



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA



**EFEITO DA ESTOCAGEM A CURTO PRAZO E DA TEMPERATURA SOBRE
GAMETAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)**

Eduardo Antônio Sanches
Engenheiro de Pesca

Jaboticabal - São Paulo
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA

**EFEITO DA ESTOCAGEM A CURTO PRAZO E DA TEMPERATURA SOBRE
GAMETAS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)**

Eduardo Antônio Sanches
Engenheiro de Pesca

Orientadora: Prof^a. Dra. Elizabeth Romagosa
Co-Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni

Prof. Dr. Rodolfo Nardez Sirol

Prof^a. Dra. Elizabeth Romagosa
(Orientadora)

Jaboticabal - São Paulo
2009

S211e Sanches, Eduardo Antônio
Efeito da estocagem a curto prazo e da temperatura sobre gametas de
jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)/ Eduardo Antônio Sanches.
-- Jaboticabal, 2009
x, 88 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2009

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Banca examinadora: Sérgio Ricardo Batlouni, Rodolfo Nardez Sirol

Bibliografia

1. Reprodução de peixes. 2. Ovócitos. 3. Sêmen. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

e-mail:eduanches@hotmail.com

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

¹Tu que habitas sob a proteção do Altíssimo, que moras à sombra do Onipotente,
²dize ao Senhor: Sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em que eu confio.

³É ele quem te livrará do laço do caçador, e da peste perniciosa.

⁴Ele te cobrirá com suas plumas, sob suas asas encontrarás refúgio. Sua fidelidade te será
um escudo de proteção.

⁵Tu não temerás os terrores noturnos, nem a flecha que voa à luz do dia,

⁶nem a peste que se propaga nas trevas, nem o mal que grassa ao meio-dia.

⁷Caíam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita, tu não serás atingido.

⁸Porém verás com teus próprios olhos, contemplarás o castigo dos pecadores,

⁹porque o Senhor é teu refúgio. Escolheste, por asilo, o Altíssimo.

¹⁰Nenhum mal te atingirá, nenhum flagelo chegará à tua tenda,

¹¹porque aos seus anjos ele mandou que te guardem em todos os teus caminhos.

¹²Eles te sustentarão em suas mãos, para que não tropeces em alguma pedra.

¹³Sobre serpente e víbora andarás, calcarás aos pés o leão e o dragão.

¹⁴Pois quem se uniu a mim, eu o livrarei; e o protegerei, pois conhece o meu nome.

¹⁵Quando me invocar, eu o atenderei; na tribulação estarei com ele. Hei de livrá-lo e o
cobrirei de glória.

¹⁶Será favorecido de longos dias, e mostrar-lhe-ei a minha salvação.

Salmo 90 (Salmo de Confiança)

Ao meu pai Altair e a minha mãe Regina pelo início de tudo.

Às minhas avós Deonila e Arnalda pelos ensinamentos e apoios em minhas decisões.

Aos meus irmãos Anderson e Guilherme e a minha irmã Fernanda, pelo incentivo e apoio.

À minha noiva Franciele, pelo amor e incentivo.

Às minhas sobrinhas Sthefani e Larissa, pelo carisma repassado em suas risadas e atos.

A todos os meus familiares amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela presença em todos os momentos.

A minha família, em especial aos meus pais que me incentivaram e me ajudaram em todos os momentos.

À minha noiva Franciele, pelo amor, compreensão, paciência, apoio, dedicação, companheirismo, incentivo, pelos grandiosos ensinamentos e pelos inúmeros momentos de felicidade que compartilhamos.

À Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), em especial ao Centro de Aquicultura (CAUNESP) pela infra-estrutura, suporte técnico e apoio durante o período do Mestrado.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ao Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (CPAA)/Instituto Ambiental do Paraná (IAP), pela infra-estrutura oferecida para a execução do experimento.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da Bolsa de Estudos.

À Prof^a. Dra. Elizabeth Romagosa, pela amizade, paciência, ensinamentos e conselhos durante sua dedicada orientação.

Ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, pela sua dedicada co-orientação.

Ao Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana, pelos ensinamentos e auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos que foram determinantes na execução dos experimentos: Robie A. Bombardelli,
Diego M. Baggio, Giovano Neunamm, Ronan M. Marcos, César P. R. de Toledo.

Aos demais amigos(as) que contribuíram de alguma forma na execução dos experimentos
Alan Xavier, Claudia Arteman, Lucélia Tessaro.

Aos meus colegas e amigos do CAUNESP e da UNIOESTE pelas alegrias e conhecimentos
compartilhados.

A todos os professores que contribuíram muito para minha formação. Em especial aos
professores Dr. Sérgio Ricardo Batlouni e Dr. Pitágoras Augusto Piana que participaram da
banca examinadora de qualificação e aos professores Dr. Sérgio Ricardo Batlouni e Dr.
Rodolfo Nardez Sirol que participaram da banca de defesa.

Aos demais colegas e funcionários da UNESP, CAUNESP e UNIOESTE, que contribuíram
de forma direta ou indireta na minha formação.

BIOGRAFIA DO AUTOR

EDUARDO ANTÔNIO SANCHES, filho de Altair José Sanches e Raimunda Regina Sanches, nasceu em Toledo, Paraná, no dia 05 de (M)maio de 1985.

Em março de 1991, iniciou o ensino básico na Escola Municipal Antônio Scain, em Toledo, PR.

Em março de 1996, iniciou o ensino fundamental no Colégio Estadual Dr. João Cândido Ferreira, em Toledo, PR.

Em março de 2000, iniciou o ensino médio no Colégio Estadual Presidente Castelo Branco “PREMEN”, em Toledo, PR.

Em 05 de maio de 2003, ingressou no Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – *Campus* de Toledo, PR.

No dia 05 de novembro de 2007, submeteu-se a banca para defesa da Monografia, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca, Toledo, PR.

Em 05 de março de 2008 iniciou o Mestrado em Aquicultura pela Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.

Em 26 de junho de 2009 submeteu-se a banca para a qualificação da Dissertação de Mestrado, São Paulo, SP.

No dia 21 de agosto de 2009, submeteu-se a banca para a defesa da Dissertação de Mestrado em Aquicultura, Jaboticabal, SP.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
I. RESUMO.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUÇÃO GERAL	5
IV. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
1. Características da espécie.....	9
1.1. Classificação taxonômica e distribuição geográfica.....	9
1.2. Produção	9
1.3. Biologia reprodutiva	11
1.4. Reprodução artificial	13
2. Qualidade dos gametas	15
3. Conservação dos gametas	19
3.1. Ovócitos	20
3.2. Sêmen.....	22
4. Referências bibliográficas.....	25
V. OBJETIVO	35
1. Objetivo geral	35
2. Objetivos específicos	35
VI. TEMPO E TEMPERATURA NA ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE JUNDIÁ, <i>Rhamdia quelen</i>	36
Resumo	36
Abstract.....	37
Material e Métodos.....	39
Resultados e Discussão.....	45
Conclusões.....	52
Agradecimentos	53
Referências	53
VII. MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE <i>Rhamdia quelen</i> ESTUDADA POR MEIO DE ANÁLISE COMPUTACIONAL ASSISTIDA	59
Resumo	59
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	60
Resultados e Discussão.....	61
Conclusão	62
Referências	62
VIII. PERÍODO DE ESTOCAGEM E TEMPERATURA SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE JUNDIÁ, <i>Rhamdia quelen</i> AVALIADOS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA	64
Resumo	64
Abstract.....	65
Introdução.....	66
Material e Métodos.....	68
Resultados e Discussão.....	72
Conclusões.....	79
Agradecimentos	79
Referências	79

APÊNDICE A	86
Figura 1 - Reprodutor de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	86
Figura 2 - Seleção dos reprodutores e indução hormonal	86
Figura 3 - Coleta do sêmen e dos ovócitos através de extrusão	86
APÊNDICE B	87
Figura 1 - Ovócitos e sêmen coletados	87
Figura 2 - Ovócitos estocados em placas de petry e sêmen em ependorfs	87
Figura 3 - Extruturas utilizadas para a estocagem dos ovócitos e do sêmen (câmara germinadora e estufa de madeira com termostato)	87
APÊNDICE C	88
Figura 1 – Recipientes experimentais utilizados para a fertilização artificial	88
Figura 2 - Sistema de incubação com recirculação de água e incubadora experimental de 2,5L	88
Figura 3 - Larvas normais e anormais observadas no experimento	88

LISTA DE TABELAS

Artigo 01 - TEMPO E TEMPERATURA NA ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*

Tabela 1. Ilustração da disposição das unidades experimentais de uma réplica, em função da combinação dos fatores experimentais (temperatura de exposição dos ovócitos *versus* temperatura da água *versus* tempo pós-coleta para fertilização artificial dos ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen*). 43

Artigo 02 - MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE *Rhamdia quelen* ESTUDADA POR MEIO DE ANÁLISE COMPUTACIONAL ASSISTIDA

Tabela 1. Parâmetros espermáticos do jundiá, *Rhamdia quelen*, obtidos em um segundo de imagem aos 15, 25 e 35s após ativação espermática. 62

Artigo 03 - PERÍODO DE ESTOCAGEM E TEMPERATURA SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*, AVALIADOS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA

Tabela 1. Disposição das unidades experimentais de uma réplica, em função da combinação dos fatores experimentais (temperatura de exposição do sêmen *versus* temperatura da água *versus* tempo pós-coleta para a ativação espermática de jundiá, *Rhamdia quelen*). 70

Tabela 2 Correlação entre os parâmetros espermáticos de jundiá, *Rhamdia quelen* avaliados e os grupos formados pela análise de componentes principais 73

Tabela 3 Média dos parâmetros espermáticos observados em jundiá, *Rhamdia quelen* imediatamente após a coleta (inicial) e 48 horas pós-coleta nas temperaturas de 15 e 25°C. 73

LISTA DE FIGURAS

Artigo 01 - EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA NA ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*

- Figura 1** Taxas de fertilização de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* observadas a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. 47
- Figura 2** Taxas de eclosão de ovos de jundiá, *Rhamdia quelen* observadas a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem..... 47
- Figura 3.** Percentual de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen* observadas a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem..... 48
- Figura 4.** Taxas de fertilização dos ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. A – Representação gráfica por superfície de resposta em gráfico 3D. B – Representação gráfica por curvas de nível em gráfico 2D..... 48
- Figura 5.** Taxas de eclosão dos ovos de jundiá, *Rhamdia quelen* a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. A – Representação gráfica por superfície de resposta em gráfico 3D. B – Representação gráfica por curvas de nível em gráfico 2D..... 49
- Figura 6.** Percentual de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen* a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. A – Representação gráfica da interação por superfície de resposta em gráfico 3D. B – Representação gráfica em curvas de nível em gráfico 2D. 49
- Figura 7.** Efeito da temperatura da água empregada na fertilização artificial de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* sobre as: A - taxas de fertilização; B - taxas de eclosão..... 50

Artigo 02 - MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE *Rhamdia quelen* ESTUDADA POR MEIO DE ANÁLISE COMPUTACIONAL ASSISTIDA

- Figura 1** - Imagem do caminho percorrido pelos espermatozoides gerados pelo aplicativo CASA (A) e gerados pelo *software* IMAGEJ (B). Janela da caixa de diálogo gerado pelo aplicativo CASA dentro do *software* IMAGEJ com as configurações usadas em análises de motilidade espermática de jundiá (*Rhamdia quelen*) (C). 63

Artigo 03 - PERÍODO DE ESTOCAGEM E TEMPERATURA SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*, AVALIADOS POR ANÁLISE COMPUTADORIZADA

- Figura 1** Representação gráfica em 3D (A) e em 2D (B) do efeito interativo entre o tempo e temperatura de exposição sobre o grupo 2 (velocidade média do deslocamento, velocidade em linha reta, frequência de batidas e taxa de motilidade espermática) do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) 75
- Figura 2** Representação gráfica em 3D (A) e em 2D (B) do efeito interativo entre o tempo de exposição e temperatura da água sobre o grupo 2 (velocidade média do

deslocamento, velocidade em linha reta, frequência de batidas e taxa de motilidade espermática) do sêmen de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	75
--	----

I. RESUMO

O trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura de estocagem a curto prazo e da temperatura da água sobre os ovócitos e sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. O experimento foi realizado em três etapas: (1) avaliar a qualidade dos ovócitos após estocagem e ativação em diferentes temperaturas; (2) padronizar a utilização de análise espermática computadorizada por meio de *softwares* livres; (3) avaliar os parâmetros espermáticos computadorizados após estocagem e ativação em diferentes temperaturas. Para a primeira, utilizou-se um delineamento experimental fatorial no tempo ($5 \times 3 \times 3 \times 3$), com os tratamentos realizados em triplicata a cada 48h, na exposição de ovócitos nas temperaturas de 15; 25 e 35°C e, ativados com água à 15; 25 e 35°C cada, nos períodos de: 0; 45; 90; 135 e 180 minutos pós-coleta. A segunda etapa foi realizada através da captura de vídeos da movimentação espermática pelo *software* AMCAP, a uma taxa de 60 frames por segundo, processados no *software* VIRTUALDUB e analisados no *software* IMAGEJ por meio do aplicativo CASA. Os seguintes parâmetros foram analisados: taxa de motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VMD), velocidade em linha reta (VLR), linearidade (LIN), balanço (BAL) e frequência de batimentos (FBAT). Os parâmetros espermáticos foram avaliados em um segundo de imagem nos tempos de 15, 25 e 35 segundos após a ativação espermática. Para a terceira etapa foi utilizado um delineamento experimental fatorial no tempo semelhante à primeira, com 13 tempos de avaliação pós-coleta: 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 32; 40 e 48 horas. Os tratamentos foram realizados em triplicata e em protocolos sequenciais a cada 50 horas avaliando-se os parâmetros obtidos na segunda etapa. Estes foram submetidos às análises de correlação (Pearson). Os parâmetros significativos ($P < 0,05$) foram sumarizados pela análise de componentes principais. Para a primeira etapa observou-se interação ($P < 0,05$) entre o tempo e a

temperatura de exposição com maiores valores das taxas de fertilização, eclosão e percentual de larvas normais verificados no momento imediato à coleta dos ovócitos ($70,2 \pm 8,4\%$ de ovócitos fertilizados, $66,7 \pm 29,4\%$ de ovos eclodidos e $30,3 \pm 25,0\%$ de larvas normais). A temperatura da água obtida pelo modelo estatístico que proporcionou maiores ($P < 0,05$) taxas de fertilização foi $25,6^\circ\text{C}$. As taxas de fertilização eclosão e percentual de larvas normais apresentaram ($P < 0,05$) correlação positiva mostrando que estes parâmetros podem ser utilizados na mensuração da qualidade dos ovócitos. Para a segunda etapa não foi observado efeito ($P > 0,05$) dos tempos para a LIN, entretanto, o tempo após a ativação influenciou ($P < 0,05$) os outros parâmetros avaliados ocorrendo diminuição da qualidade espermática. Para a terceira etapa foi observada a formação de dois grupos de correlação, o grupo 1 por VCL, BAL e LIN e o grupo 2 por VMD, VLR, FBAT e MOT. Observou-se efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos somente para o grupo 2, com interação entre tempo e temperatura de exposição e entre tempo de exposição e temperatura da água. Resultados superiores dos parâmetros espermáticos do grupo 2 foram observados imediatamente após a coleta. A exposição e a ativação espermática à 15°C permitiu maiores resultados dos parâmetros de motilidade espermática do grupo 2 ao longo das 48 horas pós-coleta quando comparados à 25 e 35°C . Recomenda-se primeiro a coleta do sêmen antes da dos ovócitos e, imediatamente após a coleta deve ser realizada a fertilização artificial dos ovócitos.

II. ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effect of temperature of storage in the short-term and the temperature of the water on the oocytes and sperm of jundiá, *Rhamdia quelen*. The experiment was conducted in three stages: (1) assess the quality of oocytes after storage and activation at different temperatures; (2) standardize the use of computerized sperm analysis by software free, (3) evaluate the computerized sperm parameters after storage and activation at different temperatures. For the first, was used a factorial experimental design in time ($5 \times 3 \times 3 \times 3$), with treatments performed in triplicate every 48 hours, the exposure of oocytes at temperatures of 15, 25 and 35 C, and activated with water to 15, 25 and 35 C each, in the periods of: 0; 45; 90; 135 and 180 minutes post-collection. The second stage was performed by video capture of the movement of sperm through AMCAP software at a rate of 60 frames per second, processed and analyzed in VirtualDub software and ImageJ software using the CASA application. The following parameters were analyzed: rate of sperm motility (MOT), velocity curvilinear (VCL), velocity average path (VAP), velocity straight line (VSL), linearity (LIN), wobble (WOB), beating cross frequency (BCF). The sperm parameters were evaluated in a second image in the times of 15, 25 and 35 seconds after sperm activation. For the third step we used a factorial experimental design similar to the first in time, with 13 times of evaluation post-collection: 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 32; 40 and 48 hours. The treatments were performed in triplicate and sequencing protocols to be evaluated every 50 hours if the parameters obtained in the second stage. These were submitted to analysis of correlation (Pearson). The significant parameters ($P < 0.05$) were summarized by the principals components analysis. For the first stage interaction ($P < 0.05$) between time and temperature of exposure was observed with the highest rates of fertilization, hatching and normal larvae occurred at the immediate collection of the oocytes ($70.2 \pm 8.4\%$ of fertilized oocytes, $66.7 \pm 29.4\%$ of hatched eggs and $30.3 \pm 25.0\%$ of normal larvae). The water temperature obtained

by the statistical model that provided greater ($P < 0.05$) fertilization rate was 25.6°C . The rates of fertilization and hatching of larvae normal showed ($P < 0.05$) positive correlation indicating that these parameters can be used in measuring the quality of oocytes. For the second stage effect was not observed ($P > 0.05$) of time for LIN, but the time after the activation influenced ($P < 0.05$) the other parameters evaluated, with reduction of sperm quality. For the third stage was observed formation of two groups of correlation, the group 1 for VCL, LIN and WOB, and group 2 for VAP, VSL, BCF and MOT. Effect was observed ($P < 0.05$) of treatments only for group 2, with interaction between time and temperature of exposure and time between exposure and water temperature. Higher results of sperm parameters were observed in group 2 immediately after collection. The exposure and sperm activation at 15°C allowed the best results of sperm motility parameters of group 2 over the 48 hours after collection compared to 25 and 35°C . It is recommended first to collect semen before than oocytes and artificial fertilization of the oocytes immediately after collection.

III. INTRODUÇÃO GERAL

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) pertence à família Heptapteridae a ordem dos Siluriformes (Bockmann & Guazzelli, 2003). É amplamente distribuída nas bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (Froese & Pauly, 2009). Trata-se de uma espécie nativa bem adaptada à criação e de boa aceitação no mercado consumidor (Marchioro & Baldisserotto, 1999). Em sistemas de cultivo intensivo no Sul do Brasil apresenta conversão alimentar aparente em torno de 1,8, aceita bem o manejo periódico e não cessa o crescimento no inverno (Fracalossi et al., 2004), além disso, responde positivamente ao processo de indução hormonal (Sampaio & Sato, 2006; Carneiro & Mikos, 2008).

O controle do processo reprodutivo é fundamental para a atividade aquícola que se encontra em plena expansão (Scorvo, 2008). Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental, é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Para tal, devem-se utilizar gametas masculinos e femininos de qualidade promovendo máxima fertilização e, subsequentemente, desenvolvimento normal do embrião (Bobe & Labbé, 2009).

A qualidade dos ovócitos pode ser determinada por meio do tamanho, homogeneidade, estimativas das taxas de fertilização, eclosão e percentual de larvas normais ou, por medidas indiretas tais como, parâmetros físico-químicos do fluido ovariano (Brooks et al., 1997; Bobe & Labbé, 2009). Entretanto, acentuadas variações destas estimativas podem ser observadas por diversos fatores, tais como, organização estrutural dos ovos e constituição do fluido perivitelínico (Laale, 1980), poluição das águas (Jones & Reynolds, 1997) e, principalmente, a manutenção dos reprodutores (matrizes) em relação ao estado nutricional (Izquierdo et al., 2001; Romagosa, 2006), período reprodutivo, idade (Coward et al., 2002), estádios de

desenvolvimento gonadal (Romagosa, 2006), fatores genéticos e endocrinológicos (Brooks et al., 1997). A estimativa da taxa de fertilização parece ser o parâmetro que melhor indica a qualidade dos ovócitos, entretanto, o processo de fertilização (artificial ou semi-natural) e a incubação dos ovos devem ser controladas a fim de propiciar a condição ideal de desenvolvimento dos ovos e, futuras larvas (Brooks et al., 1997; Coward et al., 2002; Bobe & Labbé, 2009).

Os espermatozoides podem ser avaliados por meio de características que podem estar relacionadas às taxas de fertilização (Fogli da Silveira et al., 1988; Billard et al., 1995), sendo os parâmetros de motilidade espermática comumente utilizados na determinação da viabilidade espermática (Billard & Cosson, 1992; Rurangwa et al., 2004).

De um modo geral, encontram-se poucas informações na literatura mencionando o tempo de viabilidade dos gametas de espécies de peixes tropicais, entretanto, recomenda-se a rápida homogeneização dos gametas (fertilização artificial a seco) (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007), pois os ovócitos e o sêmen perdem gradativamente sua viabilidade, (Rizzo et al., 2003; Marques & Godinho, 2004) sendo necessário utilização de métodos que garantam a longevidade dos gametas, visando também, à otimização do uso dos reprodutores e, técnicas que permitam a máxima eficiência deste processo (Rana, 1995).

Segundo Rana, (1995), Suquet et al., (1999) e Rizzo et al., (2003) a conservação dos gametas tem sido realizada, a curto prazo (temperaturas próximas a zero), utilizando-se ou não diluentes, garantindo assim, sua viabilidade por horas ou dias. Uma das vantagens na utilização dessa técnica é manipular o sêmen e/ou os ovócitos durante a coleta por um período de tempo, principalmente quando há uma falta de sincronismo dos reprodutores durante a liberação dos gametas (Rana, 1995; Marques & Godinho, 2004). Além disso, apresenta vantagem na utilização, por ser barata, não haver a necessidade da utilização de soluções crioprotetoras, possibilitar o resfriamento em temperaturas de refrigeração (1-15°C), facilitar

o manejo reprodutivo e aumentar a eficiência da reprodução artificial com relação à otimização tanto de reprodutores quanto de estruturas utilizadas na incubação dos ovos. (Marques & Godinho, 2004; Carneiro et al., 2006).

De um modo geral, a reprodução de peixes nativos brasileiros se baseia na fertilização artificial pelo método a “seco”, que consiste na extrusão e mistura dos gametas na ausência de água e, após a homogeneização completa, adiciona-se água para ocorrer à ativação dos espermatozoides e fertilização dos ovócitos (Wojnarovich & Horváth, 1983). Durante este procedimento, os gametas estão vulneráveis aos efeitos da temperatura, tanto do ambiente quanto da água, entretanto, o conhecimento destes efeitos ainda é limitado.

Alguns trabalhos com exposição de ovócitos a curto prazo revelam que ovócitos a temperaturas mais baixas são mais vulneráveis do que em temperaturas mais elevadas, como por exemplo, ovócitos de *Phochilodus marggravi*, que, quando expostos 18°C apresentam-se mais sensíveis do que 26°C (Rizzo et al., 2003). Ovócitos de *Cyprinus carpio*, apresentaram-se mais vulneráveis a temperaturas de 29-31°C e 6-9°C quando comparadas a 22-24°C (Rothbard et al., 1996). Para o sêmen, trabalhos enfatizam a utilização em temperaturas de 1,7-4,9°C (Marques & Godinho, 2004), 5,7°C (Carneiro et al., 2006), 4°C (Murgas et al., 2004; Murgas et al., 2002), 4-6°C (Oliveira et al., 2007; Isaú, 2006). Ravinder et al (1997) observaram melhores características espermáticas em sêmen estocado a 5°C ao invés de 2 e 22°C. Apesar de vários trabalhos nesta área, pouco se sabe sobre o comportamento dos ovócitos e dos espermatozoides em diferentes temperaturas em relação ao tempo.

Diante disso, o conhecimento do efeito das temperaturas de exposição e da água sobre os gametas torna-se de fundamental importância em estações de reprodução de peixes, principalmente em amplitudes térmicas facilmente controladas em laboratórios de produção. Além disso, o conhecimento do efeito das variáveis que interferem no manejo reprodutivo

sobre os gametas torna-se importante no sentido de possibilitar seu uso racional e conseqüentemente maior lucro por unidade de produção.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

1. Características da espécie

1.1. Classificação taxonômica e distribuição geográfica

Os peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia* popularmente denominados de jundiá, foram classificados como pertencentes à família Pimelodidae por Nakatani et al., (2001) e Sands (1984). No entanto, recentemente, após revisão taxonômica realizada por Bockmann & Guazzelli (2003) passaram a pertencer à família Heptapteridae da ordem dos Siluriformes. Desta forma, a espécie em estudo é a *Rhamdia quelen*, descrita por Quoy & Gaimard (1824), sendo espécies sinônimas mais comuns a *R. branneri*, *R. sapo*, *R. hilarii* e *R. sebae*. Tais espécies apresentam distribuição desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (Froese e Pauly, 2009), e por serem sinônimas, as espécies supra-citadas, as quais possuem o nome vulgar de jundiá, serão abordadas nesta revisão.

1.2. Produção

Em termos históricos, dados da produção nacional evidenciam que na década de 90, o jundiá apresentava posição de destaque principalmente no sul do Brasil (Piaia & Baldisserotto, 2000), entretanto, a partir de 2001 ocorreram mudanças no perfil de sua produção passando a representar em 2005 somente 0,32% (577,5 t) do total da produção aquícola nacional (IBAMA, 2007). De acordo com Boscardin (2008), o jundiá assim como outras espécies nativas, necessita de um grande aporte científico e tecnológico que garanta sustentabilidade zootécnica e econômica semelhante às espécies exóticas. Além disso, cabe ainda abordar a falta de organização por parte dos piscicultores, bem como, licenciamento da atividade, assistência técnica eficaz e, o controle sanitário fundamental para uma criação rentável (Baldisserotto, 2009).

O jundiá é uma espécie nativa bem adaptada (Esquivel, 2005) e de boa aceitação no mercado consumidor (Marchioro & Baldisserotto, 1999). Além disso, apresenta carne com sabor e textura agradáveis e com alto rendimento de carcaça (Ferreira et al., 2001; Reidel, 2007). Em sistemas semi-intensivo e intensivo o jundiá tolera baixas temperaturas (Lermen et al., 2004) apresentando rápido crescimento (Fracalossi et al., 2004) e, quando mantidos em densidades de estocagem de dois a quatro peixes por metro quadrado podem alcançar 600 a 800g, em 8 meses (Barcellos et al., 2003), tamanho este, considerado como o comercial (Carneiro, 2004). Além disso, altas densidades de estocagem (454 alevinos/m²) proporcionam os peixes a atingirem maiores índices de sobrevivência e ganho em peso quando comparados à densidades inferiores (114 e 227 alevinos/m²) (Piaia & Baldisserotto, 2000). Segundo estes autores, a partir de uma certa densidade de estocagem os indivíduos diminuem a sua agressividade pelo fato do alto custo energético gasto para a defesa territorial, passando a partir deste ponto a se agrupar com os demais. Na prática seu cultivo vem sendo realizado em viveiros de terra ou açudes (2.000 a 5.000 m²) associados ao policultivo com carpas ou tilápias (Carneiro, 2004), e aceitam rações comerciais nas primeiras fases de desenvolvimento (Baldisserotto & Radünz Neto, 2005). O jundiá tem hábito alimentar generalista, com tendência a predação de peixes e crustáceos (Kütter et al., 2009), no entanto, sua alimentação assim como, em outras espécies de peixes tropicais (Abelha et al., 2001) se baseia na disponibilidade de alimento presente no ambiente natural (Gomiero et al., 2007).

Como foi dito anteriormente, na região Sul do Brasil frequentemente, é realizada sua criação em policultivo (jundiá, carpa ou tilápia) (Baldisserotto, 2009). Entretanto, Amaral Jr. et al. (2008) recomendam o monocultivo utilizando-se a densidade de 1,5 peixes.m² em viveiros escavados de 300 m². Nestas condições o jundiá apresenta crescimento satisfatório e bons índices de sobrevivência (54%). De acordo com Carneiro & Mikos (2005), a alimentação pode ser efetuada uma vez ao dia, sem efeitos no ganho de peso, reduzindo

assim, os custos de produção. A exigência protéica e energética de alevinos de jundiá é de 34% de PB e 3.500kcal de energia metabolizável (Meyer & Fracalossi, 2004) e quando recebem rações formuladas a base de farinha de carne/ossos ou farinha de peixe combinadas com farelo de soja, apresentam melhores desempenhos (Lazzari et al., 2006; 2007). Além disso recomenda-se que a água mantenha níveis de oxigênio dissolvido entre 5,2 mg.L⁻¹ (Braun et al., 2006) e 5,4 mg.L⁻¹ (Maffezzoli & Nuñez, 2006) e médias da temperatura da água de 23,7°C (Piedras et al., 2004).

1.3. Biologia reprodutiva

A espécie atinge sua maturação gonadal com aproximadamente um ano de idade em ambos os sexos, sendo que em ambientes naturais, os machos iniciam o processo de maturação testicular com 13,4cm e, as fêmeas com 16,5cm (Narahara et al., 1985a). Quando se encontram maduros, os machos apresentam papila protraída e liberam com facilidade o sêmen quando o abdome é pressionado e, as fêmeas com o orifício urogenital hepíricoavermelhado, dilatação ventral e, sob leve massagem abdominal liberam ovócitos (Silva et al., 2004).

O período reprodutivo do jundiá pode variar conforme a região geográfica como, por exemplo, em locais que apresentam sazonalidade bem diferenciada, a reprodução ocorre na primavera e verão (Narahara et al., 1985b; Gomes et al., 2000; Ferreira et al., 2001; Baldisserotto & Radünz Neto, 2005; Borges et al., 2005). Em ambientes relativamente estáveis (recursos alimentares e precipitação constantes), o período reprodutivo é longo, com uma parcela da população pronta à desova ao longo do ano (Gomiero et al., 2007). Exemplares de jundiá capturados no rio Jaguari, em Jaguariúna/SP apresentavam período reprodutivo de setembro a fevereiro, onde o processo de maturação ocorreu simultaneamente com o aumento dos valores médios de temperatura da água e precipitação pluviométrica

(Naharara et al., 1989). Entretanto, a maturação gonadal inicia-se quando a água atinge temperaturas superiores a 17°C (Ferreira et al., 2001). De acordo com Barcellos et al. (2001; 2002), a temperatura da água associada às horas de luz, são características ambientais primárias que regulam a fase maturacional dos jundiás.

O comportamento reprodutivo desta espécie assemelha-se ao de muitas outras espécies de peixes tropicais de água doce (Silva et al., 2004). As fêmeas são ovulíparas e, quando aptas à desova, procuram lugares de águas rasas e limpas, pouca corrente e fundo pedregoso (Gomes et al., 2000). Ocorre sincronismo na liberação dos gametas no momento da desova, que geralmente ocorre ao amanhecer (Baldisserotto & Radünz Neto, 2005). Em geral, as populações de jundiá preferem locais com abrigos nas proximidades das barrancas, com profundidades de até dois metros, onde geralmente, ocorrem temperaturas (17-20°C) e níveis de oxigênio dissolvido (4-7 mg.L⁻¹) da água mais elevados (Schulz & Leuchtenberger, 2006).

A espécie apresenta desova parcelada, com desenvolvimento ovocitário assincrônico, sem cuidado parental, com pequeno número de ovócitos liberados (fecundidade) que parece estar diretamente relacionada ao comprimento total, peso total e das gônadas (Narahara et al., 1989). No período reprodutivo as fêmeas adultas apresentam cinco estádios de desenvolvimento dos ovócitos (Cussac & Maggese, 1986; Gomiero et al. 2007). Entretanto, Naharara et al. (1989) classificaram o desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas de *R. hylarii* em seis estádios: jovem, repouso, maturação, maduro, semi-esgotado e esgotado. Em tanques-rede o *R. quelen* apresentou os estádios de desenvolvimento testicular e ovariano de jovem, repouso, maturação, maduro e regressão, além disso, ocorreu a antecipação do período de maturacional com a manipulação da dieta (Reidel, 2007).

Os ovócitos recém-liberados de jundiá são esféricos, demersais e não adesivos com coloração amarela clara e diâmetro de 1,0 mm, pós-fertilização tornam-se transparentes, envoltos por uma camada gelatinosa e o diâmetro médio aumenta devido à hidratação (Pereira

et al., 2006). O embrião em desenvolvimento é envolto por um espaço perivitelínico bem definido e por um resistente córion (Gomes et al., 2000; Pereira et al., 2006). Água a 24°C ocorre à eclosão em aproximadamente 30 h e 5 min após a fertilização (Pereira, et al., 2006). Godinho et al. (1978) descreveram o desenvolvimento embrionário e o momento da eclosão quando as médias de temperaturas da água atingem 23°C, 27 h pós-fertilização. Entretanto, Amorim et al. (2009) observaram eclosão em 25 h e 30 min em água a 24 °C. Estas diferenças nos tempos de eclosão observadas em indivíduos da mesma espécie ocorrem pelo fato dos ovos serem incubados em condições ambientais diferenciadas (Pereira et al., 2006; Amorim et al., 2009).

1.4. Reprodução artificial

A reprodução artificial do jundiá é realizada por meio da indução hormonal (Baldisserotto & Radünz Neto, 2005), podendo ser empregada a fertilização semi-natural (Silva et al., 2004;) ou a seco (Bombardelli et al., 2006a; Sampaio & Sato, 2006). Os machos liberam fluido seminal a partir de leve pressão abdominal, sem a necessidade de indução hormonal (Ferreira et al., 2001), entretanto, respondem bem ao processo de hipofiseação (Guilherme et al., 2007), aumentando o fluido seminal após uma dose única de 0,5 a 3,0 mg de extrato de hipófise de carpa por kg de reprodutor (EHC.kg^{-1}) (Baldisserotto & Radünz Neto, 2005; Carneiro & Mikos, 2008). Deve-se destacar que, a realização da indução hormonal é praticada com intuito de garantir um maior volume de sêmen, facilitando sua manipulação em procedimentos de reprodução artificial (Carneiro & Mikos, 2008).

Fêmeas de jundiá podem apresentar repostas satisfatórias quando submetidas à aplicação de 4,0 mg de EHC.kg^{-1} , sendo esta realizada em duas dosagens, a primeira correspondendo a 10% do total e a segunda a 90% deste, entre intervalos de aplicação de 10 a 12 horas (Baldisserotto e Radünz Neto, 2005). Podem ser submetidas também, à dosagem

única de 6,0 mg de EHC.kg⁻¹, podendo ovular após 300 horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo após indução hormonal) (Sampaio & Sato, 2006).

Tipos de hormônios, dosagens aplicadas, períodos de latência podem variar conforme as condições em que os reprodutores (matrizes) foram mantidos durante o período que antecede à desova e o estágio de desenvolvimento que se encontram no momento da aplicação hormonal (Zaniboni Filho & Nuñez, 2004; Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Outro indutor utilizado é o hormônio gonadotrópico (HCG) (Baldisserotto & Radünz Neto, 2005). Andreatta (1979), utilizou este hormônio em três dosagens de 400 UI.kg⁻¹, em fêmeas reprodutoras, em intervalos de 24h, obtendo respostas positivas. Quando associado o HCG e hormônio liberador do hormônio gonadotrópico (GnRHa) mais inibidores de dopamina Carneiro & Mikos (2008) observaram respostas negativas.

Após a realização da coleta dos gametas por meio da extrusão (massagem abdominal no sentido céfalo-caudal), várias análises são realizadas com intuito de verificar a qualidade e a quantidade dos gametas produzidos.

As características quanti-qualitativas do sêmen de jundiá comumente avaliadas são: volume seminal liberado, concentração espermática, motilidade, tempo de duração da motilidade, índice de sobrevivência e morfologia espermática. Alguns resultados destes parâmetros para o jundiá foram: volume seminal de 2,2 a 21,4 mL ou 4,0 a 38,8 mL de semen.kg⁻¹ de reprodutor (Carneiro & Mikos, 2008), e de 5,9±0,5 mL ou 36,0±8,0 mL de semen.kg⁻¹ de reprodutor (Bombardelli et al., 2006a); concentração espermática entre 5,0±1,2x10¹⁰ a 6,6±3,6x10¹⁰ espermatozóides.mL⁻¹ de sêmen (Borges et al., 2005), e 5,58±0,569x10¹⁰ espermatozóides.mL⁻¹ de sêmen (Fogli da Silveira et al., 1985); taxa de motilidade espermática subjetiva de 88,3±2,9% (Ferreira et al., 2001) e 81,90±9,67% (Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986); tempos de duração quando 50% dos espermatozóides perderam sua motilidade de 23,9±2,7 a 26,2±3,4 segundos (Hilbig et al., 2008) e 23,71 a

28,96 segundos (Sanches et al., 2006); índices de sobrevivência espermática de $95,2 \pm 5,7$ a $99,1 \pm 0,4$ % (Hilbig et al., 2008) e 96% (Bombardelli et al., 2006a); índices de espermatozóides normais de 66,9% (Bombardelli et al., 2006a).

Segundo Sampaio & Sato (2006) as principais variáveis biológicas mensuradas em fêmeas de jundiá são índice gonadosomático em estágio maduro (IGS = 15,2 a 20,7%), fecundidade (absoluta, FA = 16.750 a 79.886 ovócitos.fêmea⁻¹ e relativa, FR = 180 a 233 ovócitos.g⁻¹ de fêmea), diâmetro do ovo (hidratado, DH = 2.456 a 2.832 μm e não-hidratado, DNH = 1.353 a 1.579 μm) e taxa de fertilização (TF = 68,3 a 86,2%).

A fertilização artificial do jundiá é comumente realizada a “seco”, em que após a coleta dos gametas, ocorre a mistura do sêmen com os ovócitos na ausência de água, após a homogeneização completa adiciona-se água, ocorrendo a ativação dos espermatozóides e posteriormente fertilização dos ovócitos (Woynarovich & Horváth, 1983). Para que ocorra o máximo aproveitamento dos gametas de jundiá Bombardelli et al. (2006a) recomendam uma dose inseminante acima de 89.472 espermatozóides.ovócito⁻¹.

A seguir, os ovos são transferidos para incubadoras, de formato cônico, que garantam a movimentação e oxigenação constante dos mesmos (Woynarovich & Horváth, 1983). A água empregada na fertilização e incubação dos ovos de jundiá devem apresentar valores de potencial hidrogênionico entre 7,5 a 8,0 e dureza de 40 mg.L⁻¹ de CaCO₃ (Graeff et al., 2007).

2. Qualidade dos gametas

Apesar da viabilidade dos gametas ter recebido atenção especial, a preocupação em selecionar reprodutores que apresentam gametas de boa qualidade ainda é limitada (Rurangwa et al., 2004) e, são fundamentais no controle do processo reprodutivo (Bobe & Labbé, 2009).

A qualidade dos gametas é determinada através da habilidade em promover máximas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário normal (Bobe & Labbé, 2009). O

potencial de desenvolvimento pode ser estimado por meio de medidas/estimativas diretas (tamanho, fertilização, eclosão, percentual de larvas normais) ou indiretas, pela avaliação de parâmetros físicos e químicos do fluido ovariano (Brooks et al., 1997; Bobe & Labbé, 2009), como por exemplo, o pH, quando baixo, pode indicar a má qualidade dos ovócitos em *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner, 2000). Estas características podem também, variar em função de fatores como, organização estrutural dos ovos e constituição do fluido perivitelínico (Laale, 1980), poluição das águas (Jones & Reynolds, 1997) e, principalmente, a condição das matrizes em relação ao estado nutricional (Izquierdo et al., 2001), período reprodutivo (Brown et al., 2006), idade (Coward et al., 2002), processo de maturação (Lessman, 2009), estágio de desenvolvimento gonadal (West, 1990), fatores genéticos, fisiológicos e endocrinológicos (Brooks et al., 1997) e sanidade (Coward et al., 2002).

Dentre os parâmetros citados a taxa de fertilização é o mais utilizado para indicar a qualidade dos ovócitos, entretanto, algumas variáveis (parâmetros físicos e químicos da água, estruturas utilizadas) no processo de fertilização e incubação dos ovos devem ser controladas a fim de propiciar condição ideal de desenvolvimento dos mesmos (Brooks et al., 1997; Chereguini et al., 1999; Coward et al., 2002; Bobe & Labbé, 2009).

Para se determinar a viabilidade espermática parâmetros como, taxas de motilidade progressiva, índices de sobrevivência e anormalidades morfológicas podem ser correlacionadas às taxas de fertilização (Fogli da Silveira et al., 1988; Billard & Cosson, 1992; Billard et al., 1995; Rurangwa et al., 2004).

A motilidade espermática é determinada pela diminuição ou aumento da osmolaridade do meio externo (Marques, 2001), onde o espermatozóide é ativado pela diminuição da osmolaridade em relação ao fluido seminal em espécies de peixes de água doce (Billard et al., 1995; Coward et al., 2002). Nestes teleósteos, os espermatozoides são imóveis no plasma seminal contendo em torno de 300 mOsm.kg^{-1} (Marques, 2001; Alavi & Cosson, 2006). Para

o jundiá, Borges et al. (2005), observaram que o fluido seminal apresenta osmolaridade de $274,8 \pm 11,2 \text{ mOsm.kg}^{-1}$.

A perda da capacidade de natação dos espermatozoides é originada pela insuficiência de ATP endógeno provocada pela fosforilação oxidativa mitocondrial, altamente requerida para a produção de energia durante a locomoção dos espermatozoides (Marques, 2001; Cosson, 2004).

A estimativa da taxa de motilidade vem sendo avaliada observando-se a movimentação dos espermatozoides logo após a introdução da solução ativadora (Billard & Cosson, 1992), por meio de métodos subjetivos (Billard et al., 1993). Entretanto, estas mensurações têm levantando dúvidas quanto a sua validação, pois, dependem basicamente da experiência do observador. Recentemente, por meio de *softwares* específicos, vem-se utilizando programas computacionais tais como, *computer assisted sperm analysis* (CASA), aplicado em avaliações espermáticas de peixes (Kime et al., 1996; Ravinder et al., 1997; Rurangwa et al., 2001; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007).

A motilidade espermática assistida pode otimizar às condições de preservação (Rurangwa et al., 2001), diluição (Ravinder et al., 1997), fertilização (Rurangwa et al., 1998), podendo também indicar os níveis de poluição aquática (Kime & Nash, 1999; Hilbig et al., 2008). Permite também, obter-se a velocidade espermática, linearidade, balanço e frequência de batimentos (Ravinder et al., 1997; Rurangwa et al., 2001; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007), estabelecendo um padrão do comportamento espermático normal em peixes. Além disso, estes parâmetros podem identificar quais reprodutores do plantel são realmente eficazes, possibilitando assim, a redução dos custos na piscicultura.

Outro parâmetro, tempo de duração da natação dos espermatozoides pode representar a qualidade espermática. (Murgas et al., 2004; Streit Jr. et al., 2006a; Hilbig et al., 2008). Tais mensurações podem ser realizadas em relação ao percentual de espermatozoides que pararam

de se movimentar: 100% (Streit Jr. et al., 2006b); 50% (Hilbig et al., 2008; Sanches et al., *prelo*); 90% (Murgas et al., 2004; Borges et al., 2005). O tempo de duração e a estimativa das taxas de motilidade espermática podem ser afetados pelas características das soluções ativadoras aplicadas (Carosfeld et al., 2003) como, diluições (Lahnsteiner et al., 2003), concentrações osmóticas e iônicas (Alavi & Cosson, 2006), temperatura e pH (Alavi & Cosson, 2005).

A qualidade espermática também pode ser avaliada por meio do índice de espermatozóides vivos, apresentando relação direta com a taxa de motilidade espermática (Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986), podendo ser observada pelo método de coloração dos espermatozóides como, eosina-nigrosina (Blom, 1950; Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986; Murgas et al., 2003). Neste método, quando o sêmen é misturado ao corante os espermatozóides mortos coram-se em rosa, devido à permeabilidade ao corante, enquanto que as células vivas permanecem brancas (Hilbig et al., 2008). Bastardo et al. (2004) definiram como espermatozóides de boa qualidade, aqueles com índices superiores a 50% de sobrevivência. O conhecimento do percentual de espermatozóides vivos também pode ser determinante para a manutenção de reprodutores viáveis.

Alterações morfológicas da estrutura dos espermatozóides podem também ter influência direta na fertilidade do reprodutor (Toniolli, 1999; Rurangwa et al., 2004), podendo levar o animal à esterilidade absoluta (Mies Filho, 1987; Hafez & Hafez, 2004). Tais alterações podem atingir estruturas, tais como, o núcleo e a cauda (Mies Filho, 1987). Para peixes não há índices morfológicos que possam indicar até que ponto os reprodutores são viáveis, contudo, podem contribuir para a manutenção de estoques de reprodutores geneticamente viáveis.

A qualidade seminal de peixes teleósteos pode variar conforme o tamanho do indivíduo (Luz et al., 2001); idade dos reprodutores (Bastardo et al., 2004); realização de

coletas seminais sucessivas (Kavamoto et al., 1997); aplicação hormonal ou não (Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986; Godinho, 2007); tipo de hormônio (Streit Jr. et al., 2003; Streit Jr. et al., 2004; Bombardelli et al., 2006b); alimentação dos reprodutores (Sanches et al., 2006); época de coleta (Rakitin et al., 1999; Borges et al., 2005) e, a forma de como o sêmen é coletado (Ferreira et al., 2001).

3. Conservação dos gametas

De um modo geral, após a coleta por extrusão, os gametas perdem gradativamente sua viabilidade por certo período de tempo, assim, medidas que prolongam sua viabilidade são imprescindíveis (Rana, 1995). De acordo com este mesmo autor, as técnicas de preservação dos gametas apresentam o objetivo de aumentar sua longevidade por meio de estocagem a baixas temperaturas, permitindo assim, a manutenção de biodiversidade genética dos peixes.

A prática aplicada na conservação de gametas se baseia na criopreservação de sêmen (Carolsfeld et al., 2003), conservação a curto prazo de sêmen e/ou ovócitos (Rizzo et al., 2003) e, resfriamento de embriões (El-Battawy & Linhart, 2009).

A criopreservação consiste no congelamento do sêmen, em nitrogênio líquido, mantendo-se a qualidade por período indeterminado (Billard, 1990) apresentando vantagens na conservação a longo prazo. No entanto, é um método com elevados custos de manutenção (Rana, 1995).

A conservação de gametas a curto prazo consiste na exposição de sêmen e/ou ovócitos a temperaturas próximas a zero, utilizando-se ou não de diluentes, durante horas ou dias (Billard, 1990; Rana, 1995). Ela pode ser realizada em condições de assincronismo dos reprodutores durante o processo de ovulação quando realizada a desova induzida (Rana, 1995; Marques, 2001). Outra vantagem é que por se tratar de um procedimento barato, não necessita de soluções crioprotetoras, possibilitando o resfriamento em temperaturas de refrigeração (1-

15°C), facilitando o manejo reprodutivo e aumentando a eficiência da reprodução artificial (Marques, 2001).

Protocolos de resfriamento de embriões a temperaturas abaixo de zero são efetuados, no entanto, com sucesso restrito (Streit Jr. et al., 2007). De acordo com Rana (1995), o sucesso da estocagem de gametas depende de fatores intrínsecos devendo receber atenção especial, à técnica de coleta, procedimento de estocagem, temperatura, composição e diluição do meio diluente, e a contaminação pós-coleta.

3.1. Ovócitos

A conservação dos ovócitos é realizada somente a curto prazo (Ranna, 1995), devido apresentar dificuldades inerentes a preparação de solução semelhante à composição do fluido ovariano, além da solução crioprotetora não tóxica para a criopreservação (Billard, 1990).

A temperatura é o principal fator que parece afetar a qualidade dos ovócitos estocados *in vitro*, sendo a estocagem realizada em temperaturas próximas a zero para reduzir sua carga metabólica (Rana, 1995). Além disso, a estocagem em ambientes contendo certos níveis de oxigênio, antibióticos e soluções semelhantes ao fluido ovariano também vem sendo estudada, no entanto, os resultados variam entre as espécies de peixes e protocolos empregados (Rana, 1995).

Suquet et al. (1999) estocaram ovos de “turbot” *Psetta máxima*, em temperaturas de 3, 9 e 13°C, não observando o efeito entre as temperaturas de exposição, oxigênio atmosférico, ar e uso ou não de antibiótico sobre as taxas de fertilização e eclosão. Entretanto, a utilização ou não de diluentes com composição semelhante ao fluido ovariano, com ou sem inibidor de proteína, reduziu as taxas de fertilização somente após 9 h de exposição. A utilização de fluidos especiais semelhantes ao fluido ovariano foi testado por Goetz & Coffman (2000), estudando ovócitos de truta arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* após 2 dias de estocagem, em 12-

13°C, em solução de “Cortland” contendo “Hepes” (20 mM; 4-2-hidroxietil-1-ácidopiperazinoetanosulfônico) sem perda de fertilidade. Niksirat et al. (2007) observaram que ovócitos desta mesma espécie quando conservados a 2-3°C na solução de “Cortland” contendo “Hepes” e “Tris”, diminuíram sua viabilidade comparando-se aos estocados em fluido ovariano, que mantiveram-se viáveis por 9 dias. Holcomb et al. (2005) observaram que ovos de *O. mykiss* durante 10 dias estocados em temperaturas de 0°C associados à introdução de antibióticos, mantiveram-se viáveis, inibindo assim, o crescimento de bactérias e prolongando sua viabilidade.

Ovos de carpa comum, *Cyprinus carpio* (koi) podem ser estocados em temperaturas de 22-24°C, por até 6 h, apresentando sobrevivências superiores a 50%, entretanto, quando mantidos a temperaturas de 29-31°C e a 6-9°C houve diminuição das taxas de fertilização (Rothbard et al., 1996). Sohrabnezhad et al. (2006), observaram melhores resultados das taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais em ovócitos de esturjão da Pérsia, *Acipenser persicus* expostos a 18°C ao invés de 4°C, indicando possível interação entre a temperatura e o tempo de exposição. Além disso, os autores notaram também que, os melhores resultados foram nos ovócitos diluído em fluido ovariano artificial (PSACF-“Persian Sturgeon Artificial Coelomic Fluid”).

Souza et al. (2007), ao exporem ovócitos de curimatá, *Prochilodus lineatus* em temperaturas de 31°C observaram redução das taxas de fertilização após 33,04 minutos da liberação dos ovócitos por extrusão, após este período houve um efeito linear inversamente proporcional entre as taxas de fertilização e o tempo pós-extrusão. Entretanto, para o dourado, *Salminus brasiliensis* em 25,3°C a estocagem foi realizada durante 25 min, após este tempo ocorreu diminuição das taxas de fertilização (Weingartner & Zaniboni Filho, 2007). Rizzo et al. (2003), ao estocarem ovócitos de curimatá-pacu, *Prochilodus marggravii* a temperatura de 26°C *ex situ* durante 1 h, não observaram perda de viabilidade, entretanto, após este período

ocorreu redução significativa dos valores das taxas de fertilização. Além disso, ovócitos expostos a 18°C perdem a viabilidade mais rapidamente do que a 26°C, assim como, a estocagem *in situ* em relação à *ex situ*. A queda dos valores nas taxas de fertilização parece estar associada às mudanças da organização espacial dos filamentos do citoesqueleto dos ovócitos, entretanto, o fechamento da micrópila não foi observado simultaneamente com as quedas destes valores. Estas diferenças no tempo de estocagem dos ovócitos pode ser devido a fatores como, composição citoquímica dos ovos por meio das vesículas corticais, zona pelúcida ou células foliculares, todavia há necessidade de mais estudos devido a ampla variação de espécies de peixes tropicais (Bazzoli & Rizzo, 1990).

Apesar dos estudos serem mais relacionados com a preservação a curto prazo em espécies de peixes de regiões temperadas do que as tropicais, informações em relação à temperatura ideal, utilização ou não do meio diluidor (natural ou artificial), de antibióticos e inibidores de proteínas, são contraditórias. Isso revela a necessidade de mais estudos para que se possa padronizar metodologias eficientes para as espécies de peixes nativas.

3.2. Sêmen

A estocagem de sêmen se baseia na criopreservação e na preservação a curto prazo (Rana, 1995). Para a criopreservação, o sêmen deve ser previamente diluído em soluções que garantam a proteção intra e extracelular das células espermáticas (Rana, 1995). Protocolos específicos para cada espécie de peixe encontram-se na literatura, entretanto, devido às peculiaridades existentes nas características seminais principalmente, nas inúmeras espécies de peixes nativos (Viveiros & Godinho, 2009). Pesquisas de criopreservação com espécies de peixes sul-americanas apresentam altas taxas de motilidade espermática pós-descongelamento. Geralmente, o método aplicado é a exposição de palhetas contendo sêmen diluído, em nitrogênio a vapor, por um período de 12-24 horas, transferidas novamente ao

nitrogênio líquido porém, a temperaturas próximas a -200°C , podendo nestas condições permanecerem por períodos indeterminados (Carolsfeld et al., 2003). Os autores afirmam que o descongelamento é realizado por meio de banho-maria, em água em diferentes temperaturas ($30-65^{\circ}\text{C}$), durante alguns segundos (5-15s).

Carolsfeld et al. (2003) descreveram protocolos de criopreservação de sêmen aplicados a cinco espécies de peixes brasileiros, utilizando normalmente a diluição de 1:3 (sêmen:diluidor), sendo os diluidores mais comumente utilizados, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, gema de ovo, leite em pó, glicose, sacarose, cloretos, bicarbonatos e água destilada. Além disso, protocolos utilizados em mamíferos também são aplicados em peixes, entretanto, com viabilidade restrita (Streit Jr. et al., 2006b).

A conservação do sêmen a curto prazo pode ser realizada em refrigeradores domésticos ($1-15^{\circ}\text{C}$) sem a necessidade de um diluidor especial e, com custos reduzidos (Marques & Godinho, 2004; Carneiro, 2007).

Poucas pesquisas sobre conservação a curto prazo de sêmen de espécies de peixes nativos têm sido realizadas. Marques & Godinho (2004) estudando o comportamento do sêmen de seis espécies de peixes tropicais em relação à exposição em dois recipientes (sacos e tubos plásticos), com presença de oxigênio ou ar, em temperaturas de $1,7-4,9^{\circ}\text{C}$, observaram o efeito do oxigênio, apenas para o curimatá-pacu, *Prochilodus marggravii*, com maiores motilidades após 6 h de estocagem em sacos de plástico. Entretanto, para o sêmen de piauí-três-pintas, *Leporinus friderici* e piapara, *Leporinus elongatus* verificou-se que a motilidade foi ao redor de 30% com 7-8 h, matrinxã, *Brycon lindii* com motilidade próxima de 30% após 14 h, pacu-caranha, *Piaractus mesopotamicus* e curimatá, *Prochilodus lineatus* entre 19-20 h ao redor de 40%. Os autores confirmam também, a aplicabilidade do resfriamento do sêmen obtendo-se taxas de fertilização de ovos de 88-90% com a utilização do sêmen de *P. marggravii* após 8 h de estocagem.

Carneiro et al. (2006) ao exporem sêmen de jundiá em refrigerador doméstico ($T = 5,7^{\circ}\text{C}$), observaram que a motilidade espermática permaneceu por 12 dias, entretanto, ocorreu redução após o 8º dia de exposição. Os autores verificaram também, redução do índice de sobrevivência espermática a partir do 5º dia de exposição reduzindo de 74,5 % (inicial) para 15,5% no mesmo período de exposição. Além disso, revelaram a aplicabilidade da conservação de sêmen de jundiá a curto prazo, constataram que o sêmen após o 12º dia de exposição pode ser aplicado na fertilização dos ovócitos, apresentando taxas de fertilização acima de 50%. Borges et al. (2005) descreveram que em ambientes a 24°C , o sêmen de jundiá apresentou a mesma viabilidade durante 2 h. Luz et al. (2001) observaram que o sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* pode ser exposto durante 6 h a 25°C sem perda de viabilidade.

A utilização de diluidores específicos também aumenta o sucesso no resfriamento do sêmen de peixes a curto prazo. Murgas et al. (2004) testaram três diferentes diluidores contendo “Beltsville Thawing Solution” (BTS®), ressaltam que após 144 horas de resfriamento a 4°C , apresentou 62% de motilidade espermática de piracanjuba *Brycon orbignyanus*.

Para a piapara, *Leporinus obtusidens*, Murgas et al. (2002) observaram que a utilização do diluidor BTS®, juntamente com o DMSO a 10% promove um bom meio para a conservação do sêmen, verificando que a motilidade de 58% quando ativados com bicarbonato de sódio 1%, após 120 h de exposição à 4°C . Franciscatto et al. (2002) mostraram que a motilidade foi de 58% para o sêmen de curimatá, *Prochilodus lineatus* utilizando-se diluidores BTS® 5% + KI 0,16% após 168 h à 4°C .

Oliveira et al. (2007) observaram que sêmen de pirapitinga, *Brycon nattereri* apresentou redução da motilidade somente após o segundo dia de exposição *in natura* à $4-6^{\circ}\text{C}$, mas

quando diluído em BTS[®], proporcionou redução somente após o quinto dia, com motilidade de 48% após sete dias de exposição.

Isaú (2006) advertiu que o sêmen de piracajuba, *Brycon orbignyanus* resfriado entre 4-6°C, durante 6 dias, apresentou alta motilidade com a utilização do diluidor Saad (NaCl 200 mM, Tris 30mM,) com o antibiótico getamicina.

Os resultados oriundos de investigações revelam a possibilidade da realização da conservação do sêmen de espécies de peixes nativos a curto prazo, como uma alternativa simples, barata e, tecnicamente de fácil aplicação em sistemas comerciais de cultivo. No entanto, a utilização de diluentes específicos pode aumentar a durabilidade dos espermatozoides (Billard & Cosson, 1992). Além disso, o fator temperatura deve receber atenção especial, sendo um dos principais responsáveis pela viabilidade dos espermatozoides (Billard, 1990).

4. Referências bibliográficas

ABELHA, M. C. F.; AGOSTINHO, A. A.; GOULART, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.425-434, 2001.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v.29, p.101-110, 2005.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, v.30, p.1-14, 2006.

AMARAL JR., H.; ALMEIDA, D. R.; QUEIRÓZ E SILVA, F.; GARCIA, S. Avaliação do jundiá (*Rhamdia quelen*) em diferentes sistemas de cultivo para a região do litoral centro norte de Santa Catarina, Brazil. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.9, n.12, p.1695-7504, 2008.

AMORIM, M. P.; GOMES, B. V. C.; MARTINS, Y. S.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**, v.40, p.172-180, 2009.

ANDREATTA, E. R. **Influência de diferentes dosagens e intervalos entre aplicações de gonodotropinas coriônica humana (HCG) sobre a reprodução do jundiá *Rhamdia sapo* (Valenciennes 1840)**. 1979. 51p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1979.

- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.291-299, 2009.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia* sp.) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES L. C. (Orgs.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.303-325.
- BARCELLOS, L. J.G., KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L. B.; FIORENZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. de A.; TERRA, S. Hematological and biochemical characteristics of male jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard Pimelodidae): change after acute stress. **Aquaculture Research**, v.34, p.1465-1469, 2003.
- BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTZE'S, I.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**, v.61, p.751-763, 2002.
- BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTZE'S, I.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v.121, p.325-332, 2001.
- BASTARDO, H.; GUEDEZ C.; LEÓN, M. Características del semen de trucha arco-iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v.22, n.3, p.277-288, 2004.
- BAZZOLI, N; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten brazilian teleost fish species. **European Archives of Biology**, v.101, p.399-410, 1990.
- BILLARD, R., Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E., (Org.) **Marshall's Physiology of Reproduction** . v.2. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990, p.870-888.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.22-31, 1992.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Orgs.) **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995, p.25-52.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.67-75, 1993.
- BLOM, E. A One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. **Fertility and Sterility**, v.1, p.176-177, 1950.
- BOBE, J., LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**. 2009, Disponível em: < doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011 >. Acesso em: 28 abr. 2009.
- BOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M. Heptapteridae. In.: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. (Orgs.) **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre:EDIPUCRS, 2003, p.406-431.
- BOMBARDELLI R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006a.

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, 2006b.

BORGES, A.; SIQUEIRA, D. R.; JURINITZ1, D. F.; ZANINI, R.; AMARAL, F.; GRILLO, M. L.; OBERST, E. R.; WASSERMANN, G. F. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.31, p.45-53, 2005.

BOSCARDIN, N. R. A Produção Aqüícola Brasileira. In.: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Orgs.) **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, 2008, p.27-72.

BRAUN, N.; LIMA, R. L.; MORAES, B.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, v.37, p.1524-1531, 2006.

BROOKS, S.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.7, p.387-416, 1997.

BROWN, N. P.; SHIELDS, R. J.; BROMAGE, N. R. The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Aquaculture**, v.261, p.993-1002, 2006.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.361-366, 2007.

CARNEIRO, P. C. F. A produção do jundiá em cativeiro. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. (Orgs.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004, p.117-141.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. **Acta Scientiarum, Animal Science**, v.30, n.3, p.345-350, 2008.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.187-191, 2005.

CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, v.4, n.3, p.11-16, 2006.

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, p.472-489, 2003.

CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I. G.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. Artificial fertilization in turbot, *Scopthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, v.30, p.319-324, 1999.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v.12, p.69-85, 2004.

COWARD, K., BROMAGE, N. R., HIBBITT, O.; PARRINGTON, J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.12, p.33-58, 2002.

CUSSAC, V. E.; MAGGESE, M. C. Oogenesis in *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) stages of the oocyte, egg's envelopes and effects of the human chorionic gonadotropin. **Revista Brasileira de Biologia**, v.46, n.1, p.139-147, 1986.

EL-BATTAWY, K. A.; LINHART, O. Preliminary studies on sryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos (Work in Progress.) **Reproduction in Domestic Animal**, 2009, doi:10.1111/j.1439-0531.2007.01059.x.

ESQUIVEL, B. M. **Produção do jundiá (*Rhamdia quelen*) em áreas de entorno do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro em Paulo Lopes – SC**. 2005. 102p. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. O.; LUZ, R. K. FERNANDEZ, A. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.57-60, 2001.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. O. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.15, n.1, p.51-54, 1988.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T. NARAHARA, M. Y.; Avaliação da qualidade e crio - preservação em forma de “pellets” do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840), **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12, n.4, p.7-11, 1985.

FRACALOSSO, D. M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F. M.; WEINGARTNER, 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. Animal Sciences**, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

FRANCISCATTO, R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; LOGATO, P. V. R.; SILVA, M. O. B. Viabilidade espermática e taxa de fertilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) resfriado a 4°C. In: URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. P. (Orgs.). **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, v.2, Jaboticabal:AQUABIO, 2002, pp.127-134.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase: World Wide Web electronic publication**. 2009. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 27 abr. 2009.

GODINHO, H. M. FENERICH, N. de A., NARAHARA, M. Y. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840)(Siluriformes, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, n.1, p.151-156, 1978.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GOETZ, F. W.; COFFMAN, M. A. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media, **Aquaculture**, v.184, p.267-276, 2000.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; CHIPARI GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Ramdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30 p. 179-185, 2000.

GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, v.7, n.3, p. 127-133, 2007.

GRAEFF, A.; TOMAZON, A. F.; PRUNE, E. N.; MARAFON, A. T. Influência da dureza e do pH no desenvolvimento do jundiá (*Rhamdia quelen*) na fase de fertilização até a produção de pós-larvas. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**. v.8, n.9, p. 1-6, 2007.

GUILHERME, L. C.; MORELLI, S.; SILVA, N. R.; MOURA, M. R.; Indução Artificial da ovulação do *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) em reprodutores capturados no leito do rio Uberabinha – relato de caso. **Veterinária Notícias**, v.13, n.2, p.55-61, 2007.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004, 509p.

HILBIG, C. C.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v.30, n.2. p. 217-224, 2008.

HOLCOMB, M.; CLOUD, J. G.; INGERMANN, R. L. Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. **Aquaculture Research**, v.36, p.1555-1561, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Estatística da Pesca 2005: Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília: Coordenação Geral de Gestão de Recursos Pesqueiros, 2007, 147p. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/rec_pesqueiros > Acesso em: 09 set. 2007.

ISAÚ Z.A. **População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento**. 2006. 94p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

IZQUIERDO, M. S; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v.197, p.25–42, 2001.

JONES, J. C.; REYNOLDS, J. D. Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.7, p.463-491, 1997.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.13, p.95-100, 1986.

KAVAMOTO, E. T.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ANDRADE TALMELLI, E. F.; CAMPOS, B. E. S. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa*. Steindachner, 1881, **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, n.único, p.73-78, 1997.

KIME, D. E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H. D. M.; OLLIVIER, F. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. **Aquatic Toxicology**, v.36, p.223-237, 1996.

KIME, D. E.; NASH, J. P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **The Science on the Total Environment**, v.233, p.123-129, 1999.

KÜTTER, M. T.; BEMVENUTI, M. A.; MORESCO, A. Feeding strategy of the jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) in costal lagoons of southern Brazil. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.31, n.1, p.41-47, 2009.

LAALE, H. W. The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. **Copeia**, v.2, p.210-226, 1980.

- LAHNSTEINER, F. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.23, p.107–118, 2000.
- 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.
- LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; VEIVERBERG, C. A.; BERGAMIN, G. T.; CORRÊIA, V.; PEDRON, F. A. Alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*, heptateridae) com ingredientes protéicos. **Archivos de Zootecnia**. v.56, n.214, p.115-123, 2007.
- LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; EMANUELLI, T.; PEDRON, F. A.; COSTA, M. L.; LOSEKANN, M. E.; CORREIA, V.; BOCHI, V. C. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.36, n.1, 2006.
- LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.239, p.497–507, 2004.
- LESSMAN, C. A. Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. **General and Comparative Endocrinology**, v.161, p.53-57, 2009.
- LUZ, R. K.; FERREIRA, A. A.; REYNALTE-TAJATE, D. A.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.39-42, 2001.
- MAFFEZZOLLI, G.; NUÑER, A. P. O. Crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, **Acta Scientiarum, Biological Science**, v.28, n.1, p.41-45, 2006.
- MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.315-318, 1999.
- MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte 2001.
- MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5. p.799-804, 2004.
- MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundiá, *Rhamdia quelen*, fingerlings at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v.240, p.331-343. 2004.
- MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. 6.ed. Porto Alegre:Sulina, 1987, 533p.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; BARBOSA, M. O.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade do sêmen de piapara (*Leporinus obtusidens*), resfriado a 4°C, empregando-se diferentes diluentes. In: URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. P. (Orgs.). **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, v.2, Jaboticabal:AQUABIO, 2002, pp.117-125.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p.1361-1365, 2004.

- MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba *Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, (Supl. 2), p.1810-1814, 2003.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce**. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.
- NARAHARA, M. Y., GODINHO, H. M., FENERICH-VERANI, N.; ROMAGOSA, E. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12, n.4, p.13-22. 1985a.
- NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12, n.3, p. 123-137, 1985b.
- NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Tipo de desova e fecundidade do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.16, n.1, p. 37-45, 1989.
- NIKSIRAT, H.; SARVI, K.; MOJAZI AMIRI, B.; HATEF, A. Effects of storage duration and storage media on initial and post-eyeing mortality of stored ova of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.262, p.528-531, 2007.
- OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; ISAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.6, p.1509-1515, 2007.
- PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; RITTER, F.; SILVA, L. B. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, n.4, p. 1057-1063, 2006.
- PIAIA, R.; BALDISSEROTTO, B. Densidade de estocagem e crescimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Ciência Rural**, v.30, p.509-513. 2000.
- PIEDRAS, S. R. N.; MORAES, P. R. R.; POUHEY, J. L. O. F. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, n.2, p.177-182, 2004.
- RAKITIN, A.; FERGUSON, M. M.; TRIPPEL, E. A. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod *Gadus morhua* : correlation and variation during the spawning season. **Aquaculture**, v.170, p.349-358, 1999.
- RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Orgs.) **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p.53-75.
- RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMDAR, K. C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, v.50, p.1309-1328, 1997.
- REIDEL, A. **Níveis de energia e proteína na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*) criados em tanques-rede**. 2007. 85p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

- RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. **Theriogenology**, v.60, p.1059-1070, 2003.
- ROMAGOSA E. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: CYRINO J.E.P.; URBINATI E.C. (Orgs.) **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. Jaboticabal: Aquabio, 2006, pp.108-116.
- ROTHBARD, S.; RUBINSHTEIN, I.; GELMAN, E. Storage of common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs for short durations. **Aquaculture Research**, v.27, p. 175-181, 1996.
- RURANGWA, E., KIME, D. E., OLLEVIER, F., NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28, 2004.
- RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS, G.; KIME, D. E. ; OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*), **Theriogenology**, v.55, p.751-769, 2001.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G.; HEBRAHIMI, M.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F. 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**, v.53, p.402-413, 1998.
- SAMPAIO, E. V.; SATO, Y. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v.28, n.3, p.263-268, 2006.
- SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado (*Salminus brasiliensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia (prelo)**.
- SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M.; BOMBARDELLI, R. A.; VIDAL, E.; OLIVEIRA, E. A. Desempenho reprodutivo de machos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) (Quoy & Gaimard, 1824) submetidos a dietas contendo diferentes níveis de energia digestível. In: SINPÓSIO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PESCA, 1., 2006, Toledo, **Anais...** Toledo: CECE Unioeste *Campus* Toledo (CD-ROM).
- SANDS, D. **Catfishes of the World, Auchenipteridae and Pimelodidae**. Dunure, Scotland: Dunur Enterprisse, v.3, 1984, 145 p.
- SCHULZ, U. H; LEUCHTENBERGER, C. Activity Patterns of South American Silver Catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, v.66, n.2a, p.565-574, 2006.
- SCORVO FILHO, J. D. Piscicultura em tanques-rede uma alternativa para grandes e pequenos corpos de água in **AveSui América Latina**, Florianópolis, 2008.
- SILVA, L. V. F.; RADÜNZ NETO, J.; BALDISSEROTTO, B. Reprodução. In.: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. (Orgs.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004, p.95-106.
- SOHRABNEZHAD, M.; KALBASSI, M. R.; NAZARI, R. M.; BAHMANI, M. Short-term storage of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova in artificial media and coelomic fluid. **Journal of Applied Ichthyology**, v.22 (Suppl. 1), p.395-399, 2006.
- SOUZA, B. E.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; ROMAGOSA, E.; BOMBARDELLI, R. A.; VIDAL, E. Taxa de fertilização de ovócitos de curimatá armazenados por diferentes

períodos de tempo a temperatura ambiente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados, **Anais...** Dourados:Embrapa Pantanal (CD-ROM).

STREIT JR., D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N. MORAES, G. V.; GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.

STREIT JR., D. P.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; MENDEZ, L. V.; GALLO, J. M.; DIGMAYER, M.; POVH, J. A. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, v.22, n.3, p.119-125, 2006a.

STREIT JR., D. P.; BENITES, C.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; CALDIERI, R. F. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.289-297, 2006b.

STREIT JR., D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. D.; SOUZA, E. D.; POVH, J. A.; CAÇADOR, W. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.41, p.147-153, 2004.

STREIT JR., D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; CAÇADOR, W. C.; SAKAGUTI, E. S.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v.25, n.2, p.261-266, 2003.

SUQUET, M.; CHEREGUINI, O.; OMMES, M. H.; RASINES, I.; NORMANT, Y.; SOUTO, I. P.; QUEMENER, L. Effect of temperature, volume of ova batches, and addition of a diluent, an antibiotic, oxygen and protein inhibitor on short-term storage capacities of turbot, *Psetta maxima*, ova. **Aquatic Living Resources**, v.12, n.4, p.239-246, 1999.

TONIOLLI, R. Morfologia dos Espermatozoides de Suíno, diluídos no Diluidor de Beltsville (Bts) Adicionados do Ácido 3-Indol Acético. **Ciência Animal**, v.9, n.2, p.61-65, 1999.

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

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Efeito do curto período de estocagem dos ovócitos e tempo de enxágüe da água de ativação dos gametas na reprodução de dourado *Salminus brasiliensis* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados, **Anais...** Dourados: Embrapa (CD-ROM).

WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v.41, n.2.p.199-222, 1990.

WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, v.67, p.661-672, 2007.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Trad. Vera Lucia Mixtra Chama. Brasília: Escopo. 1983. 220p. Tradução de "The artificial propagation of warm-water finfishes - A Manual for Extension".

ZANIBONI FILHO,E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Reprodução de peixes migradores de água doce. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Orgs.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.45–74.

V. OBJETIVO

1. Objetivo geral

O trabalho foi conduzido no sentido de com o objetivo de avaliar o efeito de três temperaturas de estocagem a curto prazo e da água sobre os ovócitos e sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*.

2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de três temperaturas de estocagem a curto prazo e da água sobre as taxas de fertilização artificial de ovócitos, eclosão de ovos e percentual de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen*.
- Padronizar a utilização de softwares livres para a avaliação da motilidade espermática computadorizada do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*.
- Avaliar o efeito de três temperaturas de estocagem a curto prazo e da água sobre a taxa de motilidade espermática, velocidade curvilínea, velocidade média do deslocamento, velocidade em linha reta, linearidade, agitação e frequência de batimentos dos espermatozoides de jundiá, *Rhamdia quelen*.

VI. Tempo e temperatura na estocagem de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen*¹

Resumo

O objetivo foi avaliar o efeito de três temperaturas de estocagem e da água e sobre os ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen*. Utilizou-se um delineamento experimental fatorial no tempo ($5 \times 3 \times 3 \times 3$), com os tratamentos realizados em triplicata a cada 48h, na exposição de ovócitos nas temperaturas de 15; 25 e 35°C e, ativados com água à 15; 25 e 35°C cada, nos períodos de, 0, 45, 90, 135 e 180 minutos pós-coleta. A análise de regressão linear pelo modelo de superfície de resposta indicou interação ($P < 0,05$) entre o tempo e a temperatura de exposição com maiores valores das taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais verificados no momento imediato à coleta dos ovócitos ($70,2 \pm 8,4\%$ de ovócitos fertilizados, $66,7 \pm 29,4\%$ de ovos eclodidos e $30,3 \pm 25,0\%$ de larvas normais). A temperatura da água obtida pelo modelo estatístico que proporcionou maiores ($P < 0,05$) taxas de fertilização foi 25,6°C. As taxas de fertilização eclosão e de larvas normais apresentaram ($P < 0,05$) correlações positivas mostrando que estes parâmetros podem ser utilizados na mensuração da qualidade dos ovócitos. Recomenda-se a realização da fertilização artificial dos ovócitos imediatamente após a coleta e, caso haja necessidade de estocagem, deve-se expor os ovócitos a 15°C.

Palavras-chave: estocagem de gametas, fertilização artificial, larva, ovos de peixe, reprodução

¹ Artigo apresentado nas normas da Revista *Aquaculture Research*

Effect of time and temperature in the storage of jundiá, *Rhamdia quelen* oocytes**Abstract**

The aim was to evaluate the effect of three storage and water temperatures on oocytes of jundiá, *Rhamdia quelen*. We used a factorial experimental design in time (5×3×3×3), with treatments performed in triplicate every 48 h, in 15, 25 and 35°C oocytes expositions temperature, and activated with water at 15, 25 and 35°C each in the following periods after collection: 0, 45, 90, 135 and 180 minutes. The linear regression analysis by the model of response surface regression showed interaction (P<0.05) between time and temperature of exposure with higher values of fertilization, hatching and larval normality rates observed in immediate moment after oocytes collection (70.2±8.4% of fertilized oocytes, 66.7±29.4% of hatched eggs and 30.3±25.0% of normal larvae). The water temperature obtained by statistic model that showed higher (P<0.05) fertilization rate was 25.6°C. The fertilization, hatching and larvae normality rates showed (P<0.05) positive correlation, indicating that these parameters can be used to measure the oocytes quality. The artificial fertilization of oocytes is recommended immediately after collection, and if there is a need for oocytes storage, to apply expose the oocytes at 15°C.

Keywords: artificial fertilization, fish eggs, gametes storage, larvae, reproduction

Introdução

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) é representante da família Heptapteridae e da ordem Siluriformes (Bockmann & Guazzelli, 2003), originário das bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, estendendo-se do sudoeste do México ao centro da Argentina (Froese & Pauly, 2009). Trata-se de uma espécie de peixe, bem adaptada à criação e de boa aceitação no mercado consumidor (Marchioro & Baldisserotto, 1999). Em sistemas de cultivo intensivo apresenta conversão alimentar em torno de 1,8, aceita bem o manejo periódico e não cessa o crescimento no inverno no sul do Brasil (Fracalossi et al., 2004), além disso, responde positivamente ao processo de indução hormonal (Sampaio & Sato, 2006; Carneiro & Mikos, 2008).

O controle do processo reprodutivo é fundamental para a atividade aquícola que se encontra em plena expansão (Scorvo, 2008). Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental, é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Para tal, deve-se utilizar gametas masculinos e femininos de qualidade promovendo máxima fertilização e, subsequentemente, desenvolvimento normal do embrião (Bobe & Labbé, 2009).

De um modo geral, encontram-se poucas informações na literatura mencionando o tempo de viabilidade *ex situ* dos gametas da ictiofauna nativa do continente sul-americano. O procedimento recomendado é a rápida homogeneização dos gametas (fertilização artificial, por extrusão), baseado na hipótese de que os ovócitos e o sêmen podem perder a viabilidade ao longo do tempo. Neste sentido, é importante o conhecimento sobre os mecanismos de perda de viabilidade e desenvolvimento de métodos que garantam a longevidade dos gametas, visando à otimização do uso dos reprodutores e das técnicas de propagação artificial de peixes (Rana, 1995; Babin et al., 2007).

Segundo Suquet et al. (1999), Rizzo et al. (2003) e Babin et al. (2007) a conservação dos gametas tem sido realizada, a curto prazo (temperaturas próximas a zero), utilizando-se ou não diluentes, garantindo assim, sua viabilidade por horas ou dias. Uma das vantagens no emprego dessa técnica é aproveitar os gametas ao máximo em ocasiões em que ocorre assincronismo dos reprodutores quando se utiliza a terapia hormonal (Rana, 1995; Marques & Godinho, 2004). Outra vantagem, por se tratar de um procedimento barato, não necessita de soluções crioprotetoras, possibilitando o resfriamento em temperaturas de refrigeração (1-15°C), facilitando o manejo reprodutivo e aumentando a eficiência da reprodução artificial (Marques, 2001).

A reprodução do jundiá se baseia na fertilização artificial pelo método a “seco”, que consiste na extrusão e mistura dos gametas na ausência de água e, após a homogeneização completa, adiciona-se água para ocorrer à ativação dos espermatozóides e fertilização dos ovócitos (Sampaio & Sato, 2006). Durante este procedimento, os gametas estão vulneráveis aos efeitos da temperatura, tanto do ambiente quanto da água, entretanto, o conhecimento destes efeitos ainda é limitado, bem como a viabilidade dos ovócitos em amplitudes térmicas que podem ser controladas em laboratórios de reprodução de peixes.

Diante disso, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da amplitude térmica de 15 a 35°C que podem ocorrerem em laboratórios de reprodução sobre a viabilidade dos ovócitos durante 180 minutos pós-coleta, por meio das estimativas das taxas de fertilização de ovócitos, eclosão de ovos e percentual de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAC), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

(UNIOESTE), instalado no Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental (CPAA), em Toledo, Paraná, Brasil.

Trinta e dois (32) reprodutores F1 de jundiá (*Rhamdia quelen*) (Apêndice A, Fig.1), com 2 anos de idade provenientes na Estação de pesquisa foram utilizados, destes, 17 fêmeas ($292,35 \pm 59,22\text{g}$ e $24,38 \pm 2,18\text{cm}$) e 15 machos ($212,67 \pm 32,61\text{g}$ e $22,83 \pm 1,30\text{cm}$). Em fevereiro de 2008, foram selecionados jundiás com as seguintes características externas – fêmeas: ventre abaulado, papila genital saliente e avermelhada e, machos: fluindo sêmen sob leve compressão abdominal conforme Bombardelli et al. (2006).

Os reprodutores selecionados foram separados por sexo e mantidos em caixas circulares (1.500 L), dotadas de renovação constante (750 L.h^{-1}), por meio de bombeamento de água, com entrada e saída de água independentes, até o momento da coleta dos gametas.

Os peixes foram induzidos, hormonalmente, através da aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) conforme Woynaróvich & Horváth (1983) e Bombardelli et al. (2006). As fêmeas receberam um total de $5,5 \text{ mg EBHC.kg}^{-1}$, sendo aplicada em duas doses, uma prévia de 10% do total realizada 12 horas antes da segunda aplicação. Os machos receberam uma dose única de $2,5 \text{ mg EBHC.kg}^{-1}$. As injeções foram aplicadas no músculo da região dorsal próximo da nadadeira dorsal (Apêndice A, Fig.2).

A coleta dos gametas foi realizada após o período de 240 horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo), sendo monitoradas a partir da 2ª aplicação hormonal (Bombardelli et al., 2006). Para facilitar o manejo foi obedecido o seguinte critério para as coletas dos gametas: (1) masculinos e, (2) femininos.

Os machos foram contidos e secos (panos e papel toalha), individualmente, massageados na região abdominal no sentido céfalo-caudal (Apêndice A, Fig.3). A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação com urina e, o restante do sêmen coletado (tubo de ensaio graduado, $\pm 0,1 \text{ mL}$) para mensuração do volume total de

sêmen liberado, e, em seguida conservado sob resfriamento (13°C) conforme Souza (2007). Caso ocorresse sangramento no momento da coleta do sêmen, a mesma era interrompida evitando-se assim qualquer possível influência na avaliação da qualidade espermática.

O sêmen foi homogeneizado, originando um “pool” de sêmen proveniente do total de cinco machos utilizados em cada protocolo experimental e, realizadas as análises de concentração espermática, índice de sobrevivência espermática, e o tempo de duração da motilidade espermática.

Para mensuração da concentração espermática foi utilizada uma amostra 5 µL do sêmen, diluída em 5000 µL de formol salina tamponado (Streit Jr. et al., 2004), resultando em uma diluição de 1:1000. Para a contagem das células espermáticas foi utilizada uma câmara hematómica de Neubauer (espermatozóides.mL⁻¹) conforme Wirtz & Steinmann (2006).

A avaliação do índice de sobrevivência espermática foi realizada pelo método de coloração eosina-nigrosina (Blom, 1950), utilizando-se 30 µL de sêmen e 90 µL de cada corante. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (objetiva de 40×), sendo contados no total 400 espermatozóides.

O tempo de duração da motilidade espermática foi mensurado segundo Sanches et al. (*prelo*), com 5 µL de sêmen, diluídos em 200 µL de solução ativadora (água), resultando em uma diluição sêmen:água de 0,025:1. Após a diluição, 5 µL foram retirados para a mensuração do período de tempo de exposição até que aproximadamente 50% dos espermatozóides perdessem sua movimentação. Para tanto, o acompanhamento foi realizado em um microscópio de luz (objetiva de 40×). O tempo foi mensurado por meio de um cronômetro digital, iniciado simultaneamente com o início da ativação espermática (Hilbig et al., 2008).

As fêmeas que liberavam ovócitos, a partir de uma leve pressão do abdômen no sentido céfalo-caudal (Apêndice A, Fig.3), os ovócitos foram transferidas para um local seco, e,

posteriormente, submetidas ao processo de fertilização artificial. Um “pool” de ovócitos que apresentavam homogeneidade de tamanho e cor foi destinado aos protocolos de fertilização (Apêndice B, Fig.1). Para a estimativa do número de ovócitos utilizados em cada unidade experimental, foram coletadas três amostras de ovócitos não hidratados (0,1 mL), contados e, determinado o número total de ovócitos. Para a estimativa do número total de ovócitos retirados de todas as fêmeas, o restante dos ovócitos não utilizados nos protocolos experimentais foram hidratados e, posteriormente estimados através de três amostragens de 3,0 mL.

Foi utilizado um delineamento experimental fatorial no tempo de $5 \times 3 \times 3 \times 3$. Os tratamentos foram constituídos pela exposição dos ovócitos após a coleta nas temperaturas de, 15; 25 e 35 °C e, ativados com água na temperatura de, 15; 25 e 35°C, nos períodos de tempo de 0 (controle); 45; 90; 135 e 180 minutos pós-extrusão. Para tanto, os ovócitos foram colocados em placas de petri (Apêndice B, Fig.2) e, expostos em ambientes aquecidos ou resfriados dotados de termostato ($\pm 1^\circ\text{C}$) (Apêndice B, Fig.3). Os tratamentos foram distribuídos em 39 unidades experimentais e, realizados em triplicatas. Cada réplica foi conduzida em protocolos seqüenciais a cada 48 horas. Cada protocolo foi composto pela fertilização de ovócitos, provenientes de um “pool” de ovócitos de no mínimo três fêmeas, submetidos às diferentes temperaturas de estocagem *versus* temperaturas da solução ativadora (água) *versus* tempo pós-coleta (Tabela 1). Foi considerada como unidade experimental uma incubadora, de formato cônico, confeccionada em PVC (2,5L), contendo 2,0 mL de ovócitos (2.589) (Apêndice C, Fig.2). A dose inseminante aplicada foi de $1.000.000$ espermatozoides.ovócito⁻¹ (adaptado de Bombardelli et al., 2006).

O sêmen utilizado em cada réplica nos diferentes tratamentos foi o mesmo, proveniente de um “pool” de sêmen de cinco machos conservado sob resfriamento a 13°C (Souza, 2007).

A ativação dos gametas foi realizada em recipientes plásticos (150 mL) (Apêndice C, Fig.1), com 25 mL de água proveniente de poço artesiano da Estação, contendo 6,8 de pH; 4,26 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido; 0,29 mg L⁻¹ de nitrato; 0,0038 mg L⁻¹ de nitrito; 0,126 mg L⁻¹ de amônia; dureza de 43,96 mg L⁻¹ e alcalinidade de 996,30 mEq L⁻¹.

O efeito dos tratamentos foi observado com base nas estimativas das taxas de fertilização dos ovócitos, eclosão dos ovos e percentual de larvas normais.

As taxas de fertilização foram mensuradas após o fechamento do blastóporo, aproximadamente oito horas pós-fertilização (Amorim et al., 2009), por meio de três amostras de 275 ovos de cada unidade experimental. Para tanto, foram considerados ovos fertilizados aqueles que se apresentavam translúcidos e não fertilizados, opacos (Woynarovich & Horváth, 1983).

Tabela 1 Ilustração da disposição das unidades experimentais de uma réplica, em função da combinação dos fatores experimentais (temperatura de exposição dos ovócitos *versus* temperatura da água *versus* tempo pós-coleta para fertilização artificial dos ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen*).

TEO (°C)	Protocolo de Fertilização								
	15			25			35		
MEO(min.)/TSA(°C)	15	25	35	15	25	35	15	25	35
0	-	-	-	x	x	x	-	-	-
45	X	x	x	x	x	x	x	x	x
90	X	x	x	x	x	x	x	x	x
135	X	x	x	x	x	x	x	x	x
180	X	x	x	x	x	x	x	x	x

TEO – Temperatura de exposição dos ovócitos (°C); MEO – Minutos de exposição dos ovócitos; TSA – Temperatura da solução ativadora (°C); x - combinação dos fatores experimentais utilizado em cada unidade experimental.

Após a eclosão dos ovos, (25 horas pós-fertilização) (Pereira et al., 2006), foram estimadas as taxas de eclosão. Esta foi obtida pela contagem de todas as larvas contidas em

cada unidade experimental, divididas pela quantidade inicial de ovócitos estimados. Para tanto, após a eclosão, as larvas foram fixadas em solução de formaldeído a 4%.

Das larvas conservadas em formaldeído 4%, 200 foram utilizadas para estimar o percentual de larvas normais, utilizando-se um microscópio estereoscópio (objetiva 4×), considerando como padrão morfológico larvas descritas por Nakatani et al. (2001) (Apêndice C, Fig.3).

Uma vez que o sêmen utilizado para fertilizar os ovócitos foi o mesmo durante os 180 minutos de exposição, foi mensurado o índice de sobrevivência espermática e o tempo de duração da motilidade espermática (0, 45, 90, 135 e 180 minutos pós-coleta), a fim de verificar possíveis interferências sobre os resultados em função da perda de viabilidade espermática ao longo do tempo.

Utilizou-se a análise de variância para verificar o comportamento do índice de sobrevivência e do tempo de duração da motilidade espermática durante 180 minutos de exposição. As possíveis influências do tempo de exposição dos ovócitos (T), temperatura de exposição dos ovócitos (TE) e temperatura da solução ativadora (TA) sobre as variáveis respostas (VR) foram avaliadas através do protocolo de regressão linear do modelo de superfície de resposta do *software Statistica*© (Statsoft, 2005).

O modelo de superfície de resposta utilizado foi:

$$\mathbf{VR} = \partial_0 + \partial_1 \mathbf{T} + \partial_2 \mathbf{TE} + \partial_3 \mathbf{TA} + \partial_4 (\mathbf{T} * \mathbf{TE}) + \partial_5 (\mathbf{T} * \mathbf{TA}) + \partial_6 (\mathbf{TE} * \mathbf{TA}) + \partial_7 (\mathbf{T})^2 + \partial_8 (\mathbf{TE})^2 + \partial_9 (\mathbf{TA})^2 + \partial_{10} \mathbf{B} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

Onde: ∂_i = constantes; \mathbf{B} = efeito do bloco; $\boldsymbol{\varepsilon}$ = erro com $\sim N(0, \sigma^2)$; \mathbf{VR} = taxas de fertilização, eclosão e percentual de larvas normais.

Os parâmetros não significativos ($P > 0,05$) foram removidos progressivamente nos termos de ordens superiores pelo método *backward stepwise*. Os pressupostos foram checados nos resíduos conforme sugerido por Myers (1990).

Em caso de efeito significativo do modelo de superfície de resposta, realizou-se a plotagem do gráfico em 3D. Acima deste gráfico e em gráfico em 2D, realizou-se a plotagem da linha de máximo, obtida através das derivadas parciais (Quinn & Keough, 2002) do modelo estatístico em relação às variáveis significativas. A linha de máxima consiste na representação gráfica esperada para os máximos valores das variáveis respostas.

As taxas de fertilização, eclosão e percentual de larvas normais foram submetidas à análise de correlação, ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

As fêmeas apresentaram em média a liberação de 51.002 ± 5.890 ovócitos.fêmea⁻¹, correspondendo a 177 ± 48 ovócitos.g⁻¹ de fêmea desovante, valores estes, semelhantes aos encontrados por Sampaio & Sato (2006) para o *R. quelen* após terapia hormonal, com 16.750 a 79.886 ovócitos.fêmea⁻¹ e 180 a 233 ovócitos.g⁻¹ de fêmea, respectivamente.

Dos 15 machos, apenas um não liberou sêmen, e em média liberaram $7,97 \pm 3,45$ mL de sêmen, correspondendo a $36,69 \pm 12,12$ mL de sêmen.kg⁻¹ de reprodutor. A concentração média dos três “pools” utilizados nas três repetições foi de $4,38 \pm 0,57 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹. As características quantitativas de volume e concentração espermática do sêmen de jundiá foram semelhantes às encontradas por Bombardelli et al. (2006) com $5,9 \pm 0,54$ mL e $36,0 \pm 8,0$ mL de sêmen.kg⁻¹ de reprodutor, e por Borges et al., (2005) entre $5,0 \pm 1,2 \times 10^{10}$ a $6,6 \pm 3,6 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹ de sêmen.

Os índices de sobrevivência e os tempos de duração da motilidade espermática não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) durante os 180 minutos expostos a 13°C. No entanto, logo após a coleta, o sêmen apresentou $99,83 \pm 0,14$ % de espermatozoides vivos e com o tempo de ativação de $25,99 \pm 1,01$ s. Após 180 minutos apresentou $99,26 \pm 0,85$ % de espermatozoides vivos e $22,19 \pm 3,09$ s de ativação espermática. Estas características

qualitativas de índice de sobrevivência e tempo de duração de motilidade espermática do jundiá também foram semelhantes aos encontrados por Hilbig et al. (2008), com $23,9 \pm 2,7$ a $26,2 \pm 3,4$ segundos e por Bombardelli et al. (2006), com 96% de espermatozóides vivos.

Os gametas utilizados no presente experimento apresentaram valores semelhantes aos encontrados pela literatura e, portanto, com qualidades satisfatórias.

As taxas de fertilização (Fig. 1), eclosão (Fig. 2) e percentual de larvas normais (Fig. 3) apresentaram redução dos valores ao longo do tempo pós-coleta, apresentando efeito ($P < 0,05$) interativo entre as duas variáveis: tempo e temperatura de exposição dos ovócitos (Figs. 4, 5 e 6). Essas figuras estão representadas graficamente por meio da superfície de resposta onde utilizou-se médias de temperatura da água de 25°C . O formato da superfície não foi alterado nas diferentes temperaturas da água, entretanto, temperaturas da água inferiores ou superiores a usada na plotagem dos gráficos de 25°C influenciam na altura da superfície, o que representa as taxas de fertilização (Fig. 7A) e eclosão (Fig. 7B).

A linha de máximo desempenho teórico para as taxas de fertilização, eclosão e larvas normais foram obtidas em função das variáveis independentes de tempo e temperatura de exposição (Figs 4; 5; 6).

No presente experimento as taxas de fertilização dos ovócitos de jundiá apresentaram maiores valores quando a fertilização artificial foi realizada imediatamente após a extrusão (Fig. 1). Os resultados desta variável diminuíram em função dos tempos e das temperaturas em que foram expostos, teóricamente recomenda-se, caso haja a necessidade de conservação dos ovócitos dessa espécie, que seja realizada respeitando-se a linha em que ocorre a máxima fertilização teórica (Fig. 4B), utilizando-se inicialmente, a temperatura teórica de $9,4^{\circ}\text{C}$ e, gradativamente, elevando-se a uma taxa de $0,076^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ correspondente ao coeficiente de inclinação da linha de máxima fertilização (Fig. 4B).

O mesmo comportamento ocorreu em relação às taxas de eclosão (Fig. 2) e percentual de larvas normais (Fig. 3). Para estas variáveis a linha de máxima inicia-se nas temperaturas teóricas de 3,3°C (Fig. 5B) e 16,0°C (Fig. 6B), e aumentam em taxas de 0,110 °C.min.⁻¹ (Fig. 5B) e 0,021 °C.min.⁻¹(Fig. 6B), respectivamente.

Com relação aos três modelos estatísticos das taxas de: fertilização, eclosão e percentual de larvas normais, pode-se obter sucesso quando, pós-coleta, submeter os ovócitos a temperatura teórica inicial de 9,5°C, aumentando-se gradativamente a uma taxa teórica de 0,07 °C.min.⁻¹.

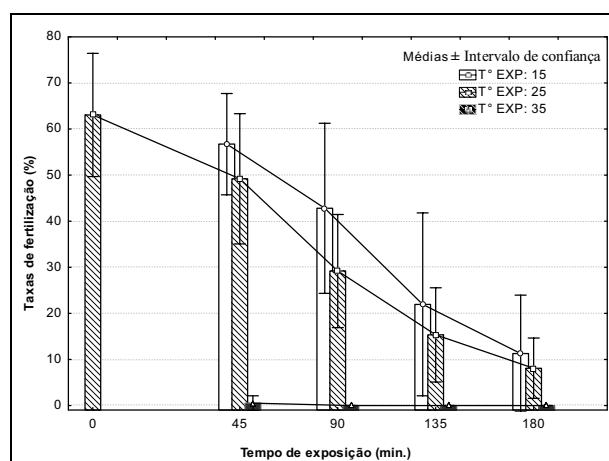


Figura 1. Taxas de fertilização de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem.

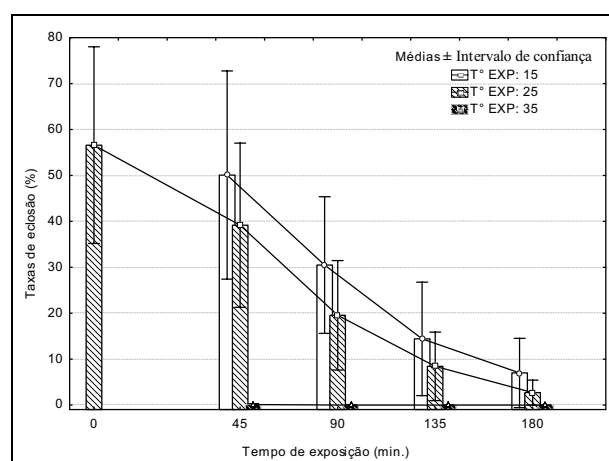


Figura 2. Taxas de eclosão de ovos de jundiá, *Rhamdia quelen* observadas a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem

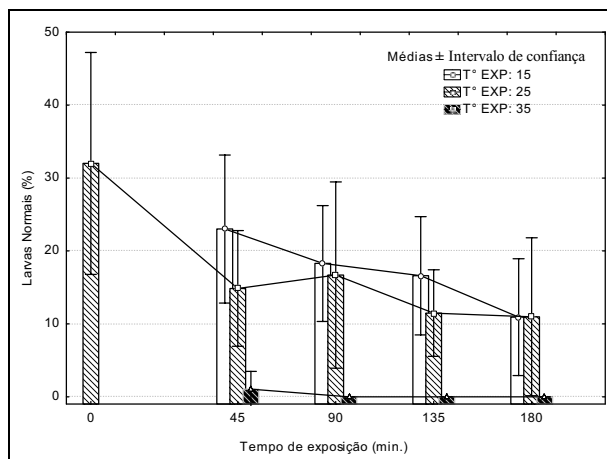


Figura 3. Percentual de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen* observadas a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem

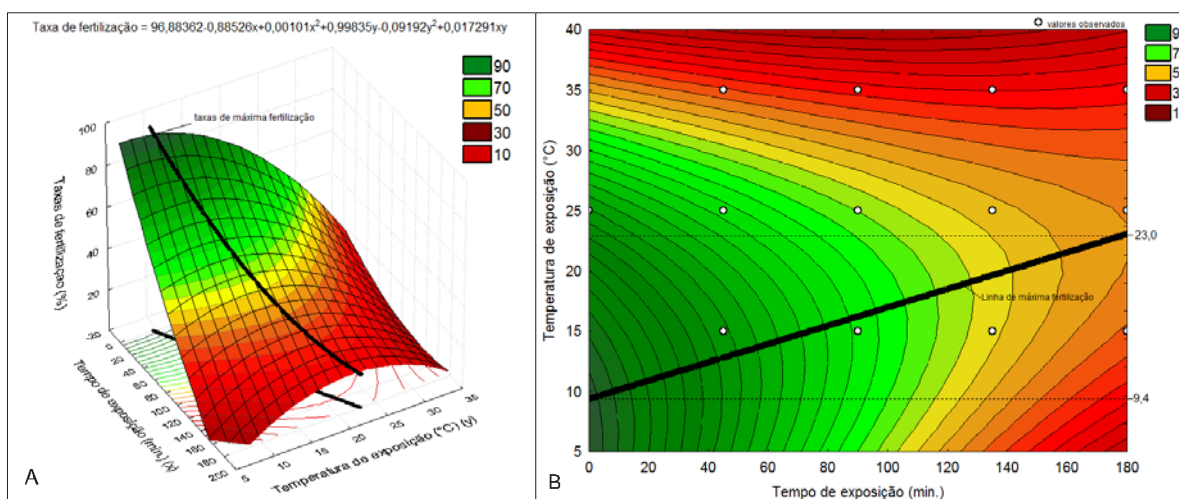


Figura 4 Taxas de fertilização dos ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. A—Representação gráfica por superfície de resposta em gráfico 3D. B—Representação gráfica por curvas de nível em gráfico 2D.

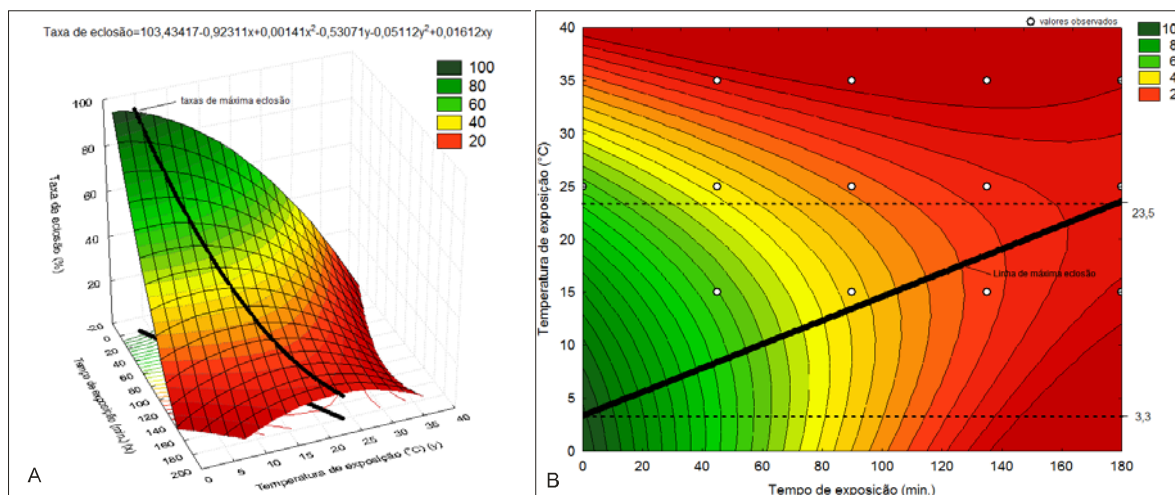


Figura 5 Taxas de eclosão dos ovos de jundiá, *Rhamdia quelen* a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. A–Representação gráfica por superfície de resposta em gráfico 3D. B–Representação gráfica por curvas de nível em gráfico 2D.

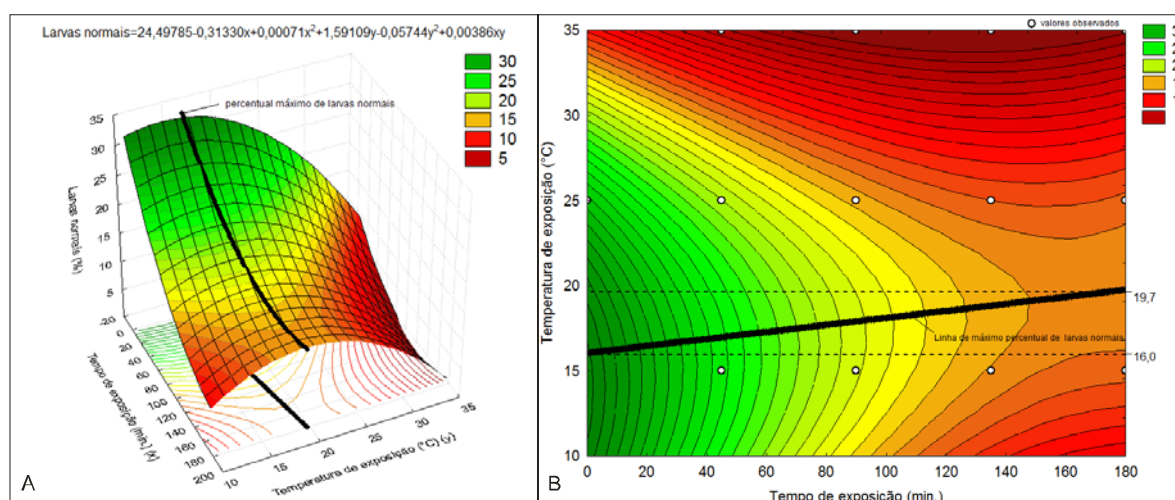


Figura 6. Percentual de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen* a partir de ovócitos submetidos a diferentes tempos e temperaturas de estocagem. A–Representação gráfica da interação por superfície de resposta em gráfico 3D. B–Representação gráfica em curvas de nível em gráfico 2D.

Suquet et al. (1999) estocaram ovos de turbot, *Psetta máxima* e não observaram o efeito entre as temperaturas de exposição, oxigênio atmosférico, ar e uso ou não de antibióticos sobre as taxas de fertilização e eclosão. Para a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* experimentos mostraram que a eficiência da conservação a curto prazo pode ser obtida pela utilização de fluido ovariano (Niksirat et al., 2007), fluidos artificiais de composição semelhante ao fluido ovariano (Goetz & Coffman, 2000), e pela introdução de antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias (Holcomb et al., 2005).

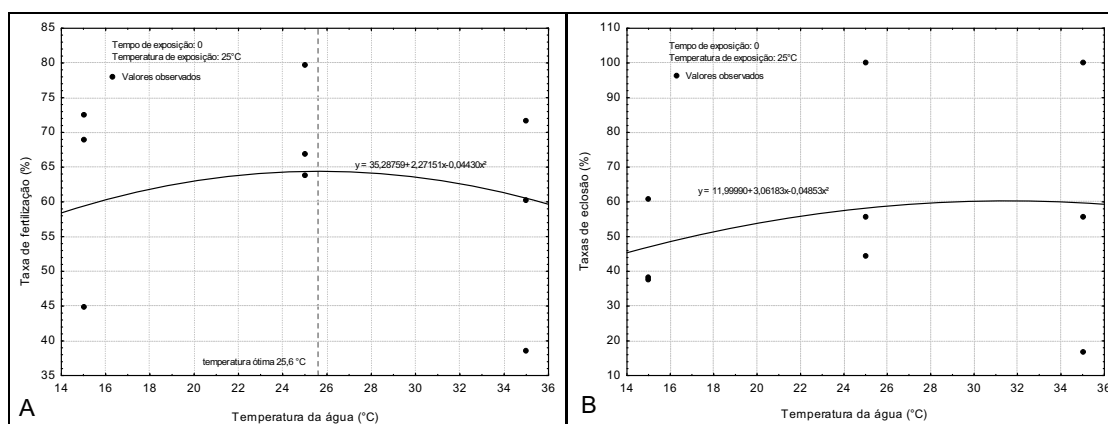


Figura 7. Efeito da temperatura da água empregada na fertilização artificial de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* sobre as: A-taxas de fertilização; B-taxas de eclosão

O efeito da temperatura foi verificado também em ovos de carpa comum, *Cyprinus carpio* (koi), apresentando melhores resultados na exposição em 22-24°C (Rothbard et al., 1996). Sohrabnezhad et al. (2006), observaram melhores taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais em ovócitos de esturjão da Pérsia, *Acipenser persicus* expostos a 18°C ao invés de 4°C.

Pesquisas que envolvem a conservação a curto prazo de ovócitos de espécies nativas tropicais foram realizadas por Souza et al. (2007), para o curimatá, *Prochilodus lineatus*, onde ao exporem os ovócitos *in natura* e *ex situ* à 31°C notaram redução das taxas de fertilização após 33,04 minutos pós-extrusão. Após este período, os mesmos autores verificaram efeito linear inversamente proporcional entre as taxas de fertilização e o tempo pós-extrusão. Ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* estocados a temperatura de 25,3°C, apresentaram redução das taxas de fertilização após 25 min. (Weingartner & Zaniboni Filho, 2007). De forma semelhante, Rizzo et al. (2003), verificaram prejuízos as taxas de fertilização, quando ovócitos de curimatá-pacu, *Prochilodus marginivittatus* foram conservados *ex situ* à temperatura de 26°C por mais de 1 hora. Além disso, os mesmos autores verificaram que ovócitos expostos a 18°C perdem a viabilidade mais rapidamente do que a 26°C, assim como, a estocagem *in situ* em relação à *ex situ*.

As perdas relacionadas às taxas de fertilização de *P. marggravii*, quando os ovócitos são submetidos a conservação por curtos períodos, parecem estar associada às mudanças da organização espacial dos filamentos do citoesqueleto dos ovócitos, já que o fechamento da micrópila não foi observado simultaneamente com as quedas destes valores (Rizzo et al., 2003). Diferenças na durabilidade dos ovócitos expostos a curto prazo de espécies de peixes tropicais podem estar associadas à composição citoquímica dos ovos por meio das vesículas corticais, da camada da zona pelúcida e células foliculares (Bazzoli & Rizzo, 1990).

Durante a execução do presente experimento, foi observado que ovócitos expostos à 35°C ficavam envoltos por um denso fluido, e quando submetidos a 15°C, caso permanecessem em contato com o ar adquiriam o aspecto de desidratação. Considerando-se que a micrópila do jundiá tem formato cônico e é envolta por uma fina camada gelatinosa (Amorim et al., 2009), durante o processo de exposição em 35°C, esta fina camada pode ter se degenerado, fechando a micrópila e, impedindo a entrada dos espermatozóides. O ressecamento dos ovócitos provavelmente interferiu na fertilização somente após 90 minutos de exposição, em que a temperatura ótima de conservação passou a atingir 16°C (Fig. 4B). No entanto, mais estudos são necessários para comprovar estes efeitos sobre os ovócitos de jundiá.

A temperatura da água utilizada no processo de ativação dos gametas não apresentou efeito interativo com o tempo e a temperatura de exposição dos ovócitos ($P > 0,05$), entretanto, influenciou as taxas de fertilização e eclosão ($P < 0,05$), apresentando um comportamento quadrático (Fig. 7A) e linear (Fig. 7B) para estas taxas, respectivamente.

Melhores taxas de fertilização podem ser alcançadas quando, no momento da fertilização, a água estiver na temperatura teórica de 25,6°C (Fig. 7A), sendo temperaturas superiores e inferiores prejudiciais aos ovócitos de jundiá. As taxas de eclosão apresentaram um comportamento linear diretamente proporcional com a temperatura da água empregada na

fertilização artificial. Entretanto, apesar de não influenciar estes resultados ($P>0,05$), o modelo quadrático ($P=0,068$) foi o que apresentou melhor representação gráfica dos valores observados (Fig. 7B). Diante destes resultados, sugere-se mais estudos para comprovar o efeito desta variável sobre estas taxas.

Os valores das taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais foram significativos ($P<0,05$) para os coeficientes de correlação, com valores de: 0,89 entre fertilização e eclosão; 0,60 entre eclosão e percentual de larvas normais; 0,69 entre fertilização e percentual de larvas normais. Indicando que a taxa de fertilização pode ser utilizada como parâmetro de estimativa da eclosão e do percentual de larvas normais e, que estes parâmetros podem ser utilizados para mensuração da qualidade dos ovócitos.

Considerando que os ovócitos perdem a qualidade imediatamente após a retirada das fêmeas por extrusão (Fig. 1), e que o sêmen não apresentou redução da qualidade em 180 min de estocagem a 13°C, recomenda-se em estações de piscicultura em que praticam a reprodução artificial do jundiá, a realização da coleta do sêmen antes que os ovócitos. Nestas condições, pode-se obter maior sucesso na fertilização artificial desta espécie.

Conclusões

Melhores taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais de jundiá, *Rhamdia quelen*, podem ser obtidas na fertilização dos ovócitos imediatamente pós-coleta. Caso haja a necessidade de conservação de ovócitos, maiores taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais podem ser obtidas quando os ovócitos são estocados a 15°C ao invés de 25 e 35°C.. As taxas de fertilização, eclosão e de larvas normais podem ser parâmetros utilizadas na determinação da qualidade dos ovócitos de jundiá. Para a prática de fertilização artificial do jundiá recomenda-se a coleta do sêmen antes que os ovócitos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos de mestrado, à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

Referências

- Amorim M.P., Gomes B.V.C., Martins Y.S., Sato Y., Rizzo E. & Bazzoli N. (2009) Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquaculture Research* **40**, 172-180.
- Babin P., Cerdà J. & Lubzens E. (2007). *The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications*. Springer, The Netherlands.
- Bazzoli N. & Rizzo E. (1990) A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. *European Archives of Biology* **101**, 399-410.
- Blom E.A (1950) One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility* **1**, 176-177.
- Bobé J. & Labbé C. (2009) Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. <doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011>. Access in: 27/04/2009.
- Bockmann F.A. & Guazzelli G.M. (2003) Heptapteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America* (CLOFFSCA) (ed. by R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr, orgs.), pp.406-431. Edipucrs, 1^a ed., PortoAlegre.

- Bombardelli R.A., Mörschbacher E.F., Campagnolo R. Sanches E.A. & Syperreck M.A. (2006) Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**,1251-1257.
- Borges A., Siqueira D.R., Jurinitz D.F., Zanini R., Amaral F., Grillo M.L., Oberst E.R. & Wassermann G.F. (2009) Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry* **31**. 45-53.
- Brooks S., Tyler C.R. & Sumpter, J.P. (1997) Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 387-416.
- Carneiro P.C.F. & Mikos J.D. (2008) Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Scientiarum. Animal Science* **30**, 345-350.
- 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.
- Fracalossi D.M., Meyer G., Santamaria F.M., Weingartner 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. Animal Sciences* **26**, 345-352.
- Froese R. & Pauly D. (2009). *FishBase: World Wide Web electronic publication*. <<<http://www.fishbase.org>>>. Access in: 27/04/2009.
- Goetz F.W. & Coffman M.A. (2000) Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media, *Aquaculture* **184**, 267-276.

- Hilbig C.C., Bombardelli R.A., Sanches E.A., Oliveira J.D., Baggio D.M. & Souza B.E. (2008) Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). *Acta Scientiarum, Animal Sciences* **30**, 217-224.
- Holcomb M., Cloud J.G. & Ingermann R.L. (2005) Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquaculture Research* **36**, 1555-1561.
- Izquierdo M.S, Fernández-Palacios H. & Tacon A.G.J. (2001) Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* **197**, 25–42.
- Jones J.C. & Reynolds J.D. (1997) Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 463-491.
- Laale H.W. (1980) The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. *Copeia* **2**, 210-226.
- Marchioro M.I. & Baldisserotto B. (1999) Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Ciência Rural* **29**, 315-318.
- Marques S. & Godinho H.P. (2004) Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**, 799-804.
- Myers R.H. (1990) *Classical and modern regression with applications* Duxbury Press. 2nd ed. Belmont.
- Nakatani K., Agostinho A.A., Baumgartner G., Bialecki A., Sanches P.V., Makrakis M.C. & Pavanelli C.S. (2001) *Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce*. Eduem, Maringá.
- Niksirat H., Sarvi K., Mojazi Amiri B. & Hatf A. (2007) Effects of storage duration and storage media on initial and post-eyeing mortality of stored ova of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **262**, 528-531.
- 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 of Biology* **66**, 1057-1063.
- Quinn G.P. & Keough, M.J. (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, New York.
- Rana K. (1995) Preservation of gametes. In: *Broodstock management and egg and larval quality* (ed. By N.R. Bromage & R.J. Roberts, orgs.) pp.53–75. Blackwell Science, London.
- Rizzo E., Godinho H.P. & Sato Y. (2003) Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. *Theriogenology* **60**, 1059–1070.
- Romagosa E. (2006) Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura* (ed. By J.E.P. Cyrino & E.C. Urbinati, orgs.) pp.108-116. Aquabio, Jaboticabal.
- Rothbard S., Rubinshtein I. & Gelman E. (1996) Storage of common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs for short durations. *Aquaculture Research* **27**, 175-181.
- Sampaio E.V. & Sato Y. (2006) Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. *Acta Scientiarum. Biological Science* **28**, 263-268.
- Sanches E.A., Bombardelli R.A., Baggio D.M. & Souza B.E. (prelo) Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado (*Salminus brasiliensis*). *Revista Brasileira de Zootecnia*.
- Scorvo Filho, J.D. (2008) Piscicultura em tanques-rede uma alternativa para grandes e pequenos corpos de água in *AveSui América Latina*, Florianópolis.

- Sohrabnezhad M., Kalbassi M.R., Nazari R.M. & Bahmani M. (2006) Short-term storage of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova in artificial media and coelomic fluid. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 395-399.
- Souza B.E., Sanches E.A., Baggio D.M., Romagosa E., Bombardelli R.A. & Vidal E. (2007) Taxa de fertilização de ovócitos de curimatá armazenados por diferentes períodos de tempo a temperatura ambiente. In: *Congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce*, 1., 2007. Embrapa Pantanal, Dourados.
- Souza B.E. (2007) *Fertilização artificial de curimatá Prochilodus lineatus*. Jaboticabal/SP/BR: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 67p. Tesis (Aquaculture mastership).
- Stasoft. Inc. (2005) *Statistic (data analysis software system)*. Version 7.1. Tulsa, USA.
- Streit JR.D.P., Moraes G.V., Ribeiro R.P., Povh J.A., Souza E.D. & Oliveira C.A.L., (2004) Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR* **7**, 157-162.
- Suquet M., Chereguini O., Ommes M.H., Rasines I., Normant Y., Souto I. P. & Quemener L. (1999) Effect of temperature, volume of ova batches, and addition of a diluent, an antibiotic, oxygen and protein inhibitor on short-term storage capacities of turbot, *Psetta maxima*, ova. *Aquatic Living Resources* **12**, 239-246.
- Weingartner M. & Zaniboni Filho E. (2007) Efeito do curto período de estocagem dos ovócitos e tempo de enxágüe da água de ativação dos gametas na reprodução de dourado *Salminus brasiliensis* In: *Congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce*, 1., 2007. Embrapa Pantanal, Dourados.
- Wirtz S. & Steinmann P. (2006) Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology* **68**, 1896-1902.

Woynarovich E. & Horvath L. (1983) *The Artificial Propagation of Warm -Water Finfishes - A Manual for Extension*. Translation by Chama V.L.M. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília.

VII. Motilidade espermática de *Rhamdia quelen* estudada por meio de análise computacional assistida ²

RESUMO

O objetivo deste estudo foi padronizar o método de análise espermática computacional assistida em 14 machos de jundiá, Rhamdia quelen através de softwares livres. Os vídeos da movimentação espermática foram capturados no software AMCAP, a uma taxa de 60 frames por segundo, processados no software VIRTUALDUB e analisados no software IMAGEJ por meio do aplicativo CASA. Os seguintes parâmetros foram analisados: taxa de motilidade espermática, velocidade curvilínea, velocidade média do deslocamento, velocidade em linha reta, linearidade, balanço e frequência de batimentos. Os parâmetros espermáticos foram avaliados em um segundo de imagem nos tempos de 15, 25 e 35 segundos após a ativação espermática. Não foi observado efeito ($P>0,05$) dos tempos após a ativação espermática para a linearidade, contudo, os demais parâmetros avaliados foram influenciados negativamente ($P<0,05$). O aplicativo CASA pode ser empregado para análise espermática em jundiá, atendendo as configurações estabelecidas para a espécie.

Key Words: CASA, espermatozóide, peixe, reprodução, sêmen, velocidade espermática

Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied by means of computer-assisted analysis

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize the method of computer-assisted sperm analysis of 14 jundiá, Rhamdia quelen males through open-source software. The videos of sperm motility were captured in the software AMCAP, at a rate of 60 frames per second, processed in the software VIRTUALDUB and analysed in the software IMAGEJ by means of the application CASA. The following parameters were analysed: sperm motility rate, velocity curvilinear, velocity average path, velocity straight line, linearity, wobble and beat cross frequency. The sperm parameters were evaluated in one second of image, 15, 25 and 35 seconds after sperm activation. No effect ($P>0.05$) of the time elapsed after sperm activation on linearity was observed. However, the other parameters studied were influenced negatively ($P<0.05$). The application CASA may be employed for sperm analysis in jundiá, following the configurations established for the species.

Key Words: CASA, fish, reproduction, semen, spermatic velocity, spermatozoa

² Artigo apresentado nas normas da Revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*

INTRODUÇÃO

A determinação da qualidade espermática de peixes é frequentemente realizada por métodos subjetivos, dentre eles, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são os mais observados, entretanto, estas mensurações têm levantando dúvidas referentes a sua validação, pois, apresentam grandes variações dos valores obtidos e dependem basicamente da experiência de um único observador (Rurangwa et al., 2004). Recentemente, por meio de softwares específicos, as avaliações espermáticas de peixes vem sendo realizadas por meio de programas computacionais tais como, *computer assisted sperm analysis* (CASA) (Ravinder et al., 1997; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007).

A motilidade espermática assistida apresenta importantes implicações, pois, pode desempenhar papel extremamente útil na aquicultura, através da otimização de condições para análises espermáticas, de preservação (Rurangwa et al., 2001), diluição (Ravinder et al., 1997), fertilização (Rurangwa et al., 2004) e indicação de poluição aquática (Kime et al., 2001).

Dificuldades na avaliação da motilidade espermática pelo CASA foram observadas, dentre elas, o curto tempo de motilidade dos espermatozoides após a ativação, alto custo de implantação do sistema e o processo de padronização para as diferentes espécies de peixes teleosteos (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). Assim, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar o método de análise espermática computacional assistida em jundiá (*Rhamdia quelen*) por meio de *software* livre.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), instalado no Centro de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (CPAA), Toledo, Paraná, Brasil (24°46'48.31''S; 53°43'25.77''O).

Foram utilizados 14 machos de jundiá (*Rhamdia quelen*), com médias de peso total de 324,00±73,85 g que, sob leve pressão

abdominal, liberavam sêmen. Individualmente, os machos foram induzidos hormonalmente, com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), com uma dose única de 2,5 mg de EBHC.kg⁻¹ (Bombardelli et al., 2006).

A coleta do sêmen foi realizada após 240 horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo) após indução hormonal. De cada macho foi coletado 4,9±1,4 mL de sêmen, destinados a mensuração da concentração espermática, da motilidade espermática por meio de visualização em microscópio óptico em objetiva de 40X (subjetiva) e a realizada a captura dos vídeos para análise de motilidade pelo método computacional assistido (objetivo).

Para a mensuração da concentração espermática do sêmen foi utilizado o método da contagem de células espermáticas, em câmara hematimétrica de Neubauer, utilizando-se a diluição de 1:1000 (sêmen:formol salino tamponado) (Hilbig et al., 2008).

Para obter a diluição seminal adequada para a captura dos vídeos, o sêmen foi previamente diluído em solução inativadora LATRAAC-N6 (em processo de patente), na proporção de 1:500 (1µL de sêmen:500µL de solução diluidora). O sêmen previamente diluído em LATRAAC-N6 foi diluído em solução ativadora (água) na proporção de 1:3 (100µL de sêmen diluído em LATRAAC-N6:300µL de água doce). A seguir, 10 µL da mistura foi colocada em câmara de Neubauer espelhada (100 µm de profundidade), que foi transferida ao microscópio de luz para a captura dos vídeos.

Para a captura dos vídeos foi utilizada câmera Basler 602fc acoplada a um microscópio triocular Nikon, modelo eclipse (E200) e utilizado um computador com processador intel celerom CPU 2,53 GHz, 1Gb de Ram, 80Gb de HD, sistema operacional Microsoft Windows XP, 2002. Os vídeos foram capturados pelo *software* AMCAP (Basler Vision Technologies) a uma taxa de 60 frames por segundo. Os vídeos foram capturados em formato *.avi, editados no *software* VIRTUALDUB-1.9.0 (virtualdub.org), e exportados como seqüência de imagens em formato *.jpg, para um diretório específico. As imagens correspondentes a um segundo (1seg.) de vídeo foram abertas, editadas no *software* IMAGEJ (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e compiladas por

meio do aplicativo CASA (University of California and Howard Hughes Medical Institute, USA).

O processamento dos vídeos foi realizado baseado na descrição dos componentes necessários para a utilização do aplicativo CASA por meio de software livre: <<http://wilson-leedy.com/CASA/CASA.html>>. A configuração da janela da caixa de diálogo do aplicativo CASA foi realizada baseando-se nas imagens do caminho percorrido pelos espermatozóides gerados pelo aplicativo (Figura 1A). Para validação destas imagens, elas foram comparadas com as imagens geradas pelo software IMAGEJ em *Image/Stacks/Z Project/Projection Type: max intensity* (Figura 1B). Além disso, diferentes configurações foram testadas com intuito de aumentar a capacidade do aplicativo em identificar espermatozóides com movimento lento ou imóveis.

Os espermatozóides considerados com movimento lento ou imóveis apresentaram trajeto em cinza, enquanto que os demais, trajeto em preto. Para tanto, as configurações foram testadas, de modo a produzir gráficos semelhantes (Figura 1A e 1B) e ausentes de trajetos em cinza (Figura 1B).

As análises da motilidade espermática pelo método subjetivo foram utilizadas apenas para padronização das configurações do aplicativo CASA em 15 segundo de ativação espermática.

As configurações que apresentaram taxas de motilidade e trajeto dos espermatozóides semelhantes foram adotadas como padrão para as análises (Figura 1C). As análises de motilidade foram realizadas após 15, 25 e 35 segundos após o início da ativação espermática, com um segundo de vídeo em cada instante. Para o sêmen provenientes de cada macho, as análises foram realizadas em triplicata, sendo avaliadas as taxas de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL – velocidade entre cada frame avaliado), velocidade média do deslocamento (VMD – velocidade entre cada frame utilizando um deslocamento médio na taxa de 1/6 da taxa de frames utilizados), velocidade em linha reta (VLR – velocidade entre o primeiro e o último frame analisado), linearidade (LIN - obtida pela divisão de VLR por VMD), balanço (BAL - obtido pela divisão de VMD por VCL) e frequência de batimentos (FBAT - frequência

que VCL transpõe VMD) e número de espermatozóides monitorados.

Os parâmetros de motilidade espermática computacional foram submetidos à análise de variância a um nível de 5 % de significância. Em caso de evidência de efeito foi aplicado o teste de Tukey ao mesmo nível de significância. O software utilizado para realização das análises estatísticas foi o STATISTICA 7.0[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen de jundiá *Rhamdia quelen* apresentou $4,508 \pm 1,573 \times 10^{10}$ espermatozóides/mL e a diluição seminal final de 1:1500 (sêmen:diluidor+água) resultaram na captura dos vídeos apresentando em média de 43 ± 18 espermatozóides por campo, adequado aos parâmetros de motilidade (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007).

A taxa de motilidade subjetiva em 15 s pós-ativação foi de $59,17 \pm 21,01$ % de espermatozóides móveis.

O tempo após a ativação não influenciou ($P > 0,05$) a linearidade espermática, entretanto, influenciou negativamente ($P < 0,05$) os demais parâmetros espermáticos (Tabela 1).

Redução da qualidade seminal em peixes ao longo do tempo é observada em trabalhos com zebrafish, *Danio rerio* (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007) e carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Ravinder et al., 1997). Isto se deve principalmente ao processo de rápido consumo das reservas energéticas pelos espermatozóides (Billard & Cosson, 1992).

De acordo com Amann and Katz (2004), os primeiros estudos sobre o CASA foram descritos, em meados da década de 80, com análises espermáticas em mamíferos. Em peixes foram registradas somente em meados da década de 90 (Rurangwa et al., 2004), havendo necessidade de padronização e otimização de protocolos específicos para cada espécie de peixe (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007), pois, vários fatores devem receber atenção, como a concentração espermática, profundidade das câmaras e diluidores empregados (Kime et al., 2001; Rurangwa et al., 2004).

Análises rápidas, exatas e objetivas são fundamentais para a determinação da qualidade espermática de peixes, durante o curto período de tempo em que os

espermatozóides apresentam viabilidade. Até o momento, avaliações dos parâmetros de motilidade espermática de espécies de peixes nativos tropicais sul-americanos utilizando-se de análise espermática computacional assistida não foram realizadas. Desta forma, o aplicativo CASA utilizado em *software* livre pode ser uma importante ferramenta em futuras pesquisas relacionadas à reprodução de peixes voltados à qualidade e ao processo de ativação espermática.

Tabela 1. - Parâmetros espermáticos do jundiá (*Rhamdia quelen*) obtidos em um segundo de imagem aos 15, 25 e 35s após ativação espermática

Parâmetros	Tempo após ativação (s)			P*
	15	25	35	
MOT (%)	65,37 ^a	41,10 ^b	26,11 ^c	0,0000
VCL (µm/s)	77,47 ^a	68,36 ^{ab}	65,68 ^b	0,0229
VMD (µm/s)	58,67 ^a	45,96 ^b	42,55 ^b	0,0000
VLR (µm/s)	46,51 ^a	35,75 ^b	35,50 ^b	0,0000
LIN (%)	78,07	78,15	81,73	0,1692
BAL (%)	76,65 ^a	68,62 ^b	60,53 ^c	0,0000
FBAT (Hz)	23,51 ^a	30,99 ^b	34,66 ^b	0,0000

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a um nível de 5% de significância.* Probabilidade obtida na análise de variância. MOT- taxa de motilidade; VCL - velocidade média do deslocamento; VMD - velocidade média do deslocamento; VLR - velocidade em linha reta; LIN - linearidade; BAL - balanço; FBAT - frequência de batimentos.

CONCLUSÃO

Os espermatozóides de jundiá (*Rhamdia quelen*) perdem a viabilidade em função do tempo após o início de sua ativação. O aplicativo CASA pode ser utilizado como um método rápido, exato e objetivo em análises espermáticas de peixes tropicais. A configuração estabelecida para a caixa de diálogo do aplicativo CASA (Figura 1C) pode ser empregada para a análise espermática do jundiá.

REFERÊNCIAS

- Amann, R. P. and Katz, D. F. (2004) Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, **25**, 317-325.
- Billard, R. and Cosson, M. P. (1992) Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *The Journal of Experimental Zoology*, **261**, 22-31.
- Bombardelli, R. A.; Mörschbacher, E. F.; Campagnolo, R.; Sanches, E. A. and Syperreck, M. A. (2006) Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, **35**, 1251-1257.
- Coward, K., Bromage, N. R., Hibbitt, O. and Parrington, J. (2002) Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **12**, 33-58.
- Hilbig, C. C.; Bombardelli, R. A.; Sanches, E. A.; Oliveira, J. D.; Baggio, D. M. and Souza, B.E. (2008) Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, **30**, 217-224.
- Kime, D. E.; Van Look, K. J. W.; Mcallister, B. G.; Huyskens, G.; Rurangwa, E. and Ollevier, F. (2001) Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **130**, 425-433.
- Ravinder, K.; Nasaruddin, K.; Majumdar, K.C. and Shivaji, S. (1997) Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology*, **50**, 1309-1328.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. and Nash, J. P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, **234**, 1-28.
- Rurangwa, E.; Volckaert, F. A. M.; Huyskens, G.; Kime, D. E. and Ollevier, F. (2001) Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, **55**, 751-769.
- Wilson-Leedy, J. G. and Ingermann, R. L. (2007) Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, **67**, 661-672.

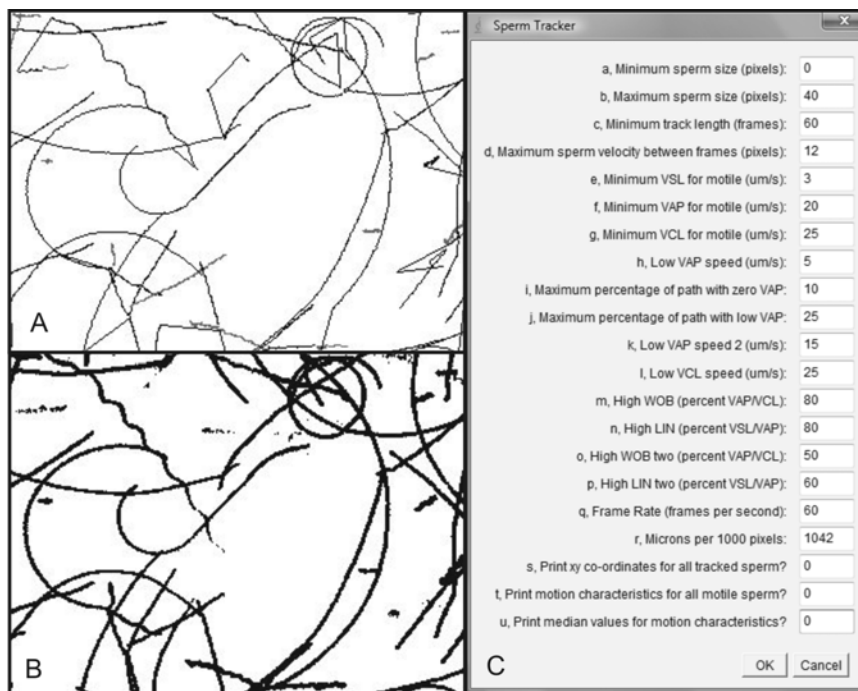


Figura 1 - Imagem do caminho percorrido pelos espermatozóides gerados pelo aplicativo CASA (A) e gerados pelo *software* IMAGEJ (B). Janela da caixa de diálogo gerado pelo aplicativo CASA dentro do *software* IMAGEJ com as configurações usadas em análises de motilidade espermática de jundiá (*Rhamdia quelen*) (C)

VIII. Período de estocagem e temperatura sobre os parâmetros espermáticos de jundiá, *Rhamdia quelen* avaliados por análise computadorizada³

Resumo

O objetivo foi avaliar os parâmetros espermáticos de sêmen de *R. quelen* estocado em curtos períodos sob diferentes temperaturas. Foram utilizados 15 machos em um delineamento experimental fatorial no tempo (13×3×3×3). O sêmen foi mantido às temperaturas: 15; 25 e 35°C e submetidos à ativação com água a temperaturas de: 15; 25 e 35°C cada, respectivamente, nos períodos de estocagem de: 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 32; 40 e 48 horas pós-coleta. Os tratamentos foram realizados em triplicata e em protocolos sequenciais a cada 50 horas. Os parâmetros de motilidade avaliados foram submetidos às análises de correlação (Pearson) e os parâmetros significativos ($P < 0,05$) foram sumarizados pela análise de componentes principais formando dois grupos de dados preditos. O grupo 01 foi composto pelos parâmetros: velocidade curvilínea, balanço, linearidade e o grupo 02 por: velocidade média de deslocamento, velocidade em linha reta, frequência de batimentos, taxa de motilidade. Observou-se efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos somente para o grupo 02, com interação entre tempo e temperatura de exposição e entre tempo de exposição e temperatura da água. Resultados superiores dos parâmetros espermáticos do grupo 02 foram observados imediatamente após a coleta. Entretanto, a exposição e a ativação espermática a 15°C permitiu resultados significativos em 48 horas pós-coleta quando comparados à 25 e 35°C.

Palavras-chave: CASA, conservação de gametas, espermatozóide, motilidade espermática, peixe, reprodução artificial

³ Artigo apresentado nas normas da Revista *Aquaculture Research*

Storage period and temperature about spermatic parameters of jundiá, *Rhamdia quelen*, evaluated by computer assisted analysis

Abstract

The aim was verify the interference of different temperatures during *R. quelen* sperm storage for short-term. 15 males were used in a time factorial experimental design (13×3×3×3). The semen was exposed to temperatures: 15, 25 and 35 °C and subjected to activation with water at 15, 25 and 35 °C each, in periods of storage for 0, 2, 4, 6, 8 , 10, 12, 16, 20, 24, 32, 40 and 48 hours pós-collection. The treatments were performed in triplicate and sequencing protocols for each 50 hours. The motility parameters evaluated were submitted to correlation (Pearson) analysis and the significant parameters (P<0.05) were summarized by principal components analysis, forming two groups of predicted data. The group 01 was composed by: velocity curvilinear, wobble, linearity and the group 02 by: velocity average path, velocity straight line, beating cross frequency, motility rate. Effect (P<0.05) of treatments only for group 02 was observed, with interaction between time and temperature of exposure and between exposure time and water temperature. Higher results of sperm parameters in group 02 were observed immediately after collection. However, the exposure and sperm activation at 15 °C allowed significatived results in 48 hours pós-collection when compared to 25 and 35 °C.

Key words: artificial reproduction, CASA, fish, gamets conservation, spermatic motility, spermatozoa

Introdução

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) pertence à família Heptapteridae da ordem Siluriforme (Bockmann & Guazzelli, 2003). É amplamente distribuída nas bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (Froese & Pauly, 2009). É uma espécie nativa bem adaptada à criação e de boa aceitação no mercado consumidor (Marchioro & Baldisserotto, 1999). Em sistemas de cultivo intensivo, apresenta conversão alimentar em torno de 1,8, aceita bem o manejo periódico e não cessa o crescimento no inverno (Fracalossi et al., 2004), além disso, responde positivamente ao processo de indução hormonal (Sampaio & Sato, 2006; Carneiro & Mikos, 2008).

O controle do processo reprodutivo é fundamental para a atividade aquícola que se encontra em plena expansão (Scorvo, 2008). Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental, é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Para tal, deve-se utilizar gametas masculinos e femininos de qualidade promovendo máxima fertilização e, subsequentemente, desenvolvimento normal do embrião (Bobe & Labbé, 2009).

Os espermatozoides podem ser avaliados por meio de características que podem ser correlacionadas às taxas de fertilização (Flogli da Silveira et al., 1988; Billard et al., 1995), sendo que, um dos parâmetros comumente utilizados na determinação da viabilidade espermática é a motilidade espermática (Billard & Cosson, 1992; Rurangwa et al., 2004).

De um modo geral, encontram-se poucas informações na literatura mencionando o tempo de viabilidade dos gametas de espécies de peixes tropicais, entretanto, recomenda-se a rápida homogeneização dos gametas (fertilização artificial, por extrusão), pois, os ovócitos e o sêmen perdem gradativamente sua viabilidade, sendo necessário a utilização de métodos que

garantam a longevidade dos gametas, visando também, à otimização do uso dos reprodutores e, técnicas que permitam a máxima eficiência deste processo (Rurangwa et al., 2004).

As técnicas de preservação tem por objetivo aumentar a longevidade dos gametas através de estocagem em baixas temperaturas (Rana, 1995). Entretanto, apesar de importantes implicações na preservação da biodiversidade genética (Carolsfeld et al., 2003), a criopreservação do sêmen de peixes apresenta limitações nas produções quando em larga escala. Portanto, estudos relacionados a preservação do sêmen por curtos períodos em temperaturas próximas a zero (Carneiro et al., 2007; Bobe & Labbé, 2008) são imprescindíveis. A conservação a curto prazo pode ser realizada em condições de assincronismo de reprodutores ocorrida durante o início e o final da estação reprodutiva, ou durante o processo ovulação em desova induzida (Rana, 1995; Marques & Godinho, 2004; Romagosa, 2006). Além disso, uma das vantagens na sua utilização é o baixo custo, por não necessitar de soluções crioprotetoras, possibilitar o resfriamento em temperaturas de refrigeração, facilitar o manejo reprodutivo e aumentar a eficiência da reprodução artificial (Bobe & Labbé, 2008; Cloud & Patton, 2008).

A reprodução de peixes nativos sul-americanos se baseia na fertilização artificial pelo método a “seco”, que consiste na extrusão e homogeneização dos gametas na ausência de água e, em seguida, adiciona-se água para ocorrer à ativação dos espermatozóides e fertilização dos ovócitos (Woynarovich & Horváth, 1983; Kinsey et al., 2007). Durante este procedimento, os gametas estão vulneráveis aos efeitos da temperatura, tanto do ambiente quanto da água, entretanto, o conhecimento destes efeitos ainda é limitado.

O presente trabalho pretendeu avaliar por meio de análise espermática computadorizada os parâmetros espermáticos de sêmen de *R. quelen* estocado em curtos períodos, sob diferentes temperaturas e posteriormente submetido à ativação dos espermatozóides com água em diferentes temperaturas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAC) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), instalado no Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental (CPAA) em Toledo, Paraná, Brasil (24°46'48.31''S; 53°43'25.77''O).

Na estação reprodutiva (outubro - fevereiro), foram selecionados 15 machos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Apêndice A, Fig.1) aptos à reprodução, observando-se sêmen fluindo sob leve compressão abdominal. Estes peixes apresentaram médias de peso total de $315,8 \pm 65,4$ e, foram mantidos em caixas retangulares (1000 L), dotadas de circulação de água até o momento da coleta dos gametas.

Foram induzidos hormonalmente através da aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), conforme a metodologia preconizada por Woynarovich e Horváth, (1983), com uma dosagem única de $2,5 \text{ mg de EHC.kg}^{-1}$ de reprodutor, na região dorso, intramuscular (Bombardelli et al., 2006) (Apêndice A, Fig.2).

A coleta dos gametas foi realizada após um período de 240 horas - grau (somatória da temperatura da água em função do tempo), sendo registradas a partir da aplicação hormonal.

Para a coleta do sêmen, os jundiás foram contidos e secos (panos e papel toalha), individualmente, massageados na região abdominal no sentido céfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação com urina, o restante do sêmen foi coletado (tubo de ensaio graduado, $\pm 0,1 \text{ mL}$) (Apêndice B, Fig.1). De cada reprodutor foi coletado 5,0 mL de sêmen. Porções de sêmen que apresentaram sinais de sangramento foram descartadas, evitando-se assim qualquer influência no momento da avaliação da qualidade espermática.

O sêmen foi homogeneizado, originando-se um “pool” de sêmen proveniente de cinco machos utilizados em cada ensaio experimental. Foram feitas análises de concentração espermática e dos parâmetros espermáticos por meio de análise computadorizada conforme Wilson-Leedy & Ingermann (2007). Os parâmetros espermáticos avaliados foram: taxas de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL – velocidade entre cada frame avaliado), velocidade média do deslocamento (VMD – velocidade entre cada frame utilizando um deslocamento médio na taxa de 1/6 da taxa de frames utilizados), velocidade em linha reta (VLR – velocidade entre o primeiro e o último ponto analisado), linearidade (LIN - obtida pela divisão de VLR por VMD), balanço (BAL - obtido pela divisão de VMD por VCL) e frequência de batimentos (FBAT - frequência que VCL transpõe VMD).

Para mensuração da concentração espermática foi utilizada uma amostra 5 μL do sêmen, diluída em 5000 μL de formol salina tamponado (Streit Jr. et al., 2004), resultando em uma diluição de 1:1000. Uma câmara hematimétrica de Neubauer (espermatozoides. mL^{-1}) foi utilizada para a contagem de células espermáticas.

A aplicação das análises espermáticas computadorizadas foram realizadas por meio da avaliação de 1 segundo de imagem de movimentação espermática entre 15 e 16 segundos após a ativação. Os vídeos foram capturados no *software* AMCAP (Basler Vision Technologies), a uma taxa de 60 frames por segundo, processados no *software* VIRTUALDUB (virtualdub.org) e analisados no *software* IMAGEJ (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) por meio do aplicativo CASA (University of California e Howard Hughes Medical Institute, <http://wilson-leedy.com/CASA/index.html>). Para tanto, o sêmen foi previamente diluído em solução inativadora LATRAAC-N6 (em processo de patente), na proporção de 1:500 (1 μL de sêmen:500 μL de solução diluidora). O sêmen previamente diluído em LATRAAC-N6 foi submetido a uma nova diluição de 1:3 (100 μL de sêmen diluído em LATRAAC-N6:300 μL de água). A seguir, 10 μL da mistura foi

colocada em câmara de Neubauer espelhada (100 μm de profundidade), que foi transferida ao microscópio para a captura do vídeo.

Foi utilizado um delineamento experimental fatorial no tempo de $13 \times 3 \times 3 \times 3$. Os tratamentos foram constituídos pela manutenção do sêmen nas temperaturas de: 15; 25 e 35 °C e, ainda ativados com água a uma temperatura de 15; 25 e 35°C cada, respectivamente, nos períodos de estocagem (tempos) de: 0 (controle); 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 32; 40 e 48 horas pós-coleta. Os tratamentos foram realizados em triplicata e em protocolos seqüenciais a cada 50 horas. Em cada protocolo o sêmen proveniente de cinco machos, foi exposto em seu determinado período de tempo *versus* temperatura seqüencialmente *versus* temperatura da água (Tab. 1).

Tabela 1. Disposição das unidades experimentais de uma réplica, em função da combinação dos fatores experimentais (temperatura de exposição do sêmen *versus* temperatura da água *versus* tempo pós-coleta para a ativação espermática de jundiá, *Rhamdia quelen*)

Protocolo de ativação espermática									
TSA (°C)	15			25			35		
MES(min.)/ TES (°C)	15	25	35	15	25	35	15	25	35
0	-	x	-	-	x	-	-	x	-
2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x
24	x	x	x	x	x	x	x	x	x
32	x	x	x	x	x	x	x	x	x
40	x	x	x	x	x	x	x	x	x
48	x	x	x	x	x	x	x	x	x

TSA – Temperatura da solução ativadora (°C); TES – Temperatura de exposição do sêmen (°C); MES – Minutos de exposição do sêmen; x - combinação dos fatores experimentais utilizado em cada unidade experimental.

O “pool” de sêmen (0,1 mL) dos cinco reprodutores foi transferido em ependorfs (1,5 mL) e, posteriormente, submetidos aos sistemas de aquecimento e resfriamento dotados de termostato ($\pm 1^\circ\text{C}$) (Apêndice B, Fig.3). Em cada protocolo foi utilizado 111 ependorfs contendo 0,1 mL de sêmen (Apêndice B, Fig.2), sendo considerado como uma unidade experimental um ependorf individual. As avaliações foram realizadas em laboratório climatizado, com a temperatura ambiente controlada em 25°C .

A água utilizada para a ativação espermática foi proveniente de um poço artesiano da estação de pesquisa apresentando características físico-químicas correspondentes a 6,8 de pH, $4,26 \text{ mg L}^{-1}$ oxigênio dissolvido, $0,29 \text{ mg L}^{-1}$ nitrato, $0,0038 \text{ mg L}^{-1}$ nitrito, $0,126 \text{ mg L}^{-1}$ amônia, dureza $43,96 \text{ mg L}^{-1}$ e alcalinidade da água $996,30 \text{ mEq L}^{-1}$.

Os parâmetros espermáticos foram submetidos à análise de correlação (Pearson) ao nível de 5 % de significância. Os parâmetros que apresentaram altas correlações foram sumarizados pela análise de componentes principais (*principal components analysis – PCA*) e, submetidos à análise de regressão do modelo de superfície de resposta do *software Statistica*© (Statsoft, 2005).

As possíveis influências do tempo de exposição (T), temperatura de exposição (TE) e temperatura da solução ativadora (TA) sobre as variáveis respostas (VR) foram avaliadas através do modelo de superfície de resposta:

$$\text{VR} = \partial_0 + \partial_1\text{T} + \partial_2\text{TE} + \partial_3\text{TA} + \partial_4(\text{T} * \text{TE}) + \partial_5(\text{T} * \text{TA}) + \partial_6(\text{TE} * \text{TA}) + \partial_7(\text{T})^2 + \partial_8(\text{TE})^2 + \partial_9(\text{TA})^2 + \partial_{10}\text{B} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

onde: ∂_i = constantes; **B** = efeito do bloco; $\boldsymbol{\varepsilon}$ = erro com $\sim N(0, \sigma^2)$

Os parâmetros de ordens superiores não significativos ($P > 0,05$) foram removidos progressivamente pelo método *backward stepwise*. Os pressupostos foram checados nos resíduos conforme sugerido por Myers (1990).

Em caso de efeito significativo do modelo de superfície de resposta, realizou-se a plotagem do gráfico em 3D. Acima da representação deste gráfico em projeção 2D, realizou-se a plotagem da linha de máximo, obtida através das derivadas parciais (Quinn & Keough, 2002) do modelo estatístico em relação às variáveis significativas. A linha de máxima consiste na representação gráfica esperada para os máximos valores das variáveis respostas.

Resultados e Discussão

O sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen* apresentou $6,08 \pm 1,34 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹. Esta concentração foi semelhante à encontrada por Borges et al. (2005) para a mesma espécie com variações de $5,0 \pm 1,2 \times 10^{10}$ a $6,6 \pm 3,6 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹ de sêmen. Este parâmetro permite maximizar o aproveitamento do material fertilizante e, obter melhores taxas de fertilização (Bombardelli et al., 2006).

A Tabela 2 mostra que as taxas de correlação entre os parâmetros espermáticos apresentaram dois grupos distintos: (01) velocidade curvilínea (VCL), balanço (BAL) e linearidade (LIN); e, (02) taxas de motilidade espermática (MOT), velocidade média do deslocamento (VMD), velocidade em linha reta (VLR) e, frequência de batidas (FBAT). A formação de dois grupos de componentes principais também foi verificada por Martínez-Pastor et al. (2008) para os parâmetros espermáticos computadorizados de “Senegalese sole” *Solea senegalensis*. Esta metodologia permite sumarizar os parâmetros espermáticos .

Não foi observado efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos para o grupo 01, entretanto, para o grupo 02 foi observado interação entre as variáveis, tempo e temperatura de exposição (Fig. 1) e, tempo de exposição e temperatura da água (Fig. 2). O efeito interativo está representado por meio do gráfico de superfície de resposta, utilizando-se para a plotagem a temperatura da água (Fig. 1) e a temperatura de exposição (Fig. 2) com média de 25 °C

Os maiores valores do grupo 02 foram observados em temperatura de exposição do sêmen à 15°C (Fig. 1) e temperatura da água empregada na ativação de 15°C (Fig. 2). Apesar disso, temperaturas inferiores indicam melhores resultados teóricos (Figs. 1 e 2). Como não houve efeito interativo entre as temperaturas de exposição e da água de ativação, pode-se inferir que o choque térmico não atuou na movimentação espermática.

Tabela 2 Correlação entre os parâmetros espermáticos de jundiá, *Rhamdia quelen* avaliados e os grupos formados pela análise de componentes principais

Parâmetros	VCL	BAL	LIN	VMD	VLR	FBAT	MOT	GRUPO 1	GRUPO 2
VCL	1,00000	-0,65098	-0,61833	0,48868	0,01986	-0,20122	-0,02023	-0,94245	0,33157
BAL	-0,65098	1,00000	0,60819	0,20323	0,53548	-0,31340	0,36840	0,85746	0,41918
LIN	-0,61833	0,60819	1,00000	-0,11499	0,47767	0,07557	0,10265	0,71740	0,08438
VMD	0,48868	0,20323	-0,11499	1,00000	0,67706	-0,64761	0,44921	-0,21450	0,95115
VLR	0,01986	0,53548	0,47767	0,67706	1,00000	-0,54217	0,49115	0,27261	0,82939
FBAT	-0,20122	-0,31340	0,07557	-0,64761	-0,54217	1,00000	-0,53154	-0,02126	-0,73221
MOT	-0,02023	0,36840	0,10265	0,44921	0,49115	-0,53154	1,00000	0,20297	0,56132

Valores em negrito: ($P < 0,05$). MOT: taxas de motilidade espermática; VMD: velocidade média do deslocamento; VLR: velocidade em linha reta; BAL: balanço; FBAT: frequência de batidas; VCL: velocidade curvilínea; LIN: linearidade; **GRUPO 1**: Grupo de dados que representa os parâmetros VCL, BAL e LIN; **GRUPO 2**: Grupo de dados que representa os parâmetros VMD, VLR, FBAT e MOT.

Os parâmetros espermáticos avaliados no momento imediato após a coleta e 48 horas pós-coleta nas temperaturas de exposição de 15 e 25°C estão apresentados na Tabela 3. Para a exposição a 35°C os espermatozóides perderam a motilidade após 10 horas da coleta.

Tabela 3 Média dos parâmetros espermáticos observados em jundiá, *Rhamdia quelen* imediatamente após a coleta (inicial) e 48 horas pós-coleta nas temperaturas de 15 e 25°C.

Parâmetros	Início	48 horas pós-coleta	
		15°C	25°C
Taxa de motilidade espermática (%)	71,23±12,01	34,13±8,72	21,11±8,59
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	89,25±22,37	88,40±29,76	112,81±33,29
Velocidade média de deslocamento ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	56,51±8,21	45,74±7,82	42,03±5,55
Velocidade em linha reta ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	42,25±5,94	33,46±3,77	25,67±7,20
Linearidade (%)	75,09±6,72	73,78±5,93	60,82±13,22
Balanço (%)	65,21±9,45	52,93±12,59	40,30±13,50
Frequência de batidas (Hz)	25,37±3,09	31,73±4,23	31,93±1,78

Correlações positivas entre as taxas de motilidade espermática, VCL, VMD e VLR com as taxas de eclosão dos ovos foram observadas por Rurangwa et al. (2001) para o bagre-africano, *Clarias gariepinus* indicando que quanto maior a motilidade e velocidade espermática, maior é a capacidade de fertilização do espermatozóide. Além disso, os autores observaram correlação positiva tanto para o sêmen fresco quanto para o resfriado após dois dias a 4 °C. Estas correlações indicam que apesar de ocorrer redução da qualidade após estocagem, o sêmen pode ser utilizado para a fertilização dos ovócitos, entretanto, deve-se empregar um maior número de espermatozóide por ovócito para haver melhor aproveitamento dos gametas.

Os valores obtidos da VCL, VMD e VLR para o jundiá, *Rhamdia quelen* no momento imediato pós-coleta (Tabela 3) foram semelhantes aos do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, por Rurangwa et al. (2001), com aproximadamente 55 $\mu\text{m.s}^{-1}$, 45 $\mu\text{m.s}^{-1}$ e 40 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VCL, VMD, VLR, respectivamente. Para a carpa-comum, *Cyprinus carpio*, Toth et al. (1995) registraram 130 $\mu\text{m.s}^{-1}$ e 210 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VLR e VCL e, Christ et al. (1996) obtiveram 142-193 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VCL e 64-129 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VLR. Para o zebrafish, *Danio rerio*, Wilson-Leedy & Ingermann (2007) observaram 90±6 % de espermatozoides móveis, 104±9 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VCL, 77±15 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VMD, 66±17 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de VLR, 84±10% de LIN e 74±10 de BAL (representado pelo nome *straightness* -STR).

A(s) análise(s) espermática(s) computadorizada(s) pode(m) ser fundamenta(is) na atividade aquícola, otimizando às condições de coleta, estocagem e aproveitamento racional da fertilização artificial, além de ser um método rápido, objetivo e preciso, (Ravinder et al., 1997; Kime et al., 2001). Devido à sua aplicabilidade e baixos custos de implantação (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007), o aplicativo CASA utilizado em *software* livre é uma ferramenta que poderá auxiliar futuras pesquisas relacionadas à reprodução de peixes voltados principalmente, à qualidade e ao processo de ativação espermática.

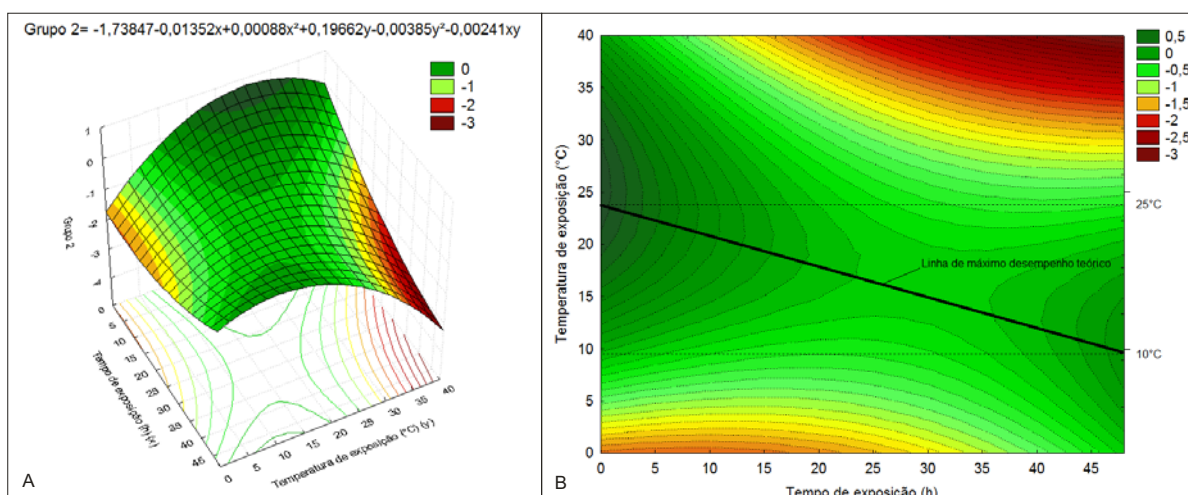


Figura 1 Representação gráfica em 3D (A) e em 2D (B) do efeito interativo entre o tempo e temperatura de exposição sobre o grupo 2 (velocidade média do deslocamento, velocidade em linha reta, frequência de batidas e taxa de motilidade espermática) do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*)

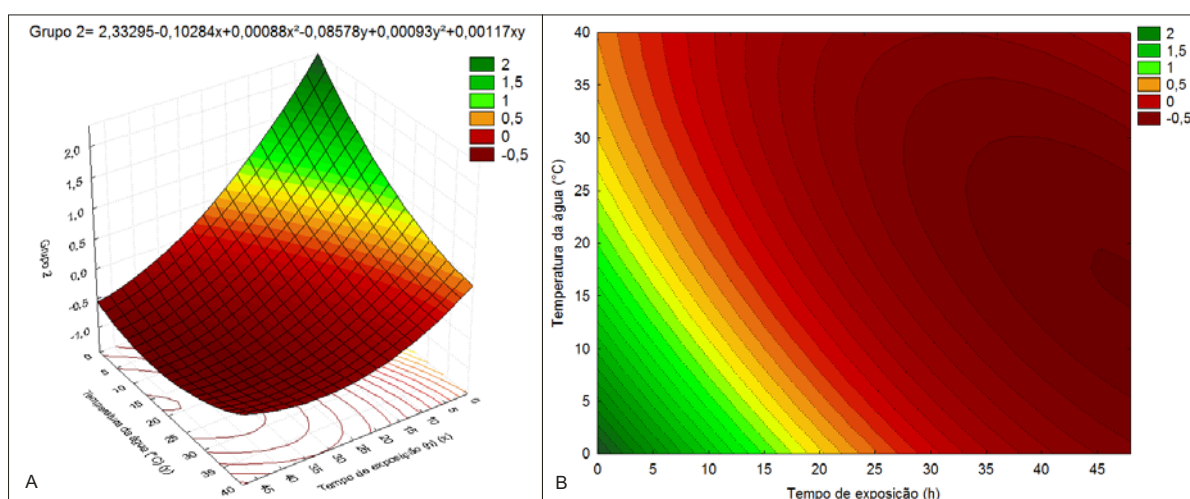


Figura 2 Representação gráfica em 3D (A) e em 2D (B) do efeito interativo entre o tempo de exposição e temperatura da água sobre o grupo 2 (velocidade média do deslocamento, velocidade em linha reta, frequência de batidas e taxa de motilidade espermática) do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*)

Observou-se que na medida em que o tempo de estocagem aumentou, ocorreu a redução dos valores de temperatura em que o sêmen foi submetido (Fig. 1). Os melhores resultados dos parâmetros espermáticos do grupo 2 ocorreram no momento imediato à coleta, com médias de temperatura de exposição de 25 °C e, após 48 horas cujos valores da temperatura teórica foram de aproximadamente 10 °C. Esta redução dos valores de temperatura pode ser

determinada através do gradiente de redução de temperatura de exposição na taxa teórica de $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$.

Trabalhos sobre conservação a curto prazo de sêmen de peixes nativos foram realizados por Marques & Godinho (2004), estudando o comportamento do sêmen de seis espécies de peixes tropicais em relação à exposição em dois recipientes (sacos e tubos plásticos) e, com presença de oxigênio ou ar em temperaturas variando entre $1,7 - 4,9^{\circ}\text{C}$. Observaram o efeito do oxigênio, apenas para o curimatá-pacu *Prochilodus marggravii*, com maiores motilidades após 6 h de estocagem em sacos de plástico. Entretanto, para o sêmen de piau-três-pintas *Leporinus friderici* e piapara *Leporinus elongatus* a motilidade espermática foi ao redor de 30% com 7-8 h, matrinhã *Brycon lindii* a 30% após 14 h, pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* e curimbatá *Prochilodus lineatus* entre 19-20 h com motilidade ao redor de 40%. s Confirmam também, que com a aplicabilidade do resfriamento do sêmen obtiveram taxas de fertilização dos ovos de 88-90% com sêmen de *P. marggravii* após 8 h de estocagem.

Carneiro et al. (2006) ao exporem sêmen de jundiá em refrigerador doméstico em temperatura de $5,7^{\circ}\text{C}$, observaram que a motilidade espermática permaneceu por 12 dias, entretanto, ocorreu redução após o 8º dia de exposição. Verificaram também, redução do índice de sobrevivência espermática a partir do 5º dia de exposição reduzindo de 74,5 % (inicial) para 15,5% no 12º dia de exposição. Além disso, os autores revelam a aplicabilidade da técnica de conservação de sêmen de jundiá a curto prazo, mostraram que o sêmen após o 12º dia de exposição apresentou taxas de fertilização $\geq 50\%$. Borges et al. (2005) observaram que, em ambientes a 24°C , o sêmen de jundiá mostrou valores de viabilidade semelhantes durante 2 h. Luz et al. (2001) observaram que o sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* pode ser exposto durante 6 h a 25°C permanecendo viável.

A utilização de diluidores específicos também garante o sucesso no resfriamento do sêmen de peixes a curto prazo. Para a piapara, *Leporinus obtusidens*, Murgas et al. (2002),

observaram que a utilização do diluidor *Beltsville Thawing Solution* -BTS[®], juntamente com o DMSO (dimetilsulfóxido) a 10% promove um bom meio para a conservação do sêmen, observando motilidade de 58% quando ativados com bicarbonato de sódio 1%, após 120 h de exposição à 4°C. Franciscatto et al. (2002) observaram motilidade de 58% do sêmen de curimba, *Prochilodus lineatus* utilizando diluidores BTS[®] 5% + KI 0,16% após 168 h à 4°C.

Murgas et al. (2004) testaram três diferentes diluidores contendo BTS[®] e, verificaram que, após 144 horas de resfriamento a 4°C, ocorreu a redução de aproximadamente 20% da motilidade inicial (82%) e, com redução de aproximadamente 10 s do tempo de duração da motilidade espermática de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*.

Oliveira et al. (2007) confirmaram que o sêmen de pirapitinga, *Brycon nattereri* apresentou redução nos valores de motilidade somente após o segundo dia de exposição in natura à 4-6°C, mas quando diluído em BTS[®], após o sétimo dia de exposição, apresentou 48% de motilidade.

Para a carpa-comum, *Cyprinus carpio*, Ravinder et al., (1997) observaram que durante 24 h o sêmen estocado a 5 °C não perdeu a motilidade quando estocados em soluções tampão de pH 6 ou 9. Observaram também diferentes movimentações espermáticas: circular, linear e errática. Nestas movimentações observaram maiores velocidades curvilínear (VCL), média de deslocamento (VMD) e em linha reta (VLR), linearidade (LIN) frequência de batidas (FBAT) em espermatozóides com movimento linear.

Rurangwa et al. (2001) observaram redução das taxas de motilidade espermática do sêmen de bagre-africano, *Clarias gariepinus*, após dois dias resfriado a 4°C. Para os parâmetros VCL, VMD e VLR estes autores observaram menores valores após o 2º dia de estocagem a 4C.

Observou-se que o sêmen de jundiá é mais sensível às temperaturas elevadas (Figs 1 e 2), provavelmente, devido ao aumento das taxas metabólicas das células espermáticas em

altas temperaturas (Billard et al., 1995), ou talvez, à maior colonização de bactérias nestas condições, pois, a perda da motilidade em peixes está diretamente relacionada com o aumento de bactérias presentes no sêmen (Jenkins & Tiercsh, 1997; Isaú, 2006). A correlação inversamente proporcional entre a taxa de motilidade e o número de bactérias verificadas no sêmen resfriado foi observada por Isaú (2006) para o sêmen de piracajuba, *Brycon orbignyana* resfriado entre 4-6°C. Observou também que, a concentração do antibiótico getamicina acima de 0,1 mg.mL⁻¹ de solução de Saad (NaCl 200 mM, Tris 30mM,) para a diluição seminal apresentou os melhores valores de motilidade espermática após 6 dias de estocagem e, com taxas de fertilização acima de 80%. Além disso, o pH do sêmen *in-natura* submetido ao resfriamento diminuiu simultaneamente com a redução da motilidade, indicando que a redução do pH pode afetar a motilidade espermática pós-coleta (Isaú, 2006).

Além da redução da motilidade espermática, Jenkins & Tiercsh (1997) observaram aumento de alterações morfológicas em espermatozoides do bagre-do-canal, *Ictalurus punctatus* e aumento do número de bactérias. Além da utilização de antibióticos, outros cuidados na coleta do sêmen, devem ser evitados como, contato com a urina, material fecal, sangue, muco e água, auxiliam na diminuição do número de unidades formadoras de colônias de bactérias aumentando o tempo de sobrevivência espermática pós-coleta (Maria et al., 2006).

Alavi & Cosson (2005) sugerem mudanças da motilidade espermática em função da temperatura da água. Aparentemente, altas temperaturas proporcionam em algumas espécies de peixes uma redução do tempo total de motilidade, no entanto, esta redução é compensada por uma maior velocidade quando comparada à temperaturas mais baixas, portanto, maior duração da motilidade. Relatos justificam que o comportamento dos espermatozoides provavelmente, seja atribuído a recursos energéticos limitados e, no momento da ativação, seu metabolismo pode ser influenciado por fatores, como a temperatura. Este efeito também foi evidenciado em espermatozoides de truta arco-íris, onde o aumento da temperatura da água

provocou redução da taxa de motilidade, aumento da frequência de batimentos e redução gradual do tempo de duração (Billard & Cosson, 1992). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que governam a atividade dos espermatozóides de peixes, podendo ser dependentes das estratégias reprodutivas adotadas (fertilização externa ou interna), estrutura e tipo dos ovos (± 1 mm), entre outras (Cabrita et al., 2008)

As Figuras 1 e 2 revelam que a técnica de conservação do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*, a curto prazo é uma alternativa simples, e tecnicamente de fácil aplicação em sistemas comerciais de criação.

Conclusões

A temperatura (exposição e ativação) que proporcionaram melhores movimentações espermáticas ao longo do tempo de estocagem foi de 15°C. Os parâmetros que apresentam correlação (Pearson) significativa podem ser sumarizados pela análise de componentes principais.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa (mestrado), à Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP). Em especial ao Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana da UNIOESTE pelo auxílio nas análises estatísticas.

Referências

Alavi S.M.H. & Cosson J. (2005) Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* **29**, 101-110.

- Babin P. J., Cerdà J. & Lubzens E. (2007) *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Springer. The Netherlands, 508 p.
- Billard R. & Cosson M.P. (1992) Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *The Journal of Experimental Zoology* **261**, 22-31.
- Billard R., Cosson J., Crim L.W. & Suquet M. (1995) Sperm physiology and quality. In: *Broodstock management and egg and larval quality* (ed. By N.R. Bromage, & R.J. Roberts, orgs.) p.25–52. Blackwell Science, London.
- Bobe J. & Labbé C. (2008) Chilled storage of sperm and eggs. In: *Methods in reproductive aquaculture. Marine and Freshwater Species* (ed. By E. Cabrita, V. Robles & P. Herráez, orgs.) p. 219-234. CRCPress, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Bobe J. & Labbé C. (2009) Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011
- Bockmann F.A. & Guazzelli G.M. (2003) Heptapteridae. In: *Check List of Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)* (ed. by R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr, orgs.), pp.406-431. Edipucrs, 1^a ed., PortoAlegre.
- Bombardelli R.A., Mörschbacher E.F., Campagnolo R. Sanches E.A. & Syperreck M.A. (2006) Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**,1251-1257.
- Borges A., Siqueira D.R., Jurinitz D.F., Zanini R., Amaral F., Grillo M.L., Oberst E.R. & Wassermann G.F. (2009) Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry* **31**. 45-53.
- Cabrita E., Robles V. & Herráez P. (2008) Sperm quality assessment. In: *Methods in reproductive aquaculture. Marine and Freshwater Species* (ed. By E. Cabrita, V. Robles & P. Herráez, orgs.) p. 93-148. CRCPress, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

- Carneiro P.C.F. & Mikos J.D. (2008) Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Scientiarum. Animal Science* **30**, 345-350.
- Carneiro P.C.F. (2007) Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **31**, 361-366.
- Carneiro P.C.F., Segui M.S., Ióris Filho C.R. & Mikos J.D. (2006) Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Revista Acadêmica* **4**, 11-16.
- Carolsfeld J., Godinho H. P., Zaniboni Filho E. & Harvey B. J. (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* **63**, 472-489.
- Christ S.A., Toth G.P., McCarthy H.W., Torsella J.A. & Smith M.K. (1996) Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). *Journal of Fish Biology* **48**, 1210-1222.
- Cloud J. & Patton S. (2008) Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. In: *Methods in reproductive aquaculture. Marine and Freshwater Species* (ed. By E. Cabrita, V. Robles & P. Herráez, orgs.) p. 235-250. CRCPress, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Fogli da Silveira W., Kavamoto E.T., Rigolino M.G. & Tabata Y.A.O. (1998) Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. *Boletim do Instituto de Pesca* **15**, 51-54.
- Fracalossi D.M., Meyer G., Santamaria F.M., Weingartner 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. Animal Sciences* **26**, 345-352.
- Franciscatto R.T. Murgas L.D.S., Miliorini A.B., Logato P.V.R. & Silva M.O.B. (2002) Viabilidade espermática e taxa de fertilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus*

- lineatus*) resfriado a 4°C. In: *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura* (ed. by E.C. Urbinati & J.E.P. Cyrino, orgs.). v.2, pp.127-134, AQUABIO, Jaboticabal.
- Froese R. & Pauly D. (2009). *FishBase: World Wide Web electronic publication*. <<<http://www.fishbase.org>>>. Access in: 27/04/2009.
- Hilbig C.C., Bombardelli R.A., Sanches E.A., Oliveira J.D., Baggio D.M. & Souza B.E. (2008) Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). *Acta Scientiarum, Animal Sciences* **30**, 217-224.
- Isaú Z.A. (2006) *População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba Brycon orbignyanus (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento*. Lavras/MG/BR Universidade Federal de Lavras. 94p. Thesis (Medicine Veterinary Mastership).
- Jenkins J.A. & Tiersch T.R. (1997) A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* **28**, 282-288.
- Kime D.E., Van Look K.J.W., Mcallister B.G., Huyskens G., Rurangwa E. & Ollevier F. (2001) Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **130**, 425-433.
- Kinsey W.H., Sharma D. & Kinsey S.C. (2007) Fertilization and egg activation in fishes. In: *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications* (ed. By P.J. Babin, J. Cerdà & E. Lubzens, orgs.) p. 397-410, Springer. The Netherlands
- Luz R.K., Ferreira A.A., Reynalte-Tajate D.A. & Zaniboni Filho E. (2001) Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca* **27**, 39-42.
- Marchioro M.I. & Baldisserotto B. (1999) Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Ciência Rural* **29**, 315-318.

- Maria A.N., Viveiros A.T.M., Freitas R.T.F. & Oliveira A.V. (2006) Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* **260**, 298-306.
- Marques S. & Godinho H.P. (2004) Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**, 799-804.
- Martínéz-Pastor F., Cabrita E., Soares F., Anel L. & Dinis M.T. (2008) Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction* **135**, 449–459.
- Murgas L.D.S., Miliorini A.B., Barbosa M.O., Franciscatto R.T. & Maria A.N. (2002) Viabilidade do sêmen de piapara (*Leporinus obtusidens*), resfriado a 4°C, empregando-se diferentes diluentes. In: *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura* (ed. by E.C. Urbinati & J.E.P. Cyrino, orgs.). v.2, pp.117-125, AQUABIO, Jaboticabal.
- Murgas L.D.S., Miliorini A.B., Franciscatto R.T. & Maria A.N. (2004) Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. *Revista Brasileira de Zootecnia* **33**, 1361-1365.
- Myers R.H. (1990) *Classical and modern regression with applications* Duxbury Press. 2nd ed. Belmont.
- Oliveira A.V., Viveiros A.T.M., Maria A.N., Freitas R.T.F. & Isaú, Z.A. (2007) Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **59**, 1509-1515.
- Quinn G.P. & Keough, M.J. (2002) *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, New York.
- Rana K. (1995) Preservation of gametes. In: *Broodstock management and egg and larval quality* (ed. by N.R. Bromage & R.J. Roberts, orgs.) pp.53–75. Blackwell Science, London.

- Ravinder K., Nasaruddin K., Majumdar K.C. & Shivaji S. (1997) Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology* **50**, 1309-1328.
- Romagosa E. (2006) Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura* (ed. By J.E.P. Cyrino & E.C. Urbinati, orgs.) pp.108-116. Aquabio, Jaboticabal.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. & Nash J.P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**, 1-28.
- Rurangwa E., Volckaert F.A.M., Huyskens G., Kime D.E. & Ollevier, F. (2001) Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*), *Theriogenology* **55**, 751-769.
- Sampaio E.V. & Sato Y. (2006) Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. *Acta Scientiarum. Biological Science* **28**, 263-268.
- Scorvo Filho, J.D. (2008) Piscicultura em tanques-rede uma alternativa para grandes e pequenos corpos de água in AveSui América Latina, Florianópolis.
- Stasoft. Inc. (2005) *Statistic (Data Analysis Software System)*. Version 7.1. Tulsa, USA.
- Streit JR.D.P., Moraes G.V., Ribeiro R.P., Povh J.A., Souza E.D. & Oliveira C.A.L., (2004) Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR* **7**, 157-162.
- Toth G.P., Christ S.A.; McCarthy H.W., Torsella J.A. & Smith M.K. (1995) Computer-assisted motion analysis of sperm from the common carp. *Journal of Fish Biology* **47**, 986-1003.

Wilson-Leedy J.G. & Ingermann R.L. (2007) Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters.

Theriogenology **67**, 661-672.

Woynaróvich E.; Horváth L. (1983) *The Artificial Propagation of Warm -Water Finfishes - A Manual for Extension*. Translation by Chama V.L.M. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília.

APÊNDICE A



Figura 1 - Reprodutor de jundiá (*Rhamdia quelen*)



Figura 2 - Seleção dos reprodutores e indução hormonal



Figura 3 - Coleta do sêmen e dos ovócitos através de extrusão

APÊNDICE B

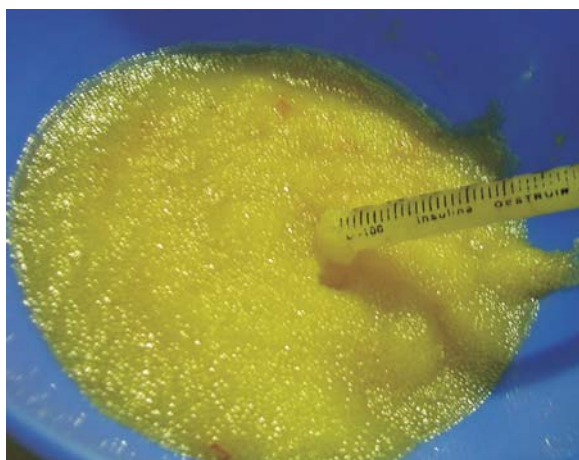


Figura 1 - Ovócitos e sêmen coletados

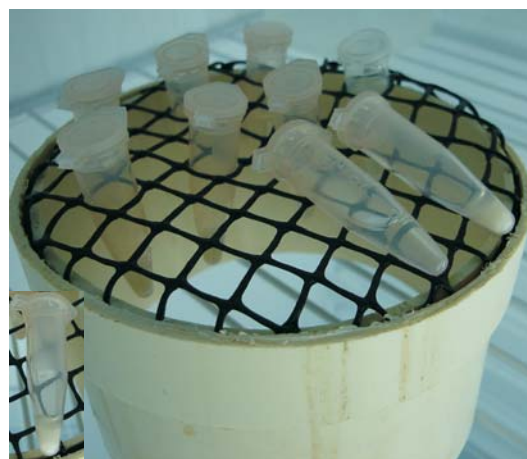


Figura 2 - Ovócitos estocados em placas de petry e sêmen em ependorfs

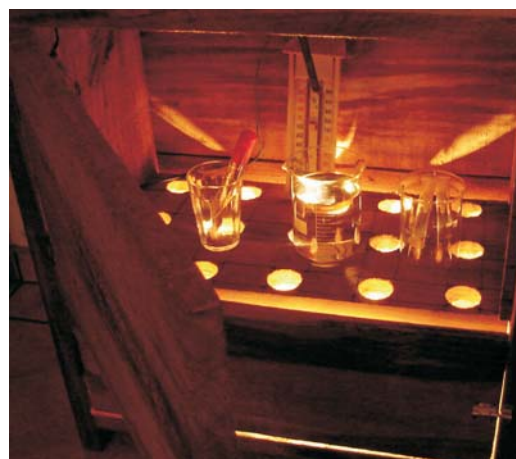


Figura 3 - Estruturas utilizadas para a estocagem dos ovócitos e do sêmen (câmara germinadora e estufa de madeira com termostato)

APÊNDICE C



Figura 1 - Recipientes experimentais utilizados para a fertilização artificial



Figura 2 - Sistema de incubação com recirculação de água e incubadora experimental de 2,5L

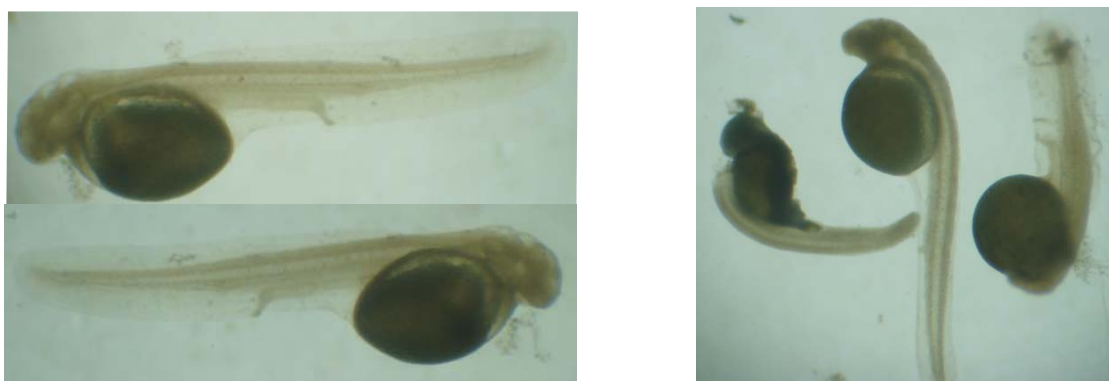


Figura 3 - Larvas normais e anormais observadas no experimento