

AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA, PRESERVAÇÃO CRIOGÊNICA E FERTILIDADE DO SÊMEN DO PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), PROVENIENTE DE REPRODUÇÃO INDUZIDA

(Spermatogenic evaluation, cryogenic preservation and fertility of the "pacu", *Piaractus mesopotamicus* [Holmberg, 1887], sperm, from induced spawning)

Washington FOGLI DA SILVEIRA^{1,5}
Enrico Tahira KAVAMOTO¹
Marcos Antonio CESTAROLLI¹
Heloisa Maria GODINHO²
Sergio Moreira RAMOS³
Alexandre Ninkaus SILVEIRA⁴

RESUMO

Com o objetivo de subsidiar os trabalhos de reprodução artificial de peixes que apresentam potencial para a aquicultura comercial, estudaram-se as características seminais, a congelação, a criopreservação e a fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Os reprodutores, provenientes de reprodução induzida, foram mantidos em tanques experimentais, no Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo" - IP/SAA - e no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA - em Pirassununga (SP). O experimento foi realizado no mês de janeiro, de 1985 a 1990. Os valores médios das características seminais foram: volume de sêmen, 5,02 ml; estimativa da motilidade espermática, 90,00%; concentração de espermatozoides, $28,07 \times 10^6/\text{mm}^3$; porcentagem de células espermáticas vivas, avaliadas pelo método da coloração diferencial, 89,10%. Paralelamente, relacionou-se a concentração de espermatozoides (mm^3) com o espermátocrito (mm), obtendo-se um valor de $r = 0,93^*$ e o valor médio do teste de redução do azul de metileno (redutase-metria) foi 150 segundos. Para a congelação do sêmen, utilizou-se vapor de nitrogênio líquido e a preservação criogênica foi conduzida em "container" especial. Vinte e quatro horas pós-congelamento, o sêmen foi descongelado e, ao exame microscópico, revelou uma taxa estimada de 20% de espermatozoides vivos. Após doze meses de criopreservação, realizou-se o teste de fertilização obtendo-se 21,07% de óvulos fertilizados, enquanto que com o sêmen fresco, utilizado como controle, a fertilidade foi 34,55%. Portanto, é viável a criopreservação do sêmen do pacu e sua utilização na rotina da reprodução artificial.

PALAVRAS-CHAVE: peixe, *Piaractus mesopotamicus*, sêmen, avaliação espermática, congelamento, fertilização

ABSTRACT

In order to develop the artificial reproduction in freshwater fishes that can be considered as commercial stocks to be explored in aquaculture, the seminal characteristics, cryogenic preservation and fertility of "pacu", *Piaractus mesopotamicus*, sperm are studied. The males from induced spawning were kept in experimental ponds at the Biology Laboratory of Freshwater Fishes "Dr. Pedro de Azevedo" - IP/SAA - and Research and Training Aquaculture Center - CEPTA/IBAMA - in Pirassununga (São Paulo - Brazil). The assay was performed during January, from 1985 to 1990. The seminal characteristics examined and values obtained were: sperm volume, 5.02 ml; percentage of motile spermatozoa, 90.00%; spermatic concentration, $28.07 \times 10^6/\text{mm}^3$; percentage of live spermatozoa by differential staining method, 89.10%. The correlation coefficient between spermatic concentration (mm^3) and spermatozoa (mm) was found to be $r = 0.93^*$ and the average of the methylene-blue reduction test was 150 seconds. The sperm was frozen in liquid nitrogen vapor and the cryogenic preservation was carried out in special container. After twenty-four hours of freezing, the sperm was thawed and under microscopy examination showed 20% live spermatozoa. After one year of cryopreservation, the fertilization test revealed 21.07% of fertilized eggs, whereas for the control fresh semen the fertility was 34.55%. Therefore, is feasible the sperm cryopreservation of the "pacu" and its utilization in the artificial reproduction routine.

KEY-WORDS: fish, *Piaractus mesopotamicus*, sperm, spermatogenic evaluation, freezing, fertilization

(1) Pesquisador Científico - Seção de Biologia Aquática - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca - CPA/SAA

(2) Pesquisador Científico - Instituto de Pesca - Bolsista do CNPq

(3) Biólogo - Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA

(4) Estagiário - Seção de Biologia Aquática - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca - CPA/SAA

(5) Endereço/Address: Av. Francisco Matrazzo, 455 - CEP 05031 São Paulo - SP

1. INTRODUÇÃO

O pacu, antes denominado *Colossoma mitrei* e, mais recentemente, identificado por GÉRY (1986) como *Piaractus mesopotamicus*, pertence à família Characidae e distribui-se na Bacia do Rio Paraná onde se apresenta como uma das espécies de grande valor comercial. Atualmente é grande o interesse pela criação dessa espécie em cativeiro, onde não se reproduz naturalmente. Portanto, utiliza-se a indução da reprodução empregando-se hormônios que atuam direta ou indiretamente nas gônadas de ambos os sexos (GODINHO et alii, 1977; CASTAGNOLLI & DONALDSON, 1981; BERNARDINO; ALCANTARA & ORMANEZI, 1986; GODINHO & GODINHO, 1986; MENDONÇA et alii, 1986; CARLSFELD et alii, 1988; ROMAGOSA; PAIVA & GODINHO, 1990). Entretanto, neste processo alguns machos não apresentam resposta sincrônica com as fêmeas prontas a se reproduzirem. Pode-se contornar essa situação utilizando sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. Assim, para se obterem espermatozoides viáveis pós-congelamento em condições de fecundar, é necessário, a princípio, conhecer as características espermáticas da espécie, através de avaliação criteriosa e, posteriormente, submeter os espermatozoides a um processo de congelamento adequado.

Quanto à avaliação das características seminais, são vários os trabalhos publicados, sendo a maioria dirigidos aos peixes pertencentes à família dos salmonídeos. Dentre estes, destacam-se os estudos realizados por BILLARD; BRETON & JALABERT (1971) e KAVAMOTO et alii (1985;1987). Para avaliar a porcentagem de espermatozoides vivos de *Carassius auratus* (goldfish), FRIBOURGH (1966) introduziu a coloração diferencial das células espermáticas com eosina/nigrosina. Em se tratando das espécies autóctones, encontram-se na literatura as publicações de FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA (1981;1985), KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) que avaliaram o sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. Em nota preliminar,

FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & GODINHO (1985) apresentaram as características seminais do pacu, *Colossoma mitrei*, proveniente do Rio Coxim (MT) e KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986) estudaram o sêmen do curimatã, *Prochilodus scrofa*.

A semelhança de MONTALEMBERT; MARCEL & BILLARD (1980), que utilizaram o espermátocrito como método indireto ou auxiliar de avaliação do *Esox lucius* (brochet), FOGLI DA SILVEIRA et alii (1985), KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) e KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986) avaliaram o sêmen da truta, *Salmo irideus*, do bagre, *Rhamdia hilarii*, e do curimatã, *Prochilodus scrofa*, respectivamente.

O teste de redução do azul de metileno (redutase metria) para verificar o poder redutor do sêmen da truta, *Salmo irideus*, introduzido por FOGLI DA SILVEIRA et alii (1986), também foi empregado por KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) e KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986), respectivamente, para o bagre, *Rhamdia hilarii*, e para o curimatã, *Prochilodus scrofa*.

Quanto à congelamento e à criopreservação do sêmen, destacam-se na literatura os experimentos conduzidos por GRAYBILL & HORTON (1969), OTT & HORTON (1971), STEIN & BAYRLE (1978), STOSS & HOLTZ (1981 a,b; 1983 a,b), COSER; STOSS & DONALDSON (1988) que congelaram o sêmen da truta *Salmo gairdneri*. No Brasil, FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA (1981; 1985), FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984), FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & GODINHO (1985), COSER & GODINHO (1987) congelaram em gelo seco, respectivamente, o sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*, da truta arco-íris, *Salmo irideus*, do pacu, *Colossoma mitrei* e do curimatã-pacu, *Prochilodus marginatus*.

A congelamento em vapor de nitrogênio líquido foi aplicada ao sêmen do curimatã, *Prochilodus scrofa*, e dourado, *Salminus marmoratus*.

xillosus, por COSER; GODINHO & RIBEIRO (1984), e ainda COSER; GODINHO & TORQUATO (1987), KAVAMOTO et alii (1989) e FOGLI DA SILVEIRA et alii (1989) utilizaram o mesmo processo para o piau, *Leporinus silvestrii*, curimatã, *Prochilodus scrofa*, e truta arco-íris, *Salmo irideus*, respectivamente.

Quanto à fertilização, utilizando o sêmen congelado, encontram-se na literatura os trabalhos de GRAYBILL & HORTON (1969), OTT & HORTON (1971), STEIN & BAYRLE (1978), STOSS & HOLTZ (1981 a,b; 1983 a,b), FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984;1989), COSER; STOSS & DONALDSON (1988), que estudaram os salmonídeos. Dentre os peixes autóctones, COSER & GODINHO (1987) e KAVAMOTO et alii (1989) descreveram a fertilização com sêmen con-

gelado de curimatã-pacu, *Prochilodus margravii*, e curimatã, *Prochilodus scrofa*, respectivamente.

Tendo em vista o aperfeiçoamento do processo da reprodução artificial e a grande importância da congelação do sêmen para a preservação do material genético de peixes que apresentam potencial para a aquicultura comercial, este trabalho objetiva estudar as características seminais, a técnica de congelação do sêmen em vapor de nitrogênio líquido, sua criopreservação e verificar os resultados de fertilização com sêmen congelado e sêmen fresco de exemplares da espécie considerada neste estudo, provenientes de reprodução induzida e criados em cativeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no mês de janeiro dos anos de 1985 a 1990, no Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo" - IP/SAA e no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA, em Pirassununga (SP). O trabalho foi conduzido em três etapas a saber: avaliação espermática, congelação e fertilização do sêmen.

Avaliação espermática

No mês de janeiro dos anos de 1985, 1986 e 1987, foram realizadas trinta e três coletas de sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a partir de três anos de idade, proveniente de reprodução induzida. Antes da coleta de sêmen, os machos receberam, por via intramuscular, gonadotropina coriônica humana (HCG), na dosagem de 5 IU/g de peso vivo. Em seguida, foram distribuídos em caixas de cimento amianto de 1000 litros, com água corrente e aeração constante. Oito horas após o

tratamento, o sêmen foi coletado em tubos de centrifuga graduados, através de massagem abdominal no sentido ântero-posterior. De cada amostra coletada, foram estudadas as características seminais, pelos métodos diretos e indiretos de avaliação espermática como segue:

A - Métodos diretos de avaliação

A.1 - Volume do sêmen - observado no próprio recipiente coletor, anotando-se a quantidade obtida em mililitros (ml).

A.2 - Cor do sêmen - as variações da coloração têm significado especial quanto ao aproveitamento imediato do material. A alteração da cor, geralmente, é provocada pela presença de fezes, urina ou sangue. Nestas condições, o material foi inutilizado.

A.3 - Motilidade espermática - realizada sob microscopia de contraste de fase (400 x). Misturou-se sobre uma lâmina uma gota de sêmen com duas gotas de solução de bicar-

bonato de sódio a 1%. A estimativa da porcentagem de células móveis seguiu a escala arbitrária de 0 a 100% (SALISBURY & VANDEMARK, 1964).

A.4 - Porcentagem de espermatozoides vivos avaliada através da coloração diferencial-utilizou-se o método de BLOM (1950), onde somente as células mortas tornam-se permeáveis ao corante.

A.5 - Concentração de espermatozoides por mm³-determinada por contagem das células em câmara hematómica de Neubauer "Improved" (KAVAMOTO et alii, 1985).

B - Métodos indiretos de avaliação

B.1 - Espermátócrito - determina a concentração espermática pela mensuração, em milímetros, da coluna de células em tubo de microhematócrito (MONTALEMBERT; MARCEL & BILLARD, 1980). Foram estimados os valores de **a** e **b** por regressão, entre o espermátócrito (mm) e a concentração espermática (mm³), através do método dos mínimos quadrados, calculando-se também o respectivo coeficiente linear de Pearson (**r**) (SNEDECOR & COCHRAN, 1980).

B.2 - Teste de redução do azul de metileno (redutase métrica), em segundos (FOGLI DA SILVEIRA et alii, 1986).

Para o volume, motilidade espermática, coloração diferencial, concentração espermática, espermátócrito e redutase métrica, calcularam-se a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e os limites de confiança. A fim de verificar se houve ou não diferença estatística entre a porcentagem da motilidade direta subjetiva e a porcentagem de espermatozoides vivos, avaliados pela coloração diferencial, aplicou-se o teste de qui-quadrado (χ^2) ao nível de 5% de probabilidade (GOLDSTEIN, 1965).

Congelação do sêmen

Em janeiro de 1987, no Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de

Azevedo", (Pirassununga - SP), foram conduzidos os estudos de congelação de sêmen. Utilizou-se o "pool" de sêmen de treze machos que, em seguida, foi diluído na proporção de 1:3 no meio V2e, preconizado por STEIN & BAYRLE (1978), contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) como substância crioprotetora. Homogeneizado adequadamente, o sêmen diluído foi examinado sob microscopia de contraste de fase, com objetivo de orientar sobre o aproveitamento do material antes da congelação. Assim, tubos de ensaio foram preenchidos com 5 ml de sêmen diluído, fechados com rolha de borracha, fixados em "racks" imersos em água na temperatura de 27°C. Ato contínuo, com adição de cubos de gelo, a temperatura da água e do sêmen foi declinando rapidamente até atingir a temperatura entre 2 e 5°C. Em seguida, os tubos com sêmen foram colocados numa estante metálica, suspensa em vapor de nitrogênio líquido a uma distância de 5 cm desse líquido, contido em cuba de isopor (40x30x37cm). Decorridos 5 minutos, a temperatura (medida por termômetro elétrico, 40°C a -200°C) baixou de 5°C para -60°C (13°C/minuto) quando todos os tubos foram imersos diretamente em nitrogênio líquido (-196°C). Após 15 minutos, o material congelado foi transferido para "container" especial (MVE-MOD-APOLLO-SX-44), onde se processou a criopreservação. Transcorridas vinte e quatro horas, amostras de sêmen foram descongeladas em água refrigerada (4°C a 5°C) e examinadas sob microscopia de contraste de fase para avaliação da porcentagem de células vivas.

Em janeiro de 1989, no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA (Pirassununga-SP), repetiu-se o processo de congelação do sêmen da espécie considerada neste estudo, trocando-se os tubos de ensaio utilizados na congelação anterior para recipiente de plástico apropriado, uma vez que alguns daqueles tubos explodiam durante a descongelação, dificultando o aproveitamento do material, podendo, eventualmente, causar

danos físicos ao pesquisador. Assim, optou-se por recipientes denominados "paillets" de 0,5 ml, seguindo-se, em parte, o mesmo procedimento técnico anteriormente citado. Utilizou-se o "pool" de sêmen de três machos, a mesma proporção de diluição e o mesmo diluidor. Alterou-se a velocidade de congelação para 30°C/minuto de 5°C a -80°C, medida por termômetro elétrico digital (40°C a

-200°C), mantendo-se, o material a ser congelado, afastado 27cm do nitrogênio líquido (FIGURA 1). Ao atingir -80°C, os "paillets" foram imersos em nitrogênio líquido. A descongelação do material foi efetuada em água aquecida (70°C a 80°C) por 3 a 4 segundos, sendo examinado sob microscopia de contraste de fase para avaliação da motilidade dos espermatozoides.

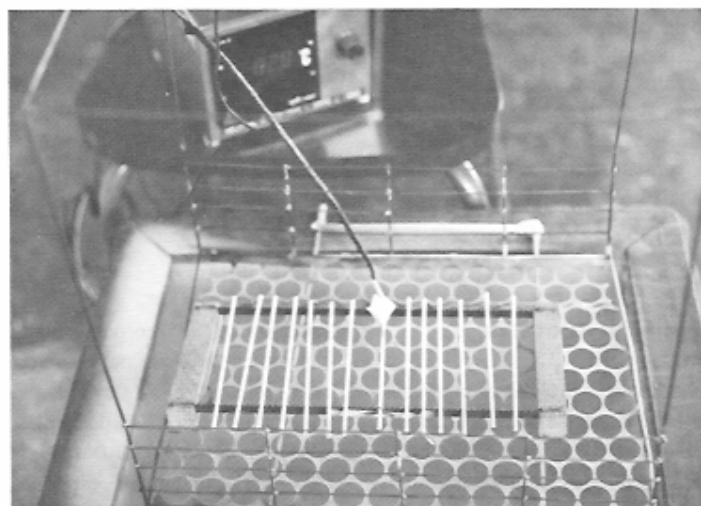


FIGURA 1 - "Paillets" contendo sêmen diluído, antes da congelação

Fertilização

Em Janeiro de 1990, no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA - (Pirassununga - SP), foi conduzido o teste de fertilização, utilizando-se o sêmen congelado em "paillets" do ano de 1989 (12 meses de criopreservação). O sêmen congelado em tubos de ensaio não foi usado, tendo em vista não só estoque reduzido, como provável explosão de unidades. Para o teste de fertili-

zação, foram selecionadas fêmeas de 3 anos de idade, que apresentavam ovócitos com predominância de posição excêntrica da vesícula germinativa (BRUZKA, 1979). A indução da ovulação foi conduzida injetando-se extrato de hipófise de *Prochilodus lineatus* em duas aplicações, a intervalos de 12 horas, nas doses de 0,5 mg e 5 mg/kg de peso vivo, respectivamente. Decorridas 10 horas da segunda aplicação, foram aproveitados óvulos de uma única fêmea, retirados por extrusão.

Colocaram-se de 160 a 224 óvulos frescos em frascos de vidro com capacidade de 15 ml, em 6 repetições, com 0,5 ml de sêmen descongelado, e de 133 a 226 óvulos com 0,04 ml de sêmen fresco (controle), também em 6 repetições. Esta diferença entre os volumes utilizados deve-se ao fato de que o sêmen fresco continha ao redor de três milhões de espermatozoides viáveis por óvulo, enquanto que no sêmen congelado, essa quantidade foi dezesseis milhões, considerando a mortalidade parcial das células espermáticas durante o processo de congelamento e descongelamento. À mistura de óvulos com sêmen descongelado, adicionaram-se 8 ml de solução de bicarbonato de sódio a 1%, a fim de ativar a motilidade dos espermatozoides. Os óvulos permaneceram misturados ao sêmen por dois

minutos, sendo, em seguida, lavados em água e transferidos para mini-incubadoras de "PVC" ($\phi=9,3$ cm x h = 20 cm), mantidos em caixas de 3000 litros, contendo água corrente na temperatura de 26°C.

A porcentagem de fertilidade, tanto para o sêmen fresco como para o congelado, foi calculada pela relação entre o número de óvulos fertilizados e o número de óvulos incubados.

Após as transformações angulares (arco-seno), segundo Bliss (1937), apud SNEDECOR & COCHRAN (1980), das porcentagens de fertilidade, aplicou-se a análise de variância seguida do teste de F (PIMENTEL GOMES, 1966) ao nível de 5% de probabilidade, para comparar o poder fecundante do sêmen congelado e do sêmen fresco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação espermática

Os resultados da análise das características seminais apresentam-se individualizados na TABELA 1 e podem ser confrontados com os resultados encontrados na literatura especializada (QUADRO 1).

Pelo teste de qui-quadrado (χ^2), não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade entre a porcentagem da motilidade espermática subjetiva (90,00%) e a porcentagem de espermatozoides avaliados através da coloração diferencial (89,10%), concordando com os resultados de KAVAMOTO et alii (1985), KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) e KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986), que analisaram, respectivamente, o sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus*, do bagre, *Rhamdia hilarii*, e do curimatá, *Prochilodus scrofa*. Em nota preliminar, FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO

& GODINHO (1985) encontraram, para a mesma espécie considerada neste estudo e não tratada com HCG, 78,00% de motilidade espermática e 82,70% de células não coradas pela eosina (QUADRO 1).

A relação entre o espermatócrito e o número de espermatozoides está definida pela equação: $Y = -3452651 + 1354346 X$, obtendo-se um coeficiente de correlação linear (r) de 0,93*, revelando-se estatisticamente significativo ($P < 0,05$) (FIGURA 2). O valor de $r = 0,93^*$ está próximo ao encontrado por MONTALEMBERT; MARCEL & BILLARD (1980) que estudaram o "brochet", *Esox lucius*, e por KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986), que trabalharam com o curimatá, *Prochilodus scrofa*, porém difere dos valores obtidos por FOGLI DA SILVEIRA et alii (1985) e KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986), para outras espécies (QUADRO 1).

TABELA 1
Características seminais, espermátócrito e redutase metria do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, injetado com HCG, proveniente de reprodução induzida - Pirassununga (SP) - 1985 a 1987

Nº do peixe	Volume de sêmen (ml)	Motilidade espermática (%)	Coloração diferencial (% vivos)	Concentração espermática (nº esp. x 10 ⁶ /mm ³)	Esperma-tócrito (mm)	Reduta - semetria (segundos)
01	-	85	86,46	25,65	21	180
02	-	90	92,22	22,30	24	210
03	-	70	80,40	31,90	25	330
04	-	80	93,17	23,05	19	130
05	-	90	91,14	19,85	19	180
06	-	95	90,36	19,90	19	110
07	-	90	92,49	28,15	25	185
08	-	95	92,25	35,53	28	175
09	-	90	91,41	20,95	18	230
10	-	90	93,80	24,50	22	200
11	-	85	91,07	25,18	25	180
12	-	90	93,07	11,82	13	160
13	-	85	89,92	29,22	24	190
14	2,0	85	83,73	39,50	31	135
15	2,1	90	92,04	45,60	32	120
16	1,9	90	93,45	46,35	34	80
17	1,7	95	83,37	33,45	29	120
18	3,0	90	89,60	34,25	26	170
19	3,0	90	87,59	29,65	27	170
20	3,0	90	89,94	33,72	29	170
21	3,0	95	90,75	41,48	30	135
22	4,3	90	81,25	33,22	25	130
23	4,1	95	83,37	30,90	27	135
24	3,3	90	90,67	38,38	29	75
25	7,5	90	87,07	18,35	16	120
26	9,5	95	82,58	14,00	12	130
27	4,5	90	84,34	23,00	17	140
28	4,8	95	93,62	24,00	20	105
29	9,3	95	87,55	26,55	26	90
30	7,2	95	91,55	26,20	24	120
31	7,2	95	94,80	24,95	20	120
32	9,5	85	85,42	21,45	18	120
33	9,5	95	89,22	17,20	14	110
$\bar{x}$	= 5,02	90,00	89,10	28,07	23,27	150
s	= 2,84	5,30	4,05	8,20	5,65	49,71
CV %	= 56,57	5,89	4,55	29,21	24,28	33,11
LC inf	= 3,69	88,09	87,64	25,11	21,23	132,07
LC sup	= 6,35	91,91	90,56	31,03	25,31	167,93

$$\chi^2 = 0,004 \quad \chi^2_{5\%} = 3,84 \text{ (1GL)}$$

LC = limite de confiança utilizando a distribuição "t" de Student para 95% de confiança

QUADRO 1
Valores de características seminais, espermático e redutasemetria de peixes de água doce, encontrados na literatura especializada

Espécie	Volume de sêmen (ml)	Motilidade espermática (%)	Coloração diferencial (% vivos)	Concentração espermática (10^6 esp. x 10^6 mm ³)	Espermático (Valor)	Redutasemetria (segundos)	REFERÊNCIAS
"Goldfish" <i>Carassius auratus</i>	-	80,00	97,01	-	-	-	FRIBOURGH (1966)
Truta arco-íris <i>Salmo gairdneri</i>	4 - 8	-	-	15,30	-	-	BILLARD; BRETTON & JALABERT (1971)
Truta arco-íris <i>Salmo trutta</i>	5,01 12,36	55,86 72,94	54,43 75,75	15,07 20,99	-	-	KAVAMOTO et alii (1985)
Truta arco-íris <i>Salmo trutta</i>	-	-	-	15,98	0,85*	-	FOGLI DA SILVEIRA et alii (1985)
Truta arco-íris <i>Salmo trutta</i>	-	57,59	-	15,57	-	645	FOGLI DA SILVEIRA et alii (1986)
Truta arco-íris <i>Salmo trutta</i>	11,30	91,88	-	14,63	-	-	KAVAMOTO et alii (1987)
"Brochet" <i>Esox lucius</i>	-	-	-	-	0,98	-	MONTALEMBERT, MARCEL & BILLARD (1980)
Bagre <i>Rhamdia hilarii</i>	1,15	72,00	76,09	55,09	-	-	FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA (1981/1985)
Bagre <i>Rhamdia hilarii</i>	0,8	81,90	86,73	66,53	0,75*	108	KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986)
Curimatã <i>Psectrogaster</i>	-	84,40	89,13	34,19	0,95*	152	KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986)
Pacu <i>Colossoma niloticum</i> (= <i>Piaractus mesopotamicus</i>)	3,31	78,00	82,70	36,17	-	-	FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & GODINHO (1985)

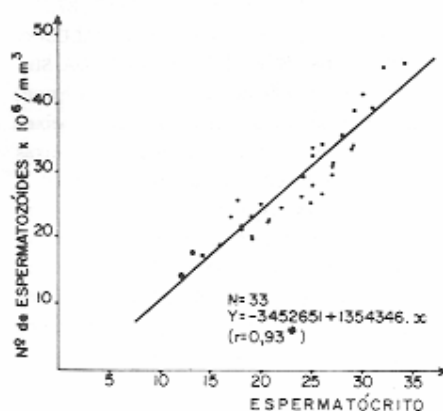


FIGURA 2 - Relação entre o espermatozócrito e o número de espermatozoides do pacu, *Piaractus mesopotamicus* - Pirassununga (SP) 1985/1987

O resultado do teste de redutometria, empregado como método indireto de avaliação, foi, em média, 150 segundos (TABELA 1), valor este, bastante próximo ao de KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO (1986), diferindo dos resultados verificados por FOGLI DA SILVEIRA et alii (1986) e KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) (QUADRO 1). Deve-se levar em consideração que as concentrações espermáticas médias variam entre as espécies estudadas. Esse teste demonstrou que o sêmen da espécie apresenta substâncias redutoras liberadas pelas células espermáticas (FOGLI DA SILVEIRA et alii, 1986).

Congelamento do sêmen

Para a congelamento do sêmen em tubos de ensaio, o "pool" de sêmen fresco, coletado de 13 machos, apresentou ao redor de 85% de espermatozoides vivos e a concentração espermática foi $39,95 \times 10^6$ espermatozoides por mm^3 , enquanto que, para o sêmen congelado

em "paillets", "pool" de sêmen fresco de 3 machos, aquelas características foram: 90,00% e $18,45 \times 10^6/\text{mm}^3$. Tanto o sêmen congelado em tubos de ensaio, como o sêmen congelado em "paillets" revelaram, após 24 horas da congelamento, uma taxa estimada de 20% de células espermáticas viáveis. Este resultado foi inferior aos descritos por OTT & HORTON (1971), FOGLI DA SILVEIRA et alii (1989), para trutas, FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA (1981; 1985), para bagre, COSER; GODINHO & RIBEIRO (1984), para dourado, e KAVAMOTO et alii (1989), para curimatã, que obtiveram, respectivamente: 45%, 30%, 30%, 40% e 35%. Entretanto, o resultado foi superior ao descrito por COSER; GODINHO & RIBEIRO (1984), que verificaram 5% de recuperação pós-descongelamento, quando trabalharam com sêmen do curimatã, *Prochilodus scrofa*. Contudo, a estimativa de 20% de células viáveis foi satisfatória, levando-se em consideração o resultado desfavorável, mencionado em nota preliminar por FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & GODINHO (1985), quando descongelaram o sêmen da mesma espécie aqui estudada, e o resultado de 0 a 10% de formas viáveis descrito por COSER; GODINHO & TORQUATO (1987), quando descongelaram o sêmen do piau, *Leporinus silvestrii*.

Fertilização

Os resultados de fertilidade com sêmen fresco (controle) e sêmen congelado (teste) estão contidos na TABELA 2. Pelo teste estatístico aplicado, verifica-se que não houve diferença significativa entre as taxas de fertilidade dos dois tipos de sêmen, revelando que o método de congelamento atingiu níveis satisfatórios, além de indicar a resistência dos espermatozoides aos processos de congelamento, criopreservação e descongelamento. Pela proximidade dos resulta-

dos, observa-se que a qualidade dos ovócitos tem papel preponderante na fertilidade da espécie. A taxa de fertilidade média geral de 21,07% para o sêmen congelado, embora aparentemente baixa, não constitui impedimento à reprodução artificial tendo em vista a alta fecundidade da espécie (ROMAGOSA et alii, 1990). Esta taxa foi pouco superior à taxa de 18% observada por GRAYBILL & HORTON (1969) e superior à de 10,55%, conseguida por FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984), que estudaram a truta arco-íris. No entanto, foi inferior às porcentagens de fertilização obtidas por OTT & HORTON (1971) de 59%, STEIN & BAYRLE (1978) de 81,9%, STOSS

& HOLTZ (1981 a,b; 1983 a,b) de 80,1%, 87,1%, 81,0%, 84,8%, COSER; STOSS & DONALDSON (1988) de 68,6% e 81,5% e FOGLI DA SILVEIRA et alii (1989) de 53,7%, que trabalharam com a truta arco-íris. Em se tratando de peixes autóctones, o resultado foi semelhante às taxas de 24,5% e 28,2% verificadas por COSER & GODINHO (1987), que utilizaram o sêmen congelado do curimatã-pacu, *Prochilodus marginatus*, e inferior às de KAVAMOTO et alii (1989) que obtiveram 78,01% e 92,68% de óvulos fertilizados, quando empregaram sêmen congelado de *Prochilodus scrofa*.

TABELA 2
Fertilidade do sêmen fresco e do sêmen congelado do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Pirassununga (SP) - 1990 -

Variável	Nº de óvulos incubados	Nº de óvulos fertilizados	Fertilidade (%)	Transformação angular (arco-seno)
Tratamento				
SÊMEN FRESCO	178	78	43,82	(41,44)
volume 0,04 ml	229	77	33,82	(35,55)
	218	66	30,28	(33,40)
	206	47	22,82	(28,52)
	133	13	9,77	(18,24)
	226	151	66,81	(54,82)
	$\Sigma = 1190$	$\Sigma = 432$	$\bar{x} = 34,55$	$\bar{x} = (35,33)$
	$\bar{x} = 198$	$\bar{x} = 72$		
SÊMEN CONGELADO	199	42	22,11	(27,97)
volume 0,5 ml	160	28	17,50	(24,73)
	164	35	21,34	(27,49)
	187	51	27,27	(31,50)
	224	34	15,18	(22,95)
	191	44	23,04	(28,66)
	$\Sigma = 1125$	$\Sigma = 234$	$\bar{x} = 21,07$	$\bar{x} = (27,22)$
	$\bar{x} = 188$	$\bar{x} = 39$		
$F_{5\%} = 2,45$ (ns)				

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, conclui-se que:

- Através de exames de sêmen fresco realizados nos períodos reprodutivos da espécie, é possível determinar características seminais quali-quantitativas.
- O espermátócrito pode ser utilizado com segurança como método indireto na avaliação da concentração espermática.
- O teste de redutase metria demonstrou que o sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, apresenta substâncias redutoras liberadas pelas células espermáticas.
- Para o sêmen congelado, a taxa estimada de espermatozoides viáveis pós-congelamento é de 20%, resultado este, em termos médios, con-

siderado satisfatório, em se tratando de sêmen congelado de peixes.

- As taxas médias de fertilidade de 21,07% e 34,55%, obtidas respectivamente para o sêmen congelado e sêmen fresco, embora aparentemente baixas, não constituem impedimento à reprodução artificial, tendo em vista a alta fecundidade da espécie estudada. Em situações especiais em que se indicaria o uso de sêmen congelado, como na assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, sua eficiência em relação ao sêmen fresco seria de 60,98%.
- A tecnologia desenvolvida neste estudo pode ser utilizada na reprodução artificial do pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração dos pesquisadores Henrique Arruda Soares do Instituto de Pesca, pela análise estatística dos dados, Geraldo Bernardino, Joachim Carolsfeld e Brian Harvey, do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura - CEPTA/IBAMA,

pelo apoio na seleção dos reprodutores e sugestões inerentes à congelamento do sêmen, e dos funcionários do Instituto de Pesca, Jairo Felício, Helio Sanches Mariscal, Antonio Bueno de Souza e José Plaza, pela dedicação, e à FINEP, pelo apoio financeiro inicial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDINO, G.; ALCANTARA, R.C.G. & ORMANEZI, R. 1986 Efeitos do LHRH-a na maturação dos ovários do pacu, *Colossoma mitrei*. Projeto Aquicultura Brasil, 3-P-76-001-CHD, Brazil, p.13.
- BILLARD, R.; BRETON, B. & JALABERT, B. 1971 La production spermatogénétique chez la truite. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., Paris, 12(2):199-212.
- BLOM, E. 1950 A one minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertility and Sterility, New York, 1 (2): 176-7.
- BRUZKA, E. 1979 The in vivo method of estimating the stages of maturation in carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Hydrobiol., 21:423-33.
- CAROLSFELD, J.; RAMOS, S.M., ORMANEZI, R.; GOMES, J.H.; BARBOSA, J.M. & HARVEY, B. 1988 Analysis of protocols for application of an LHRH analog for induce final maturation and ovulation of female pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG 1887). Aquaculture, Amsterdam, 74:49-55.
- CASTAGNOLLI, N. & DONALDSON, E.M. 1981 Induced ovulation and rearing of the pacu (*Colossoma mitrei*). Aquaculture, 25:275-79.
- COSER, A.M.L. & GODINHO, H.P. 1987 Capacidade de fertilização de ovócitos e sêmen de curimatã - pacu (*Prochilodus marginatus*) em condições experimentais. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 39ª, Brasília DF, 1987, Resumos... Brasília, SBPC. p.844.
- _____; _____ & RIBEIRO, P. 1984 Cryo-

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S.M. & SILVEIRA, A. N. 1990 Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamici* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 17(único): 1 - 13.

- genic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 37:387-90.
- COSER, A.M.L.; GODINHO, H.P. & TORQUATO, V.C. 1987 Criopreservação do sêmen do peixe-piau, *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 39(1):37-42.
- _____; STOSS, J. & DONALDSON, E.M. 1988 Efeito da taxa de congelamento sobre o sêmen da truta selvagem (*Salmo gairdneri*). In: ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA, 1988, Resumos... Brasília, AMA, p.65.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T. & GODINHO, H.M. 1985 Avaliação quali-quantitativa do sêmen do pacu, *Colossoma mitrei*, BERG, 1885. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37º. Belo Horizonte, 1985. Resumos... Belo Horizonte, SBPC, p.685.
- _____; ISHIZUKA, M.M. & PENTEADO, L.A. 1986 O azul de metileno como indicador da qualidade do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 13(1):89-94.
- _____; NARAHARA, M.Y. 1981 Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 33º, Salvador, 1981, Resumos... Salvador, SBPC, p.620.
- _____; 1985 Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 12(4):7-11.
- _____; RIGOLINO, M.G. & CARVALHO FILHO, A.C. 1985 O espermatozóide para avaliar a concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. *B. Inst. Pesca*, São Paulo 12(3):105-8.
- _____; PENTEADO, L.A. & CARVALHO FILHO, A.C. 1984 Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no Brasil. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 11(único): 131 - 36.
- _____; TABATA, Y.A.; SILVEIRA, A.N. & VERISSIMO, R. 1989 Congelamento do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, em vapores de nitrogênio líquido. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIO-LÓGICO, 2ª, São Paulo, 1989, Resumos... São Paulo, RAIB, p.55.
- FRIBOURGH, J.H. 1966 The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *The Progressive Fish Culturist*, Washington, 28(4):227-31.
- GÉRY, J. 1986 Notes des Characologie néotropicales 1. Progrès dans la systématique des genres *Colossoma* et *Piaractus*. *Revue fr. Aquariol*, 12(4):97-102.
- GODINHO, H.M.; FENERICH, N.A.; NARAHARA, M.Y. & BARKER, J.M.B. 1977 Sobre reprodução do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1885). *Ciência e Cultura*, São Paulo, 29:796-7 (Suplemento).
- GODINHO, H.P. & GODINHO, A.L. 1986 Induced spawning of pacu, *Colossoma mitrei* (Berg 1885) by hypophysation with crude carp pituitary extract. *Aquaculture*, Amsterdam, 55:69-73.
- GOLDSTEIN, A. 1965 *Biostatistics: An introductory text*. 2 ed. New York, Mac Millan. 272 p.
- GRAYBILL, J.R. & HORTON, H.F. 1969 Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryopreserved sperm. *J. Fish Res. Bd. Can.*, Ottawa, 26(5): 1400-5, May.
- KAVAMOTO, E.T. & FOGLI DA SILVEIRA, W. 1986 Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes 1840) em condições de campo. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 13(1):95-100, jun.
- _____; GODINHO, H.M. 1986 Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 13 (2):45-50, dez.
- _____; ROMAGOSA, E. 1989 Fertilização em *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 16 (1):29-36, jan./jun.
- _____; RIGOLINO, M.G. & CARVALHO FILHO, A.C. 1985 Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus*, Gibbons. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 12(3):73-81.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S.M. & SILVEIRA, A. N. 1990 Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 17(único): 1 - 13.

KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M.G.; TABATA, Y.A. & CAMPOS, B.E.S. 1987 Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 14(único): 51-62.

MENDONÇA, J.O.J.; BERNARDINO, G.; CECARELLI, P.S. & FERRARI, V.A. 1986 Reprodução induzida do pacu, *Colossoma mitrei*, em condições de campo. In: Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma*. Projeto Aquicultura Brasil, 3-P-76-001 - CIID, Brazil, p.8.

MONTALEMBERT, G.; MARCEL, J. & BILLARD, R. 1980 La spermiation chez le brochet. 1. Évolution de la quantité de sperm récolté au cours de la saison de reproduction. *Bull. Fr. Pisc.*, Paris, 50(276):89-103, jan.-mar.

OTT, A.G. & HORTON, H.F. 1971 Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryopreserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 28(12):1915-18, Dec.

PIMENTEL GOMES, F. 1966 *Estatística experimental*. 5 ed. Piracicaba, Nobel, 430 p.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P. & GODINHO, H.M. 1990 Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1885) induced to spawning. *Aquaculture*, Amsterdam, 86:105-10.

_____; _____ & GUILHERME, M.C.M. 1990 Fecundidade do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) em 1ª e 2ª maturação gonadal, sob condições de cultivo intensivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 17º, Londrina, 1990, Resumos... Londrina, CBZ, p.349.

SALISBURY, G.W. & VANDEMARK, N.L. 1964 *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*. Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, Acribia, 707 p. - Original Inglês.

SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. 1980 *Métodos estadísticos*. 7 ed. Trad. J.A. Reinosa Fuller. Companhia Editorial Continental S.A. México, 703 p. - Original Inglês.

STEIN, H. & BAYRLE, H. 1978 Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4):1073-76

STOSS, J. & HOLTZ, W. 1981a Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, Amsterdam, 22(1-2):97-104, Jan.

_____; _____ & _____ 1981b Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. *Aquaculture*, Amsterdam, 25(2-3):217-22, Aug.

_____; _____ & _____ 1983a Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. *Aquaculture*, Amsterdam, 31:275-82.

_____; _____ & _____ 1983b Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of thawing solution. *Aquaculture*, Amsterdam, 32:321-30.