

CONGELAMENTO DO SÊMEN DA TRUTA ARCO-IRIS, *Oncorhynchus mykiss*, EM VAPOR DE NITROGÊNIO LÍQUIDO

[Freezing of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen in liquid nitrogen vapor]

Washington FOGLI DA SILVEIRA<sup>1,5</sup>  
Emico Taira KAVAMOTO<sup>1</sup>  
Marcos Guilherme RIGOLINO<sup>2</sup>  
Yara Aiko TABATA<sup>2</sup>  
Henrique ARRUDA SOARES<sup>3</sup>  
Alexandre Ninhaus SILVEIRA<sup>4</sup>  
Rosicleire VERÍSSIMO<sup>4</sup>

RESUMO

O presente experimento foi conduzido na Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, SP (22°45'S e 45°30'W). Teve como objetivo verificar o efeito do sêmen diluído refrigerado, congelado e descongelado pelos métodos rápido e lento, na fertilidade da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. As porcentagens médias de fertilidade foram: sêmen diluído resfriado = 86,48%; sêmen congelado e descongelado pelo método rápido = 36,18%; sêmen congelado e descongelado pelo método lento = 31,86%; sêmen fresco utilizado como controle = 93,68%. Da análise dos dados obtidos, concluiu-se que: 1) não houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre a taxa média de fertilidade do sêmen fresco, quando comparada com a do sêmen diluído resfriado; 2) os descongelamentos rápido e lento não interferiram no poder fecundante dos espermatozoides.

**PALAVRAS-CHAVE:** peixe, truta, *Oncorhynchus mykiss*, sêmen, congelamento, fertilização

ABSTRACT

This experiment was carried out at Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, São Paulo, Brazil (22°45'S and 45°30'W), in order to verify the effect of chilled diluted, frozen and thawed sperm, by rapid and slow methods on fertility of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. The fertility averages were: chilled diluted milt = 86.48%; frozen milt/rapid thawing = 36.18%; frozen milt/slow thawing = 31.86%; fresh milt (control) = 93.68%. The conclusion from the data analysis were: 1) there was no significant difference ( $P < 0.01$ ) between the fertility of fresh milt and diluted chilled milt; 2) the rapid and slow thawing did not interfere in fecundity power of the spermatozoa.

**KEY WORDS:** fish, trout, *Oncorhynchus mykiss*, sperm, freezing, fertilization

I. INTRODUÇÃO

Há mais de dois séculos, cientistas vêm pesquisando métodos para preservar a viabilidade de gametas de peixes (Quartrefages, 1853, apud HORTON & OTT, 1976). HORTON & OTT (1976), em revisão da literatura sobre criopreservação de espermatozoides e ovos de peixe, citam ainda vários autores que, em estudos iniciais até meados deste século, se

concentravam em prolongar a vida dos gametas no estado não congelado, enquanto outros, em pesquisas mais recentes, focalizam o desenvolvimento de técnicas crioprotetoras a fim de preservar a vida dos espermatozoides.

A maioria das pesquisas está voltada à criopreservação do sêmen de peixes que pertencem à família Salmonidae, com vistas à

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

(2) Pesquisador Científico - Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão - Instituto de Pesca - CPA/SAA

(3) Pesquisador Científico - Seção de Aquicultura - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca - CPA/SAA

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

(5) Endereço/Address: Av. Francisco Matarazzo, 455 - CEP 050031-900 - São Paulo - SP

proteção da espécie, a subsidiar a pesquisa, a atender as espécies que maturam em diferentes períodos do ano e principalmente a servir à aquicultura comercial.

Na literatura especializada sobre fertilização com sêmen criopreservado de trutas, encontram-se os trabalhos de GRAYBILL & HORTON (1969), OTT & HORTON (1971), STEIN & BAYRLE (1978), STOSS & HOLTZ (1981 a,b; 1983 a,b), BAYNES & SCOTT (1987), COSER, STOSS; DONALDSON (1988), SCHMIDT-BAULAIN & HOLTZ (1989) e WHEELER & THORGAARD (1991) que descreveram médias de fertilidade que variaram de 18% a 87,1%. No Brasil, para a mesma espécie, encontra-se o trabalho de FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984), que obtiveram a média de 10,55% de óvulos fertilizados, quando também utilizaram sêmen criopreservado.

As médias de fertilidade da espécie, obtidas com sêmen fresco, verificadas por STEIN

& BAYRLE (1978), STOSS & HOLTZ (1981 a,b; 1983 a), FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984) e SCHMIDT-BAULAIN & HOLTZ (1989), foram: 87,9%, 97,1%, 97%, 93,2%, 77,57% e 96,9%, respectivamente.

Tendo em vista as necessidades do setor produtivo, este trabalho objetivou introduzir o congelamento do sêmen em vapor de nitrogênio líquido, a fim de evitar o choque térmico sobre a célula espermática, e comparar os resultados de fertilização com: sêmen congelado, sêmen resfriado e sêmen fresco da truta arco-íris, espécie anteriormente denominada *Salmo irideus* em nosso meio e, mais recentemente, classificada, através da osteologia e da bioquímica da espécie, como *Oncorhynchus mykiss* (SMITH & STEARLY, 1989).

Em nota preliminar, FOGLI DA SILVEIRA et alii (1989) apresentaram, em Reunião Científica, os resultados descritos neste trabalho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o período reprodutivo da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* de maio a agosto de 1989, na Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, SP (22°45'S e 45°30'W).

Utilizou-se um "pool" de sêmen de três machos de 2 anos de idade e com peso médio de 700g.

Após a avaliação quali-quantitativa do material espermático (SALISBURY & VAN-DEMARK, 1964; FRIBOURGH, 1966; FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO; NARAHARA, 1981; 1985, KAVAMOTO et alii, 1985), o mesm foi dividido em três partes. A primeira, no estado puro, foi mantida resfriada entre 0°C e 5°C até o momento da fertilização. A segunda foi diluída na proporção de 1:3 no diluidor "V2e" preconizado por STEIN & BAYRLE (1978), com

a seguinte composição: NaCl = 750 mg, NaHCO<sub>3</sub> = 200 mg, KCl = 38 mg, glicose = 100 mg, água destilada = 100 ml, gema de ovo de galinha = 20 ml, e também resfriada entre 0°C e 5°C, até ser utilizada para a fertilização. A terceira parte do sêmen foi diluída no mesmo diluidor (STEIN & BAYRLE, 1978) ao qual adicionou-se 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) como substância crioprotetora. A seguir foi envasada em "paillets" de 0,5 ml, para ser submetida ao processo de congelamento. Para tanto, a temperatura foi rebaixada para 2°C, colocando-se os "paillets" numa estante metálica, suspensa a uma distância de 32 cm do nitrogênio líquido (-196°C), contido em cuba de isopor (40x30x35cm), forrada internamente com chapa de alumínio. Aço contínuo, aproximando-se a estante metálica a uma distância de 27 cm do nitrogênio líqui-

do, a fim de provocar o declínio da temperatura e a uma velocidade de 30°C/minuto, atingiu-se -80°C. A monitoração da temperatura foi realizada por um termômetro elétrico digital (escala de 40°C a -200°C), com o sensor em uma das doses. Os "paillets" congelados (-80°C) foram imersos diretamente em nitrogênio líquido e, após 15 minutos, transferidos para contêiner especial (MVE-MOD-APOLLO-SX-44), a fim de obter-se a criopreservação do sêmen.

Para a fertilização, o "paillet" contendo sêmen foi descongelado em água aquecida entre 70°C e 80°C, por 3 a 4 segundos (descongelamento rápido) e em água à temperatura ambiente (10°C), por um minuto (descongelamento lento).

Nestes testes utilizaram-se óvulos de fêmeas de 3 anos de idade retirados através de massagem abdominal no sentido ântero-posterior. A quantidade de óvulos foi medida em recipiente de plástico, a fim de obterem-se amostras homogêneas de óvulos a serem fertilizados.

Foram calculados entre 2,0 e 3,5 milhões de espermatozoides vivos por óvulo a ser fertilizado, tanto para o sêmen fresco, como para o sêmen diluído resfriado e o sêmen congelado.

O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições, totalizando

dezesseis parcelas, sendo um tratamento controle com o "pool" de sêmen fresco (A) e três tratamentos teste com: sêmen diluído resfriado (B), sêmen congelado e descongelado pelo método rápido (C) e sêmen congelado e descongelado pelo método lento (D), apresentados no QUADRO 1. Os tratamentos B, C e D receberam, após mistura com os óvulos, 3,3 ml de solução de bicarbonato de sódio a 1% para cada 0,2 ml de sêmen, a fim de ativar a motilidade espermática. Em seguida, em todos os tratamentos adicionou-se água do tanque e a mistura permaneceu em repouso por 20 minutos para hidratação dos ovos. Posteriormente, foi transferida para incubadora do tipo horizontal, com divisões de 20cm x 8cm, onde se processou a incubação pelo método clássico. No 12º dia após a fertilização, os ovos foram colocados em solução clarificadora (ác. acético: 5 ml, glicerol: 5 ml, formalina: 5 ml, água destilada: 85 ml), para visualização do embrião, sob microscópio estereoscópico. A porcentagem de fertilidade foi calculada pela relação entre o número de ovos embrionados e o número de ovos incubados.

Após as transformações angulares (arcseno) das porcentagens de fertilidade, segundo Bliss (1937), apud SNEDECOR & COCHRAN (1980), aplicou-se a análise de variância, seguida do contraste entre médias de tratamentos, através do teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1966).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O "pool" de sêmen fresco de três machos apresentou as características contidas na TABELA 1.

Os resultados de fertilidade, obtidos para cada tratamento estão contidos na TABELA 2. Pela aplicação do teste de Tukey ( $\Delta = 18,43$ ), observa-se que os tratamentos contendo sêmen fresco (A) e sêmen diluído resfriado (B) não diferiram significativamente ao nível de

1% de probabilidade, demonstrando que o diluidor e a refrigeração não prejudicaram a célula espermática. No entanto, os tratamentos A e B diferiram dos tratamentos com sêmen congelado C e D e estes não diferiram entre si, quando aplicou-se o mesmo teste estatístico.

Os tratamentos com sêmen congelado C e D apresentaram taxas médias de fertilidade

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A.; ARRUDA SOARES, H.; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. 1994 Congelamento do sêmen da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. B. Inst. Pesca, São Paulo, 27 (único): 55 - 60.

QUADRO 1  
Volume de sêmen, valores médios de óvulos e de espermatozoides por óvulo nos diferentes tratamentos - 1989

| Tratamento<br>sêmen                                     | Variável                |                                    |                                                                     |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|                                                         | volume de<br>sêmen (ml) | número de<br>óvulos                | número de espermatozoides/<br>óvulo ( $\times 10^6 / \text{mm}^3$ ) |
| A - Controle                                            | 0,04                    | $\bar{X} = 271 \pm 35$<br>CV = 13% | $\bar{X} = 2,2 \pm 0,3$<br>CV = 14%                                 |
| B - Diluído<br>restrito                                 | 0,2                     | $\bar{X} = 202 \pm 12$<br>CV = 6%  | $\bar{X} = 3,3 \pm 0,2$<br>CV = 5%                                  |
| C - Congelado e des-<br>congelado rápido<br>(70°C/80°C) | 0,5                     | $\bar{X} = 208 \pm 9$<br>CV = 4%   | $\bar{X} = 3,0 \pm 0,1$<br>CV = 4%                                  |
| D - Congelado e des-<br>congelado lento<br>(10°C)       | 0,5                     | $\bar{X} = 237 \pm 16$<br>CV = 7%  | $\bar{X} = 2,6 \pm 0,2$<br>CV = 7%                                  |

TABELA 1  
Valores de características seminais do "pool" de sêmen fresco da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, - 1989 - Campos do Jordão (SP)

| Característica seminal                                     | valor |
|------------------------------------------------------------|-------|
| volume de sêmen (ml).....                                  | 8,00  |
| nº de espermatozoides ( $\times 10^6 / \text{mm}^3$ )..... | 16,52 |
| motilidade espermática (%).....                            | 90,00 |
| espermatozoides vivos:                                     |       |
| coloração diferencial (%).....                             | 97,34 |

de 36,18% e 31,86%, respectivamente. Estes resultados foram superiores aos apresentados

por GRAYBILL & HORTON (1969) e por FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984) que obtiveram, respectivamente, 18% e 10,55% para a truta arco-íris. Todavia, foram inferiores às taxas de fertilidade 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%, BAYNES & SCOTT (1987) de 67,3%, SCHMIDT-BAULAIN & HOLTZ (1989) de 71,9% e WHEELER & THORGAARD (1991) de 49,3%, que trabalharam com a truta *Salmo gairdneri*.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M.G.; TABATA, Y. A.; ARRUDA SOARES, H.; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. 1994 Congelamento do sêmen da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. B. Inst. Pesca, São Paulo, 21 (único): 55 - 60.

TABELA 2

Fertilidade do sêmen fresco, do sêmen diluído resfriado e do sêmen congelado da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, durante o período reprodutivo de maio a agosto de 1989 - Campos do Jordão - São Paulo

| TRATAMENTO<br>SÊMEN                       | Fertilidade                                |                                                |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                           | Porcentagem<br>Média                       | Transformação<br>angular (arco-seno)           |
| A - FRESCO<br>(controle)                  | $\bar{X} = 93,68 \pm 3,29$<br>CV = 3,51%   | $\bar{X} = (76,06) \pm (4,15)$<br>CV = 5,46%   |
| B - DILUÍDO<br>RESFRIADO                  | $\bar{X} = 86,48 \pm 6,99$<br>CV = 8,08%   | $\bar{X} = (68,83) \pm (5,57)$<br>CV = 1,51%   |
| C - CONGELADO E<br>DESCONGELADO<br>RÁPIDO | $\bar{X} = 36,18 \pm 16,25$<br>CV = 44,91% | $\bar{X} = (36,51) \pm (10,26)$<br>CV = 28,10% |
| D - CONGELADO E<br>DESCONGELADO<br>LENTO  | $\bar{X} = 31,86 \pm 8,07$<br>CV = 25,33%  | $\bar{X} = (34,22) \pm (5,05)$<br>CV = 14,76%  |
| Tukey $\Delta = 18,43$<br>1%              |                                            |                                                |

#### 4. CONCLUSÕES

1. Não houve diferença significativa entre as taxas de fertilidade obtidas com sêmen fresco e sêmen diluído resfriado, demonstrando equilíbrio osmótico entre o diluidor e o sêmen, como também a refrigeração não danificou a célula espermática.

2. O descongelamento rápido ou lento

não interferiu na fertilidade.

3. A diversidade observada nas taxas de fertilização com sêmen congelado, quando comparadas com o sêmen fresco e com o sêmen diluído resfriado, indica a necessidade de mais estudos para detectar quais as variáveis interferentes.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAYNES, S.M. & SCOTT, A. P. 1987 Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, Amsterdam, 66: 53-67.
- COSER, A.M.L.; STOSS, J.; DONALDSON, E.M. 1988 Efeito da taxa de congelamento sobre o sêmen da truta selvagem (*Salmo gairdneri*). In: *Coletânea de resumos dos encontros da Associação Mineira de Aquicultura*, Brasília, p. 65.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M. Y. 1981 Avaliação qualitativa e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. In:

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A.; ARRUDA SOARES, H.; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. 1994 Congelamento do sêmen da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 21 (único): 55 - 60.

REUNÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 33, 8-15 jul. Salvador, 1981. *Resumos...* Salvador, SBPC, p. 620.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y. 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.; PENTEADO, I. 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.; VERÍSSIMO, R. 1989 Congelamento do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, em vapores de nitrogênio líquido. In: REUNÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 2, 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.

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.

HORTON, H. F. & OTT, A. G. 1976 Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 33:995-1000.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; 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.

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.

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

SCHMIDT - BAULAIN, R. & HOLTZ, W. 1989 Deep-freezing of rainbow trout *S. gairdneri* sperm at varying intervals after collection. *Theriogenology*, Germany, 32(32): 439-43.

SMITH, G. R. & STEARLY, R. F. 1989 The Classification and scientific names of rainbow and cutthroat trout. *Fisheries*, 14 (1): 4-10, Jan - Feb.

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

STEIN, H. & BAYRIE, H. 1978 Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4): 1073-6.

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.

WHEELER, P. A. & THORGAARD, G. H. 1991 Cryopreservation of rainbow trout semen in large straw. *Aquaculture*, Amsterdam, 93(1): 95-100.