manutenção da qualidade dos ovócitos de peixes estocados após a extrusão varia entre as diferentes espécies. Peixes de clima temperado tendem a manter a qualidade dos gametas por períodos que podem chegar a várias horas após a coleta. Enquanto espécies de esturjão (*Acipenser ruthenus* e *Acipenser baeri*) mantêm semelhantes taxas de fertilização por até quatro horas de estocagem (Gisbert e Williot, 2002), os ovócitos de truta (*Oncorhynchus mykiss*) apresentam a mesma viabilidade para fertilização e eclosão quando mantidos por até 48 horas juntamente com o fluído celomático (Goetz e Coffman, 2000). Para peixes de clima tropical e subtropical, de modo geral, os ovócitos estocados tendem a perder a viabilidade rapidamente, mantendo suas características inalteradas por alguns poucos minutos (Espinach et al., 1984; Richter e Van der Hurk, 1982; Rizzo et al., 2003).

A estrutura dos ovócitos de *P. marggravii* estocados por um período de até duas horas após a ovulação não apresenta alteração, no entanto, foram observadas modificações no citoesqueleto (Rizzo et al., 2003). Os autores descrevem que essas modificações não impediram a fertilização, porém, prejudicaram o desenvolvimento inicial dos ovos, levando-os à morte. De acordo com Linhart et al. (1995), após a ovulação ocorre uma redução dos processos aeróbicos dos ovócitos e tem início uma rota metabólica alternativa com produção de ácido láctico, fazendo com que o pH diminua rapidamente. A redução do pH em condições de estocagem de ovócitos também foi observada por Hajirezaee e Niksirat (2009) para *A. persicus*.

Apesar da redução da viabilidade dos ovócitos ao longo do tempo em que são armazenados em temperatura ambiente, trabalhos têm mostrado que o armazenamento dos ovócitos sob refrigeração produz resultados de fertilização ainda menores que aqueles mantidos em temperatura ambiente (Glenn e Tiersch, 2002; Rizzo et al., 2003).

A concentração dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação não interferiu na taxa de fertilização dos ovos de dourado, mesmo quando a água de ativação foi mantida em contato com os gametas por um tempo longo (23 minutos). Trabalhos têm mostrado que na fase inicial de desenvolvimento dos ovos de peixes, a condição de hipóxia pode não prejudicar o desenvolvimento normal do embrião (Nakano, 1953; Parra et al., 1999; Pelster, 1999; Green, 2004). A

exposição de ovos de *Seriola dumerili* na fase de gástrula, durante duas horas a uma concentração de OD de $0,90 \text{ mg.L}^{-1}$, não promoveu prejuízos durante o desenvolvimento embrionário, o que foi observado quando a exposição ocorreu durante a fase de aparecimento dos somitos (Sawada et al., 2006). A tolerância a baixas concentrações de OD na fase inicial do desenvolvimento dos ovos tem sido atribuída à uma adaptação às condições naturais, pois, enquanto ainda não estão completamente hidratados, os ovos são mais densos e menos facilmente movimentados pela água, podendo experimentar momentos de hipóxia (Sawada et al., 2006).

O aumento no tempo de manutenção da água de ativação dos gametas interferiu negativamente na taxa de fertilização, embora esse prejuízo não esteja associado ao suprimento de oxigênio dissolvido. Um fator que pode ter contribuído para a diminuição da viabilidade dos ovos com o aumento do tempo de manejo para a fertilização, pode estar relacionado à maior exposição dos ovos a choques mecânicos. Enquanto os ovos de cada tratamento foram incubados em volume de 10 L durante a fase de ativação dos gametas foram mantidos em movimento constante em recipiente contendo apenas 150 mL de água. Essa condição sugere que os ovos expostos a um maior tempo com a água de ativação, estiveram mais suscetíveis a choques mecânicos. Autores têm relatado mortalidade devido à sensibilidade dos ovos de peixes a choques mecânicos, principalmente na fase inicial de desenvolvimento (Jensen e Alderdice, 1989; Crisp, 1990; Hilomen-Garcia, 1998). Essa maior sensibilidade na fase inicial do desenvolvimento dos ovos pode estar associada à pequena hidratação dos ovos, o que reduz a proteção oferecida pelo amplo espaço perivitelínico (Jones et al., 2009).

5. Conclusões

Os ovócitos de dourado são sensíveis à estocagem após a extrusão, embora haja variação no intervalo de tempo de viabilidade entre os ovócitos provenientes de fêmeas distintas, sendo recomendada a fertilização em intervalo de tempo inferior a 30 min, visto que para ambas as fêmeas foram observadas altas taxas de fertilização quando a fertilização ocorreu 10 min após da coletas dos ovócitos. A concentração dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação dos gametas não afetou a taxa de fertilização dos ovos. O tempo de manutenção da água de ativação para a obtenção da máxima taxa de fertilização foi de 3 minutos, quando então a água deve ser drenada e os ovócitos liberados nas incubadoras.

6. Referências bibliográficas

- Andrade, D.R.; Yasui, G.S., 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27, 166-172.
- Coward, K.; Bromage, N.R.; Hibbitt, O.; Parrington, J., 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 33-58.
- Crisp D.T., 1990. Some effects of application of mechanical shock at varying stages of development upon the survival and hatching time of British salmonid eggs. *Hydrobiologia* 194, 57-65.
- Espinach, R. A.; Amutio, V.G.; Mestre Arceredillo, J.P.; Orti, G.; Nani, A., 1984. Induced breeding of the South American catfish, *Rhamdia sapo* (C. & V). *Aquaculture* 37, 141-146.
- Fracalossi, D. M.; Meyer, G.; Weingartner, M.; Santamaria, F. M.; Zaniboni-Filho, E., 2004. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum* 26, 345-352.
- Gisbert, E.; Williot, P., 2002. Influence of storage duration of ovulated eggs prior to fertilization on the early ontogenesis of Sterlet, *Acipenser ruthenus*, and Siberian sturgeon, *A. Baeri*. *International Review of Hydrobiology* 87, 605-612.
- Glenn, D.W. III; Tiersch, T.R., 2002. Effect of extenders and osmotic pressure on storage of eggs of ornamental common carp *Cyprinus carpio* at ambient and refrigerated temperatures. *Journal World Aquaculture Society* 33, 254-267.
- Goetz, F.W.; Coffman, M.A., 2000. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media, *Aquaculture* 184, 267-276.
- Green, B., 2004. Embryogenesis and oxygen consumption in demersally spawned egg clutches of a tropical clownfish (Pomacentridae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 138, 35-40.
- Hajirezaee, S.; Niksirat, H., 2009. *In Vitro* Storage of Ova of Persian Sturgeon, *Acipenser persicus* in Ovarian Fluid: the Changes in the pH and Osmolality of the Ovarian Fluid, Fertilization and Hatching Rates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3, 3438-3442.
- Hilomen-Garcia, G.V., 1998. Sensitivity of fertilized milkfish, *Chanos chanos* Forsskal eggs to mechanical shock and simulated transport. *Aquaculture* 159, 239-247.

- Jensen, J.O.T.; Alderdice, D.F., 1989. Comparison of mechanical shock sensitivity of eggs of five Pacific salmon (*Oncorhynchus*) species and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 78, 163-181.
- Jones, M.; Battaglione, S.C.; Pankhurst, P.M., 2009. Sensitivity of striped trumpeter, *Latris lineata*, embryos to mechanical shock and simulated transport. *Aquaculture International* 17, 331-340.
- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T., 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology* 60, 829-841.
- Lima, F.C.T.; Malabarba, L.R.; Buckup, P.A.; Silva, J.F.P.; Vari, R.P.; Harold, A.; Benine, R.; Oyakalwa, O.T.; Pavanelli, C.S.; Menezes, N.A.; Lucena, C.A.S.; Malabarba, M.C.S.L.; Lucena, Z.M.S.; Reis, R.E.; Langeani, F.; Cassati, L.; Bertaco, V.A.; Moreira, C.; Lucinda, P.H.F., 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J.Jr. (Eds), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 106-169.
- Linhart, O.; Kudo, S.; Billard, R.; Slechta, V.; Mikodina, E.V., 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture* 129, 75-93.
- McAllister, D.E.; Hamilton, A.L.; Harvey, B., 1997. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. *Sea Wind* 11, 1-142.
- Morais Filho, M.B.; Schubart, O., 1955. Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). Ministério da Agricultura – Divisão de Caça e Pesca, São Paulo.
- Nakano, E., 1953. Respiration during maturation and at fertilization of fish eggs. *Embryologia* 2, 21-31.
- Nguenga, D.; Teugels, G.G.; Legendre, M.; Ollevier, F., 2004. Effects of storage and incubation temperature on the viability of eggs, embryos and larvae in two strains of an African catfish, *Heterobranchus longifilis* (Siluriformes, Clariidae). *Aquaculture Research* 35, 1358 – 1369.
- Parra, G.; Rønnestad, I.; Yúfera, M., 1999. Energy metabolism in eggs and larvae of Senegal sole. *Journal Fish Biology* 55, 205-214.

- Pelster, B., 1999. Environmental influences on the development of the cardiac system in fish and amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* 124, 407–412.
- Richter, C.J.J.; Van den Hurk, R., 1982. Effects of 1 α -desoxycorticosterone-acetate and carp pituitary suspension on follicle maturation in the ovaries of the African catfish, *Clarias lazera* (C. & V.). *Aquaculture* 29, 53-66.
- Rizzo, E.; Godinho, H.P.; Sato, Y., 2003. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. *Theriogenology* 60, 1059–1070.
- Rottmann, R.W.; Shireman, J.V.; Chapman, F.A., 1991. Techniques for Taking and Fertilizing the Spawn of Fish. SRAC Publication, Stoneville, n. 426, 8p.
- Sato, Y.; Fenerich-Verani, N.; Verani, J.R.; Godinho, H. P.; Vieira, L.J.S., 1997. Reprodução artificial do dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces: Characidae) da bacia do rio São Francisco. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 21, 113-116.
- Sawada, Y.; Hattori, M.; Iteya, M.; Takagi, Y.; Ura, K.; Seoka, M.; Kato, K.; Kurata, M.; Mitatake, H.; Katayama, S.; Kumai, H., 2006. Induction of centrum defects in amberjack *Seriola dumerili* by exposure of embryos to hypoxia. *Fisheries Science* 72, 364–372.
- Vazzoller, A.E.A. de M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. Ed. Universidade de Maringá, Maringá.
- Weingartner, M.; Zaniboni Filho, E., 2005. Dourado. In: Baldissotto, B.; Gomes, L.C. (Orgs). *Espécies nativas para a piscicultura do Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 257-286.
- Yang, Z.; -Chen, Y.F., 2006. Relationship between time of insemination postovulation and fertilization rate of eggs of obscure puffer fish, *Takifugu obscurus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 37, 334–338.
- Zaniboni-Filho, E., 2000. *Larvicultura de peixes*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte 21, 69-77.

**CAPÍTULO III - USO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO NA
FERTILIZAÇÃO DE OVÓCITOS DE DOURADO, *Salminus
brasiliensis***

Revista: Acta Scientiarum

A ser submetido

USO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO NA FERTILIZAÇÃO DE OVÓCITOS DE DOURADO, *Salminus brasiliensis*

Marcos Weingartner & Evoy Zaniboni Filho

Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/CCA/UFSC)

Rodovia SC 406, n° 3532, Armação, Florianópolis, SC, 88066-000. (marcos@lapad.ufsc.br)

Resumo

O dourado, *Salminus brasiliensis* é um peixe migrador que tem despertado interesse para piscicultura. Os procedimentos para a sua reprodução induzida já estão dominados, contudo, o uso de sêmen criopreservado ainda apresenta uso restrito. Desta forma, objetivou-se avaliar o uso de sêmen criopreservado ativado com distintos ativadores (água, NaCl 0,45% e NaHCO₃ 1%), a variação do volume de sêmen criopreservado (0,025; 0,05 e 0,10 mL para 10 g de ovócitos) e do período de tempo de manutenção da solução ativadora (30; 60; 180 e 300 s) na taxa de fertilização. Para tal, o sêmen foi coletado, misturado à solução crioprotetora (10% DMSO, 5% glicose, 1 gema de ovo de galinha e 135 mL de água destilada) na proporção de 1:4 (sêmen:solução) e criopreservado em palhetas de 0,5 mL em vapor de nitrogênio líquido. Ovócitos foram obtidos por reprodução induzida e amostras de 10 g oriundas de uma única fêmea foram separadas e fertilizadas conforme os distintos tratamentos, utilizando 100 mL de solução ativadora, e um controle fertilizado com um volume equivalente de sêmen fresco. As diferentes soluções testadas e a duração do tempo de contato dos ativadores com os gametas afetaram significativamente as taxas de fertilização, com valores que variaram entre 13,4 e 27,8%, enquanto o uso de sêmen fresco propiciou 80,8% de taxa de fertilização. A relação entre sêmen criopreservado e ovócito interferiu na taxa de fertilização do dourado, sendo recomendado o equivalente a 0,05 mL de sêmen criopreservado para fertilizar 10g de ovócitos. Estes valores obtidos são semelhantes ao observado para outras espécies sul-americanas quando utilizado sêmen criopreservado na fertilização, no entanto, são baixos quando comparado ao uso de sêmen fresco.

Palavras chaves: espermatozóides; congelamento; reprodução induzida; peixes; água doce

Abstract

The dourado *Salminus brasiliensis* is a migratory fish species that has attracted interest for aquaculture. The induced spawning is already controlled but the use of cryopreserved sperm is still restricted. The goal of this study was to evaluate the use of cryopreserved sperm activated with different solutions (water, NaCl 0.45% and NaHCO₃ 1%), different sperm : egg ratio (0.025; 0.05 and 0.10 mL to 10 g oocytes) and different time of maintenance of activator solution (30; 60; 180 and 300 seconds) on the fertilization rate. Sperm was collected and mixed with cryoprotectant solution (10% DMSO, 5% glucose, 1 egg yolk of chicken and 135 mL of distilled water) at a ratio of 1:4 (sperm : solution) and frozen in dry shipper in 0.5 mL straws. Oocytes were obtained by induced spawning and samples of 10 g were separated and fertilized according to different treatments, using 100 mL of activator solution. A control treatment was fertilized with fresh sperm. The different solutions tested and the time of the maintenance of activator solutions affected the fertilization rates, which varied between 13.4 and 27.8%. The use of fresh sperm provided 80.8% of fertilization rate. The sperm : egg ratio affected the fertilization rate, where 0.05 mL of frozen sperm to fertilize 10g of oocytes presented the best results. The results obtained were similar to the observed for other South American species when using cryopreserved semen for fertilization, however, they were low when compared to using fresh sperm.

Key-words: spermatozoa; frozen; insemination; fish; fresh water

Introdução

Os trabalhos referentes à criopreservação de sêmen de peixes foram iniciados na década de 1950 com a descoberta dos primeiros crioprotetores (Tiersch, 2008). No Brasil, o desenvolvimento de tecnologia para a criopreservação de sêmen das espécies nativas foi intensificado durante os anos 90, impulsionados principalmente pela preocupação com a preservação da variabilidade genética das populações selvagens, devido à construção de barragens de usinas hidrelétricas e à degradação dos habitats (Carolsfeld et al., 2003).

Na aquicultura, o uso da técnica de criopreservação permite maximizar o uso dos machos de um plantel de reprodutores através de coletas sucessivas de sêmen durante o período reprodutivo, aumentando a produção de sêmen por indivíduo. Essa possibilidade diminui o número de reprodutores necessários para a produção e, conseqüentemente, reduz os custos de manutenção do plantel. Outra vantagem está associada à variação da qualidade do sêmen ao longo do

período reprodutivo, possibilitando que as coletas para armazenamento fossem feitas quando os machos estivessem no auge da produção de sêmen (Yao et al., 2000). Esta técnica também favorece a realização de trabalhos de melhoramento genético pela facilidade de manipulação do sêmen, ajudando no desenvolvimento de novas linhagens. Além disso, um dos fatores mais importantes dessa técnica é a possibilidade de armazenar germoplasma, garantindo a manutenção da variabilidade genética de populações ameaçadas de extinção (Carolsfeld et al., 2003).

O dourado, *Salminus brasiliensis* se enquadra dentre as espécies Sul-americanas com interesse para a aquacultura e com necessidade de trabalhos de conservação, estando entre as espécies ameaçadas de extinção em várias bacias hidrográficas de sua área de distribuição. O dourado é um peixe nativo da América do Sul, sendo encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, sistema lagunar da lagoa dos Patos e bacia do alto Mamoré e Chaparé na Bolívia (Lima et al., 2003). Pode atingir comprimento total superior a um metro (Morais Filho e Schubart, 1955). Segundo Vazzoler (1996), é uma espécie migradora de desova total anual, que possui ovos semi-densos e que não apresenta cuidado parental. Por ser uma espécie de piracema, não reproduz naturalmente em cativeiro, necessitando de indução hormonal para a maturação final, ovulação e desova.

Estudos sobre a criopreservação do sêmen de dourado tem sido realizados desde a década de 90 (Carolsfeld et al., 2003), apesar disso, se limitaram a avaliar a qualidade do sêmen criopreservado através da medida de motilidade espermática. O teste ideal para avaliar a qualidade do sêmen criopreservado é a avaliação da taxa de fertilização dos ovócitos (Viveiros et al., 2009). Desta forma, objetivou-se estimar a taxa de fertilização obtida pelo uso de diferentes soluções crioprotetoras, pelo uso de volume crescente de sêmen criopreservado e pelo tempo de contato da solução ativadora com os gametas de dourado.

Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/UFSC), durante os períodos reprodutivos entre 2007 e 2009. Foram utilizados reprodutores de dourado do plantel mantido pelo LAPAD que é composto por exemplares selvagens capturados no alto rio Uruguai, bem como por descendentes diretos (F1 – peixes produzidos pelo cruzamento dos indivíduos selvagens). Os reprodutores foram mantidos em viveiros de terra de 1.600 metros quadrados e alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial contendo 40% proteína bruta.

Para os trabalhos de reprodução, os peixes foram coletados nos viveiros e selecionados os machos que liberavam sêmen com leve pressão abdominal e as fêmeas que apresentavam abdômen abaulado, macio e abertura do orifício genital. Os peixes foram levados para o laboratório onde foram pesados e mantidos em tanques circulares de 1.000 litros. Para promover a maturação final e a ovulação, as fêmeas receberam duas injeções intramusculares de extrato bruto de pituitária de carpa ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), com intervalo de 10 h entre as aplicações, sendo que os machos receberam 80% destas doses. Para os testes de fertilização, foram utilizados os gametas de uma fêmea e de dois machos para a realização de cada experimento (Tabela 1). Durante a indução, os peixes foram mantidos em tanques com água a uma temperatura de $25,5^{\circ}\text{C}$, e concentração de oxigênio dissolvido em $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Os dados biométricos dos reprodutores utilizados e as principais características dos gametas estão apresentados na Tabela 1. Os detalhes dos experimentos estão apresentados na Tabela 2.

Criopreservação

Para a realização dos experimentos, o sêmen de oito machos foram coletados e, posteriormente, amostras foram criopreservadas. Foram utilizados machos cujo sêmen fresco apresentava tempo de motilidade superior a 40 segundos. Para a coleta do sêmen, os machos foram retirados dos tanques, enrolados em toalhas e colocados sobre uma mesa acolchoada. Após secar a região urogenital com papel toalha, o sêmen foi retirado através de pressão abdominal, tomando-se o cuidado para evitar a contaminação do sêmen por fezes e urina. Para o teste de motilidade espermática os machos não foram induzidos antes da coleta do sêmen e também não foi realizada a contagem da concentração espermática. Neste experimento, o sêmen foi criopreservado e a taxa de motilidade foi realizada após um mês de estocagem. Para os demais experimentos, que envolveram o uso de sêmen fresco como tratamento controle, o sêmen foi coletado uma hora antes do teste de fertilização. Nos tratamentos, o sêmen foi misturado à solução crioprotetora, envasado em palhetas de 0,5 mL e acondicionado em botijão de vapor de nitrogênio (Taylor-Wharton, modelo CP 300). Amostras de sêmen fresco foram mantidas em tubos de falcon e acondicionadas em recipiente com gelo até o momento da fertilização, sendo estas consideradas tratamento controle.

Como solução crioprotetora foi utilizada a fórmula genérica desenvolvida para peixes migradores Sul-americanos e que consiste na mistura de 10% (15 mL) de DMSO (dimetilsulfóxido), 5% (7,5 g) de

glicose e uma gema de ovo de galinha, acrescidos a 135 mL de água destilada (Carolsfeld et al., 2003). O sêmen foi adicionado à solução crioprotetora numa relação de 1:4 (sêmen:solução) e armazenado em palhetas de 0,5mL, de modo que esta combinação continha 0,1 mL de sêmen em cada palheta.

Teste de motilidade do sêmen criopreservado - MTL

As amostras do sêmen criopreservado foram mantidas por 24 horas em vapor de nitrogênio e, posteriormente, transferidas para botijão de nitrogênio líquido, onde permaneceram estocadas por um mês até a realização dos testes de motilidade.

Para o descongelamento, a palheta com o sêmen congelado foi imersa em água a temperatura ambiente de 25 °C que foi mantida por 40 segundos. Posteriormente, uma gota do conteúdo da palheta foi retirada e colocada sobre lâmina e procedida à mistura com a solução ativadora (0,5 mL). A avaliação da motilidade espermática foi realizada sob microscópio (400x). Para cada solução ativadora testada (água, NaCl 0,45% e NaHCO₃ 1%), o tempo de motilidade foi avaliado quatro vezes (Tabela 1).

Diferentes soluções ativadoras na fertilização de ovócitos - ATV

Neste experimento, ovócitos de dourado foram fertilizados usando sêmen fresco e a taxa de fertilização comparada com aquela obtida com o sêmen criopreservado ativados com diferentes soluções. Portanto, após a desova, amostras de 10 g de ovócitos provenientes de uma mesma fêmea foram distribuídas em recipientes de 500 mL e fertilizadas com 0,05 mL de sêmen fresco ou 1 palheta de sêmen criopreservado (0,10 mL de sêmen). Em ambas as situações, a ativação foi realizada com cada um dos três diferentes ativadores, sendo: água; solução de NaCl 0,45% e solução NaHCO₃ 1%. Para o descongelamento, as palhetas foram imersas por 40 s em água com temperatura ambiente de 25 °C e o conteúdo adicionado sobre os ovócitos. Após a homogeneização do sêmen fresco ou criopreservado aos ovócitos, foi adicionado um volume de 100 mL das distintas soluções ativadoras que foram mantidas por 3 min, sendo posteriormente drenada e os ovos transferidos para as incubadoras cilindro-cônicas de 10L com fluxo contínuo de água. Os testes foram realizados em triplicata.

Diferentes volumes de sêmen criopreservado na fertilização - VLSE

Neste experimento, ovócitos de dourado fertilizados com sêmen fresco foram comparados com os fertilizados com diferentes volumes de sêmen criopreservado. Após a desova, amostras de 10 g de ovócitos de uma mesma fêmea foram distribuídos em recipientes de 500 mL e fertilizados com 0,05 mL de sêmen fresco ou com 0,025, 0,05 e 0,10 mL de sêmen criopreservado (equivalente a ¼; ½ e 1 palheta com volume de 0,5mL). A ativação dos gametas foi realizada com 100 mL de água. O procedimento de descongelamento do sêmen criopreservado, a fertilização e a incubação ocorreram conforme descrito anteriormente.

Efeito do tipo e tempo de contato de solução ativadora sobre a taxa de fertilização – ATV/T

Amostras de ovócitos de dourado foram fertilizadas utilizando sêmen fresco ou criopreservado. Após a desova, amostras de 10 g de ovócitos provenientes de uma única fêmea foram distribuídos em recipientes de 500 mL e fertilizados com 0,05 mL de sêmen fresco ou 0,10mL de sêmen criopreservado (1 palheta 0,5 mL). A ativação dos gametas foi realizada com água e solução NaHCO₃ 1% sendo mantida em contato com os gametas por um tempo variável (0,5; 1; 3 e 5 min). Os procedimentos de descongelamento, fertilização e incubação foram realizados conforme descrito anteriormente.

Análise dos dados

O tempo de motilidade do sêmen criopreservado foi utilizado para determinar a melhor solução ativadora, enquanto que a taxa de fertilização determinou os melhores resultados dos testes de fertilização. A avaliação da taxa de fertilização foi realizada aproximadamente sete horas após a inseminação, quando foi observada a fase de fechamento do blastóporo. Para tal, foram amostrados cerca de 260 ovos de cada incubadora. A taxa de fertilização foi calculada pela fórmula:

$$\text{Taxa de fertilização (\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de ovos fertilizados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de ovos observados}} \times 100$$

Foi utilizada ANOVA para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os tratamentos e o teste de Tukey para separação de médias (P<0,05). ANOVA Multifatorial também foi usada para analisar a interação entre solução ativadora e tempo de manutenção da solução ativadora sobre a taxa de fertilização.

Tabela 1 – Dados biométricos dos peixes, fecundidade e concentração espermática.

Experimentos ¹	Peso (g)	Peso desova (g) vol. sêmen (mL) ¹	Ovócitos por grama / fecundidade	Concentração de espermatozóid es por mL	
MTL	Macho 1	4.000	9,0	-	NA
	Macho 2	4.500	7,0	-	NA
	Macho 3	4.000	4,5	-	NA
	Macho 4	3.000	6,0	-	NA
ATV	Fêmea	3.735	559	1.172 / 655.148	-
VLSE	Macho 1	3.500	14	-	11,17 x 10 ⁹
	Macho 2	4.850	14	-	5,19 x 10 ⁹
ATV/T	Fêmea	2.300	352	1.211 / 426.272	-
	Macho 1	1.400	6	-	8,85 x 10 ⁹
	Macho 2	1.275	6	-	8,20 x 10 ⁹

MTL – avaliação do tempo de motilidade de sêmen criopreservado;

ATV – avaliação de diferentes ativadores de sêmen fresco e criopreservado na fertilização de ovócitos;

VLSE – avaliação de diferentes volumes de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos;

ATV/T – avaliação de diferentes ativadores e tempo de manutenção de contato com os gametas na ativação de sêmen fresco e criopreservado na fertilização de ovócitos;

NA: não avaliado

A fim de anular o efeito da qualidade dos ovócitos sobre os resultados obtidos, foi realizado o cálculo de ajuste das taxas de fertilização descrito por Carolfeld et al. (2003). Esse ajuste consiste em estimar a taxa de fertilização relativa de cada tratamento em relação ao tratamento controle (considerado 100%). Desta forma, todos os valores da taxa de fertilização de cada tratamento serão apresentados corrigidos em relação à taxa de fertilização do respectivo tratamento controle.

Tabela 2 - Detalhamento das relações dos volumes (mL) de sêmen fresco e criopreservado, tipos de solução ativadora e tempo (s) de manutenção das soluções ativadoras em contato com os gametas utilizados nos experimentos (em negrito estão representados os tratamentos).

Experimentos Sigla	Variáveis experimentais		
	Volume de sêmen (mL)	Solução ativadora	Tempo de manutenção da solução ativadora
Teste de motilidade	MTL	0,05	-
		Água; NaCl 0,45%; NaHCO₃ 1%	
Solução ativadora	ATV	0,05; 0,10	3 min
		Água; NaCl 0,45%; NaHCO₃ 1%	
Volume de sêmen	VLSE	0,025; 0,05; 0,10	3 min
		Água	
Sol. ativadora / tempo	ATV/T	0,05; 0,10	0,5; 1; 3; 5 min
		Água; NaHCO₃ 1%	

MTL – avaliação do tempo de motilidade de sêmen criopreservado;
 ATV – avaliação de diferentes ativadores de sêmen fresco e criopreservado na fertilização de ovócitos;
 VLSE – avaliação de diferentes volumes de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos;
 ATV/T – avaliação de diferentes ativadores e tempo de manutenção de contato com os gametas na ativação de sêmen fresco e criopreservado na fertilização de ovócitos;

Resultados e discussão

Teste de motilidade do sêmen criopreservado - MTL

A solução crioprotetora e os procedimentos de congelamento e descongelamento utilizados foram eficientes para promover a motilidade do sêmen de dourado ao ser ativado com as soluções testadas, observando-se um elevado tempo de motilidade do sêmen após um mês de congelamento. As soluções de NaCl 0,45% e NaHCO₃ 1%

produziram tempo de motilidade espermática semelhante ($108 \pm 18,26$ s), com valor cerca de três vezes maior que o observado quando ativado com água ($36 \pm 5,35$ s). Estes valores são superiores aos obtidos por Sanches et al. (2009) para sêmen fresco de dourado. De acordo com Viveiros et al. (2009), dentre várias soluções crioprotetoras testadas, a mistura de glicose com DMSO proporcionou resultados superiores para a criopreservação do sêmen de dourado.

A ativação do sêmen criopreservado de dourado com NaHCO_3 1% apresentou o tempo de motilidade espermática semelhante aquele ativado com NaCl 0,45%, superando o tempo observado pela ativação com água. Resultado semelhante foi observado para a ativação do sêmen criopreservado de *Leporinus elongatus* (Murgas et al., 2007). Apesar disso, Carolsfeld et al. (2003) não observaram diferença quando o sêmen de dourado foi ativado com água ou com NaHCO_3 1%.

Diferentes soluções ativadoras na fertilização de ovócitos - ATV

A utilização de diferentes soluções ativadoras afetou as taxas de fertilização ($P < 0,05$) (Tabela 3). A maior taxa para o sêmen fresco foi observada quando a água foi utilizada como solução ativadora, embora a água e o NaHCO_3 1% tenham proporcionado resultados semelhantes ($P > 0,05$) com o uso de sêmen criopreservado. A solução de NaCl 0,45% apresentou a menor taxa de fertilização, tanto para o sêmen fresco quanto para o criopreservado, mesmo tendo sido eficiente para induzir a maior duração da motilidade, juntamente com a solução NaHCO_3 1%, durante o teste de motilidade espermática.

Diferentes volumes de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos - VLSE

A maior taxa de fertilização com o uso do sêmen criopreservado foi observada quando utilizado um volume de 0,05 mL de sêmen (0,05 mL de sêmen + 0,20 mL de solução crioprotetora = $\frac{1}{2}$ palheta). O uso de uma quantidade maior ou menor que esta, reduziu a taxa de fertilização dos ovos de dourado (Tabela 4).

Trabalhos têm demonstrado a importância de uma adequada relação entre sêmen e ovócitos (Rinhard et al., 2005; Shimoda et al., 2007; Sanches et al., 2009) ou ainda entre os volumes de sêmen e da solução ativadora (Hoysak e Liley, 2001; Casselman et al. 2006). O melhor

Tabela 3 - Taxa de fertilização (média \pm DP) de ovos de *Salminus brasiliensis* fertilizados com sêmen fresco ou criopreservado misturados com diferentes soluções ativadoras.

Sêmen	Sol. ativadora	Repetições	Fertilização (%) ¹	Teste Tukey ²
Fresco	água	3	100,00 \pm 7,71 (64,05)	a
	NaHCO ₃ 1%	3	46,55 \pm 2,69	b
	NaCl 0,45%	3	5,25 \pm 2,75	de
Criopreservado	água	3	23,73 \pm 8,18	c
	NaHCO ₃ 1%	3	16,67 \pm 2,65	cd
	NaCl 0,45%	3	1,89 \pm 0,15	e

- 1- Entre parênteses: o valor médio real da taxa de fertilização observada para o tratamento controle, que foi ajustado para 100%, sendo os demais valores também ajustados em relação ao controle. Este ajuste foi realizado para desconsiderar o efeito da qualidade dos ovócitos sobre os resultados.
- 2- Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

resultado para dourado foi obtido numa relação de 35.000 espermatozoides para cada ovócito. Sanches et al. (2009) testaram distintas relações entre espermatozoides frescos e ovócitos de dourado recomendando a relação de 30.700 espermatozoides:1 ovócito. Apesar dessa proporção recomendada apresentar valores semelhantes as maiores taxas de fertilização obtidos neste trabalho, ela não se refere a sêmen criopreservado. De acordo com Tiersch e Mazik (2003), em geral 40 – 90% dos espermatozoides de peixes de água doce são danificados após o processo de criopreservação. A perda da qualidade do sêmen criopreservado torna ainda mais importante à definição da relação ideal entre os gametas (Kopeika et al., 2007). Devido a esta perda de qualidade do sêmen criopreservado, era esperado que maior volume de sêmen criopreservado proporcionasse melhor taxa de fertilização, no entanto isto não foi observado neste trabalho.

O aumento do volume de sêmen criopreservado na fertilização implica no aumento do volume proporcional da solução crioprotetora. As soluções crioprotetoras têm como característica apresentar toxicidade as células gaméticas (Viveiros et al., 2009). Magyary et al. (1996) observaram decréscimo significativo nas taxas de fertilização de ovos de

carpa comum quando aumentaram o volume de sêmen criopreservado, tendo atribuído este fato a toxicidade do DMSO. De modo semelhante, Ribeiro e Godinho (2003) verificaram uma redução de mais de 30% na porcentagem de motilidade do sêmen de *Leporinus macrocephalus* quando aumentaram de 10% para 15% a concentração de DMSO na solução crioprotetora.

Uma alternativa para aumentar o número de espermatozóides sem prejuízo da toxicidade pelo maior volume da solução crioprotetora é reduzir a relação entre o volume de sêmen e o de solução crioprotetora, que neste trabalho foi mantida em 1:4, respectivamente. De acordo com Carolsfeld et al. (2003), essa relação para o sêmen de peixes Sul-americanos pode variar entre 1:3 e 1:5. Experimentos testando a redução no volume da solução crioprotetora para o sêmen de dourado, bem como o aumento do volume da solução para a ativação dos gametas, podem ser importantes para avaliar a redução do efeito tóxico da solução crioprotetora possibilitando o aumento na taxa de fertilização.

Efeito do tipo e tempo de contato de solução ativadora sobre a taxa de fertilização – ATV/T

A utilização de água como solução ativadora do sêmen fresco propiciou a maior taxa de fertilização dos ovos de dourado (Tabela 5). Quando analisada a fatorial ativador x tempo de contato do sêmen criopreservado, os ativadores, água e NaHCO_3 1% proporcionaram taxas de fertilização semelhantes quando mantidos em contato com os gametas por até 60 segundos. Quando analisado separadamente, não ocorreram diferenças ($P>0,05$) entre os ativadores. Contudo, foi verificada diferenças significativas para o tempo de contato do sêmen criopreservado, havendo prejuízo nas taxas de fertilização nos tempos de 180 e 300 segundos de contato.

Tabela 4 - Taxa de fertilização (média \pm DP) de ovos de *Salminus brasiliensis* fertilizados com diferentes volumes de sêmen criopreservado.

Sêmen	Volume sêmen (mL)	Repetições	Fertilização (%)	Teste Tukey ²
Fresco ¹	0,05 (controle)	9	100,00 \pm 11,04 (67,22)	a
	0,10	3	0,33 \pm 0,57	c
Criopreservado	0,05	3	22,61 \pm 7,79	b
	0,025	3	0,00 \pm 0,00	c

1- Entre parênteses o valor médio real da taxa de fertilização observado para o tratamento controle, que foi ajustado para 100%, sendo os demais valores também ajustados em relação ao controle.

2- Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Apesar de a água e do NaHCO_3 1% proporcionarem resultados semelhantes de fertilização, a água induziu a motilidade espermática por apenas 1/3 do tempo observado para a ativação feita com NaHCO_3 1%. De acordo com Viveiros et al. (2009), pode haver uma relação entre as diferentes soluções ativadoras e os tipos de crioprotetores utilizados para sêmen de peixes, onde determinada solução poderia amenizar os efeitos tóxicos do crioprotetor, além de servir de ativador do sêmen.

O aumento do tempo de manutenção da solução ativadora em contato com os gametas exerceu efeito negativo sobre a taxa de fertilização dos ovos de dourado, embora os melhores resultados tenham sido obtidos quando a solução ativadora foi mantida por até 60 segundos. Este fato está de acordo com os resultados de motilidade obtidos no experimento testando diferentes soluções ativadoras na motilidade do sêmen de dourado, de modo que o retardo na lavagem dos ovos, além do tempo de motilidade espermática não estimula a fertilização, pelo contrário, apenas aumenta o tempo de exposição dos ovos aos efeitos tóxicos dos crioprotetores.

Tabela 5 - Taxas de fertilização (média±DP) de ovos de *Salminus brasiliensis* fertilizados com sêmen fresco e criopreservado utilizando diferentes soluções ativadoras e períodos de tempo de manutenção da solução ativadora em contato com os gametas.

Sêmen	Variáveis	Tratamentos	Fertilização (%) ¹	Teste Tukey ²				
				1	2	3	4	5
Fresco	Solução ativadora	água (controle)	100,00±9,20 (87,30)	a				a
		NaHCO ₃ 1%	74,63±5,86	b				
Criopreservado	Solução ativadora x tempo (s) (análise bifatorial)	30' água	27,17±5,34		ab			b
		60' água	34,41±0,87		a			
		180' água	16,79±3,97		ab			
		300' água	17,08±6,13		ab			
		30' NaHCO ₃ 1%	24,50±5,60		ab			
		60' NaHCO ₃ 1%	22,15±7,17		ab			
		180' NaHCO ₃ 1%	16,58±2,65		b			
		300' NaHCO ₃ 1%	16,71±8,40		b			
	Solução ativadora	Água	24,91±8,67			a		
		NaHCO ₃ 1%	20,29±6,17			a		
	Tempo (s)	30'	25,57±5,00				ab	
		60'	28,28±8,12				a	
180'		16,69±3,02				b		
300'		16,99±6,00				b		

- 1- Entre parênteses o valor médio real da taxa de fertilização observado para o tratamento controle, que foi ajustado para 100%, sendo os demais valores também ajustados em relação ao controle. Este correção é realizada para desconsiderar o efeito da qualidade dos ovócitos sobre os resultados.
- 2- Teste de Tukey – comparações de médias entre: 1 – diferentes ativadores para sêmen fresco; 2 – diferentes ativadores e períodos de tempo de manutenção do ativador para sêmen criopreservado (análise fatorial); 3 – diferentes ativadores para sêmen criopreservado; 4 – diferentes períodos de tempo de manutenção do ativador para sêmen criopreservado; 5- comparação da fertilização entre sêmen fresco e criopreservado. Letras diferentes na mesma coluna demonstram diferença estatística (P<0,05).

Conclusões

O protocolo de congelamento e descongelamento do sêmen de dourado utilizado se mostrou adequado, preservando a motilidade espermática e a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado.

A água e a solução de NaHCO_3 1% podem ser utilizadas como soluções ativadoras da motilidade do sêmen de dourado após o descongelamento, possibilitando resultados similares de taxa de fertilização.

A relação ideal entre as quantias de sêmen criopreservado e ovócitos é aquela contida em $\frac{1}{2}$ palheta de 0,5mL para cada 10g de ovócito quando utilizado uma diluição de 1:4 sêmen e solução crioprotetora.

No uso do sêmen criopreservado, o tempo de manutenção da solução ativadora em contato com os gametas de dourado deve ser de no máximo 60 s, além dos quais poderá ser observada redução nas taxas de fertilização.

Referências bibliográficas

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal Fish Biology**, v.63, p.472-481, 2003.

CASSELMAN, S. J.; SCHULTE-HOSTEDDE, A. I.; MONTGOMERIE, R. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). **Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences**. V. 63 n. 9, p. 2119–2125, 2006.

HOYSAK, D. J. and LILEY, N. R. 2001. Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotypes. *J. Fish Biol.* 58:1286–1300.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. **Theriogenology**, v.60, p.829-841, 2003.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKALWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.;

LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J. (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 106–169.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J.; ZHANG, T. Cryopreservation of Fish Sperm. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Editors). **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Series: Methods in Molecular Biology. 2007. V. 368, p. 203-217.

MAGYARY, I. URBANYI, B.; HORVATH, L. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm: II. Optimal conditions for fertilization. **Journal of Applied Ichthyology**, v.12, p. 117–119, 1996.

MORAIS FILHO, M.B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**. São Paulo: Ministério da Agricultura – Divisão de Caça e Pesca, 1955.

MURGAS, L. D. S; MILIORINI, A. B; FREITAS, R. T. F; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

RIBEIRO, R.I.M.A.; GODINHO, H.P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.1, p. 1-7, 2003.

RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; VAN TASSELL, J. J.; STEIN, R. A. Optimization of fertilization success in *Sander vitreus* is influenced by the sperm : egg ratio and ova storage. **Journal of Fish Biology**, v. 67, p.1157–1161, 2005.

SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M. AND SOUZA, B. E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.38, n.11, p. 2091-2098, 2009.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.877-882, 2007.

TIERSCH T. R. Introduction. In: Tiersch T and Mazik P (editors), **Cryopreservation in Aquatic Species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.14-26.

TIERSCH, T. R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.37, pp. 15-19, 2008.

VAZZOLLER, A.E.A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática**. Maringá, PR, Ed. Universidade de Maringá, 1996.169p.

VIVEIROS, A. T. M.; OLIVEIRA, A. V.; MARIA, A.N.; ORFÃO, L. H.; SOUZA J. C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n. 4, 2009.

YAO, Z.; CRIM, L. W.; RICHARDSON, G. F.; EMERSON, C. J. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, v.181, p.361-375, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

A taxa de fertilização do dourado foi afetada pela relação entre a quantidade de ovócitos, sêmen e o volume da solução ativadora, embora o fator que mais influencio os resultados tenha sido a concentração de espermatozóide da solução fertilizante, sendo recomendada a concentração espermática de $7,10 \times 10^6$ espermatozóides.mL⁻¹ para obtenção da máxima taxa de fertilização. Adicionalmente, é recomendada a manutenção de uma razão 1:10 (ovócitos : água de ativação) e adição de aproximadamente 5 mL de sêmen para cada quilo de ovócitos. A concentração dos valores de oxigênio dissolvido da água de ativação não interferiu na taxa de fertilização do dourado.

Os ovócitos de dourado são sensíveis a estocagem após a extrusão, embora haja variação no intervalo de tempo de viabilidade entre os ovócitos provenientes de fêmeas distintas, sendo recomendada a fertilização em um intervalo de tempo inferior a 30 minutos. O tempo de manutenção da água de ativação com a utilização de sêmen fresco, que permite a obtenção da máxima taxa de fertilização é de 3 minutos, quando a água deve ser drenada e os ovócitos lavados para disposição nas incubadoras.

O protocolo de congelamento e descongelamento do sêmen de dourado utilizado se mostrou adequado, preservando a motilidade espermática e a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado.

A água e a solução de NaHCO₃ 1% podem ser utilizadas como ativadores da motilidade do sêmen de dourado após o descongelamento, possibilitando resultados similares de taxa de fertilização.

A relação ideal de sêmen criopreservado e ovócito, resguardando a concentração espermática do sêmen, é aquela contida em ½ palheta de 0,5mL para cada 10g de ovócito.

No uso do sêmen criopreservado, o tempo de manutenção da solução ativadora em contato com os gametas de dourado deve ser no máximo de 60 segundos, além do qual poderão ser observadas reduções nas taxas de fertilização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho faz referência a uma das etapas relacionadas ao cultivo de peixes. Como já descrito anteriormente, a obtenção de gametas viáveis de dourado já vem sendo possível há alguns anos, no entanto, as taxas de fertilização não eram consideradas satisfatórias.

Dentre os vários gargalos existentes para o cultivo do dourado, este trabalho contribuiu como mais uma peça na construção de um pacote que direcione o cultivo desta espécie para patamares onde o produtor será remunerado adequadamente, e o consumidor terá acesso a um produto com preço e qualidade compatível com o mercado.

Pensando na cadeia produtiva, um aumento representativo nos índices iniciais de produtividade, como a obtenção de melhores taxas de fertilização e conseqüentemente aumento na produção de larvas poderá possibilitar ganhos ainda maiores do que aquelas representadas por estes índices, visto que um aumento na fase de produção de larvas poderá ter reflexos econômicos muito significativos, primeiro pela possibilidade de aumento na produção final de juvenis e segundo pela possibilidade da diminuição do número de reprodutores necessários para alcançar a produção desejada.

Dentre os objetivos propostos por este trabalho, pode-se dizer que o principal deles foi alcançado, que foi gerar um protocolo que padroniza a metodologia de fertilização de ovócitos de dourado na reprodução induzida, de modo a se obter valores superiores e constantes em relação às taxas de fertilização.

Em relação à técnica da criopreservação, pode-se relatar que houve avanços significativos, pois muito pouco existia em relação ao uso de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos de dourado, no entanto, os valores finais obtidos ainda são baixo quando comparados com o uso do sêmen fresco, desta forma, mais esforços devem ser direcionados na busca de melhores resultados com o uso desta ferramenta.

Em relação ao dourado *Salminus brasiliensis*, ainda há muito a ser feito para que esta espécie figure dentre aquelas com altos índices de produção através da piscicultura. Um gargalo que ainda pesa sobre a espécie é o canibalismo existente na fase inicial de alimentação. Muito já se avançou nesta questão quando comparado aos primeiros trabalhos, onde via de regra os juvenis produzidos ao final de grandes desovas não passavam de poucas dezenas.

Poderíamos dizer que a produção massiva das formas jovens seria o primeiro grande passo para o cultivo em larga escala, e de fato deve

ser. No entanto, no caso do dourado, muitos avanços tecnológicos ainda são necessários. A nutrição, manejo, densidade de estocagem, despesca, processamento são questões pendentes que deverão ser estudadas, revelando a necessidade da continuidade de pesquisas.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. **Aquaculture Research**, v.36, n. 9, p. 841-850, 2005.
- ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 27, n.2 p.166 – 172, 2003
- BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.12, n.2, p.85-91, 2000.
- BILLARD, R.; BRY, C.; GILLET, C. Stress, environment and reproduction in teleost fish. In: **Stress in fishes** (Edited by Pickering A.D.). Academic Press, London, p.185-207, 1981.
- BOMBARDELLI, R.A.; SYPERREK, M.A.; SANCHES, E.A. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. **Arquivos de ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.9, n.1, p.59-65, 2006.
- CARNEIRO, P.C.F. A produção do jundiá em cativeiro. In: **Criação de jundiá**. Bernardo Baldisserotto e Joao Radünz Neto. Santa Maria : Ed. UFSM, 2004.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI-FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology** v.63, n. 2, p.472-489, 2003.
- CASTAGNOLLI, N. Piscicultura intensiva e sustentável de espécies nativas brasileiras. **Anais do Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes**, Piracicaba, Anais, p.117-130, 1997.
- CASTAGNOLLI, N. Estado da arte da aquíicultura brasileira. In: CYRINO, J. et. al. **Tópicos Especiais de Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: Tecart, Cap. 1. p. 01-06, 2004.
- CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I.G.; RASINES, I.; FERNANDES, A. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, v.30, n.5, p.319-324, 1999.

CIERESZKO, A., GLOGOWSKI, J., DABROWSKI, K. Fertilization in landlocked sea lamprey: storage of gametes, optimal sperm : egg ratio, and methods of assessing fertilization success. **Journal of Fish Biology**, 56, n. 3, p.495-505, 2000.

CUVIER, G.L. Le Règne Animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. Vol. 2, **Les reptiles, les poissons, les mollusques et les annélides**. Edition 1. Paris. Deterville. 532 p. 1816.

COSER, A.M.L.; GODINHO, H.P.; TORQUATO, V.C. Criopreservação do sêmen do peixe piau *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n 1, p. 37-42, 1987.

COWARD, K.; PARRINGTON, J. New insights into the mechanism of egg activation in fish. **Aquatic Living Resource**. v. 16, n. 4, p. 395-398, 2003.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; WEINGARTNER, M.; SANTAMARIA, F.M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**, p. 332-337, 2000.

IBAMA. (coord. Geral) Estatística da pesca 2000, Brasil, grandes regiões e unidades da federação. **Boletim estatístico da pesca, 2000**. Brasília-DF, 16p. 2000.

IBAMA. (coord. Geral) Estatística da pesca 2007, Brasil, grandes regiões e unidades da federação. **Boletim estatístico da pesca, 2004**. Brasília-DF, 113p. 2007.

KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 16, n.1, p. 29-36, 1989.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKALWA, O. T.;

PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J. (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**, Porto Alegre, Edipucrs, 2003. p. 106–169.

LIMA, F.C.T.; BRISKI, H.A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v.5, n.3 p.237-244, 2007.

MACHADO, C. Aspectos reprodutivos do dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) (PISCES, CHARACIDAE) na Região do Alto Rio Uruguai, Brasil. Florianópolis, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

MORAIS FILHO, M.B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**. São Paulo, Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, 144p. 1955.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M. ; SOUZA, B.E.. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.38, n.11, p. 2091-2098, 2009.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco. In: **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. (J. Carolsfeld; B. Harvey; C. Ross; A. Baer). Victoria, IDRC/World Bank, p.195-232, 2003.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; GODINHO, H.P.; YASUI, G.S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.59, n.4, p.877-882, 2007.

SILVA, N. J. R. Dinâmicas de desenvolvimento da piscicultura e políticas públicas no Vale do Ribeira / SP e Alto Vale do Itajaí / SC – Brasil. **Tese de doutorado** (Doutorado em Halieutique e Aqüicultura) - *co-tutelle* Universidade Estadual Paulista. São Paulo - SP. 599p., 2005.

TIERSCH, T. R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.37, p. 15-19, 2008.

VAZZOLLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática**. Maringá, Ed. da Universidade de Maringá, 169p. 1996.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry** v.35,n. 1, p.137-150, 2009.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Dourado. In: **Espécies nativas para a piscicultura do Brasil**. (Bernardo Baldisserotto; Levy de Carvalho Gomes).Santa Maria: Editora UFSM, v. Único, p. 257-286, 2005.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: Manual de Extensão**. Tradução CHAMA, V.L.M. Brasília, FAO/CODEVASF/CNPq, 225p. 1983.

YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G.F.; EMERSON, C.J. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, v.181, n. 3-4, p.361-375, 2000.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia** v.56, n.4, p.655-659, 1996.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. (Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N.) São Paulo, AQUABIO, p.45-73, 2004.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: **Migratory Fishes of the South America: Biology, Social Importance and Conservation Status**. (Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A.) Victoria, World Fisheries Trust/IDRC/World Bank, p.135-168, 2003.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.203, p.69-77, 2000.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M.; BEUX, L.F.; NUÑER, A.P.O. Espécies nativas com potencial para regiões de clima frio. **Pan. Aquicult.**, v. 19, no. 114, p. 24-29, 2009.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C.C. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1-4, p. 99-136, 2001.