

## PRIMEIROS RESULTADOS DE FERTILIZAÇÃO COM SÊMEN CONGELADO DA TRUTA ARCO-ÍRIS, *Salmo irideus* Gibbons, NO BRASIL

(First results of fertilization of deep frozen semen of rainbow trout, *Salmo irideus* Gibbons, in Brazil)

Washington FOGLI DA SILVEIRA 1  
Emico Taira KAVAMOTO 1  
Marcos Guilherme RIGOLINO 2  
Luiz Antonio PENTEADO 3  
Antonio Carlos CARVALHO FILHO 2

### RESUMO

No presente estudo verificou-se a possibilidade da congelação rápida em gelo seco e conservação em nitrogênio líquido do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus*, Gibbons. O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, São Paulo. Após trinta minutos de crio-preservação, o sêmen foi descongelado rapidamente e imediatamente adicionado a óvulos frescos recém coletados. Em quarenta testes, a porcentagem média de fertilização com sêmen congelado foi 10,55%, enquanto que, com o sêmen fresco utilizado como controle, foi igual a 77,57%. Investigações posteriores deverão ser conduzidas, a fim de se obter melhores resultados de fertilidade em condições práticas a nível de central de incubação.

### ABSTRACT

A study of freezing rainbow trout semen, *Salmo irideus* Gibbons, with dry ice and stored in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) was carried out at the Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, São Paulo. Thirty minutes after cryopreservation, the semen was thawed as rapidly as possible and immediately mixed with fresh eggs. In forty tests the average percent fertilization with cryo-preserved sperm was 10,55%, and with the control fresh semen was 77,5%. Further investigations will have to be conducted in order to achieve better fertility results under practical hatchery conditions.

## 1. INTRODUÇÃO

A conservação do sêmen sob refrigeração (4°C) contribuiu amplamente para a difusão da inseminação artificial entre os mamíferos domésticos, principalmente entre os bovinos. No entanto, após a introdução da glicerina como substância crioprotetora dos espermatozoides de aves e mamíferos, respectivamente por POLGE; SMITH; PARKES (1949) e SMITH & POLGE (1950), assim como, os resultados favoráveis de fertilização com sêmen congelado de bovinos por POLGE & ROWSON (1952), foi que decididamente a inseminação artificial teve o impulso desejado, principalmente com relação ao estu-

do do melhoramento genético e por conseguinte, a seleção de reprodutores de elevado padrão zootécnico e a implantação da técnica em milhares de rebanhos.

A literatura especializada sobre congelamento e crio-preservação do sêmen de peixes apresenta vários trabalhos que atingem sobretudo os salmonídeos. Dentre eles predominam os estudos sobre congelamento do sêmen de trutas, com resultados variáveis.

Mitchum 1963, apud HORTON E OTT (1976) trabalhou com a truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, congelando o sêmen tanto em gelo seco como em nitro-

(1) Pesquisadores Científicos - Seção de Biologia Aquática - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca.  
(2) Médicos Veterinários - Estação Experimental de Salmonicultura - Campos do Jordão - Instituto de Pesca.  
(3) Pesquisador Científico - Seção de Aquicultura - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca.

gênio líquido. Entretanto, os testes de fertilização foram negativos.

GRAYBILL & HORTON (1969) utilizaram equipamento automático com fluxo contínuo e controlado dos vapores de nitrogênio líquido, usando os métodos de congelamento rápido e lento para preservação do sêmen da truta arco-íris, *Salmo gairdneri*. Obtiveram 18% e 0% de óvulos fertilizados respectivamente aos dois métodos de congelamento citados. Com a mesma espécie de peixe, OTT & HORTON (1971b) conseguiram 59% de fertilizações quando empregaram sêmen congelado em nitrogênio líquido pela técnica rápida de abaixamento da temperatura.

ZELL (1978) comunicou 7% de fertilização com sêmen da truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, que fôra congelado em nitrogênio líquido pela técnica de congelamento lenta.

Os trabalhos sobre congelamento rápido em gelo seco do sêmen de truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, descritos por BUYUKHATIPOGLU & HOLTZ (1978), STOSS; BUYUKHATIPOGLU; HOLTZ (1978) apresentaram respectivamente, 30,90% e 26,00% de eclosões, enquanto que STEIN & BAYRLE (1978), STOSS & HOLTZ (1981 a,b) obtiveram respecti-

vamente, 81,90%, 81,10% e 87,10% de óvulos fecundados.

HOLTZ et alii (1976) com a mesma espécie de peixe conseguiram 9% de fertilização com sêmen congelado pelo método rápido, tanto em gelo seco como em nitrogênio líquido. Todavia, LEGENDRE & BILLARD (1980) alcançaram ao redor de 90% de fecundações tanto para o sêmen crio-preservado como para o sêmen fresco utilizado com o controle.

ERDHAL & GRAHAM (1978) descreveram 90% de eclosões quando utilizaram sêmen congelado pelo método rápido de três espécies de trutas. Não citaram qual o meio congelante empregado durante o congelamento.

Pela importância conferida a preservação do material fecundante sob congelamento profunda a  $-79^{\circ}\text{C}$  ou  $-196^{\circ}\text{C}$ , procuramos estudar a técnica de congelamento rápido empregando o gelo seco, a crio-preservação em nitrogênio líquido e verificar os resultados de fertilização, a fim de possibilitar a intensificação da reprodução dos planteis de peixes já existentes, com vistas sobretudo ao incremento da produção de espécies de valor econômico. Por outro lado, outros ensaios poderão ser conduzidos, principalmente àqueles dirigidos ao melhoramento genético.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido na Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, São Paulo, no período de junho a julho de 1981. Vinte reprodutores de truta arco-íris, *Salmo irideus*, Gibbons, com dois anos de idade, foram submetidos à coleta de sêmen através de massagem abdominal antero-posterior. O material espermático foi coletado em tubos de centrífuga graduados em décimos de ml, os quais foram colocados em recipientes contendo água ao redor de  $10^{\circ}\text{C}$ . Em seguida esse conjunto foi imerso em água a  $2^{\circ}\text{C}$  contida em recipiente de isopor.

Enquanto o sêmen permanecia sob refrigeração, efetuou-se a avaliação da motilidade e da concentração dos espermatozóides. Somente amostras apresentadas alta concentração e alta motilidade foram utilizadas para o congelamento.

Antes do congelamento, o sêmen foi diluído no meio preconizado por STEIN & BAYRLE (1978) com a seguinte composição:

NaCl = 750mg,  $\text{NaHCO}_3$  = 200 mg, KCl = 38 mg, glicose = 100 mg, gema de ovo = 20ml e dimetilsulfóxido = 10%. A diluição foi feita na proporção de 1:4 com o diluente e sêmen na mesma tempera-

tura (2°C). Em seguida, procedia-se ao exame microscópico da amostra, com objetivo de orientar sobre o aproveitamento do material.

O sêmen diluído permaneceu durante 15 (quinze) minutos sob refrigeração a 2°C (tempo de equilíbrio) para em seguida ser congelado.

Vinte amostras foram congeladas, gotejando-se 0,2 ml do material diretamente sobre a superfície de um bloco de gelo seco (-79°C). Desta forma, a temperatura do material declinou de 2°C a -79°C, obtendo-se assim os "pellets" (NAGASE & NIWA, 1964), os quais após 15 (quinze) minutos, foram imersos diretamente em nitrogênio líquido (-196°C). Em seguida foram transferidos para "container" especial, onde se processou a crio-preservação.

Ao fim de cada processo de crio-preservação que durou 30 minutos, alguns "pellets" eram descongelados em temperatura ambiente numa solução de bicarbonato de sódio a 1% (solução ativadora dos espermatozoides). Em seguida, as células espermáticas eram examinadas sob microscópio de contraste de fase para verificação da qualidade do material pós-congelamen-

to, após o que os "pellets" de cada reprodutor foram descongelados na proporção de 3 (três) "pellets" para 10 ml da solução acima citada e imediatamente adicionados a óvulos frescos.

Para o teste de fertilização, com sêmen fresco, utilizando óvulos de duas fêmeas de 3 a 4 anos de idade respectivamente, foram empregados em média 13 (treze) milhões de espermatozoides viáveis por óvulo, enquanto que, para o sêmen congelado essa quantidade foi aumentada para 44 (quarenta e quatro) milhões, considerando-se que havia mortalidade no processo de congelamento. A incubação, seguindo as normas clássicas recomendadas, foi conduzida em separado para o sêmen fresco e para o sêmen congelado, constituindo-se um grupo controle e um grupo teste.

O índice de fertilidade foi calculado pela relação entre número de ovos embrionados e número de ovos incubados.

A análise estatística dos dados consistiu na aplicação do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), (GOLDSTEIN, 1965), utilizando-se as porcentagens de fertilização, tendo sido estabelecido o nível de 5% para rejeição ou não, da hipótese de nulidade ( $H_0$ ).

### 3. RESULTADOS

As vinte coletas de sêmen apresentaram em média as seguintes características:

- a) volume (ml) - 8,2
- b) concentração de espermatozoides/  
 $\text{mm}^3 - 6 \times 10^6$
- c) formas variáveis (%) - 69

#### 3.1 Sêmen congelado

Houve sempre alta motilidade do sêmen diluído antes do congelamento, evidenciando o pleno equilíbrio entre o sêmen e o meio diluidor.

Foram congelados 793 "pellets", dos quais, 581 foram utilizados para a fer-

tilização artificial.

O limite máximo de tempo de descongelamento dos "pellets" na solução ativadora de bicarbonato de sódio a 1%, não deve exceder a 30 (trinta) segundos (STEIN & BAYRLE, 1978). Neste trabalho o tempo de descongelamento ultrapassou esse limite, evento que, provavelmente, reduziu consideravelmente o número necessário e pré-calculado de espermatozoides viáveis por óvulo a ser fecundado. Verifica-se esse fato pela grande variação da fertilidade quando se comparam os dados contidos na TABELA 1.

TABELA 1

Porcentagem de ovos embrionados de truta arco-íris, *Salmo irideus* - Gibbons, após fertilização com sêmen congelado - junho a julho de 1981.

Nº do reprodutor	FÊMEA DE 3 ANOS DE IDADE			FÊMEA DE 4 ANOS DE IDADE			médias (%)	
	Nº do "pellets"	Nº de ovos incubados	Nº de ovos embrionados	fertilidade (%)	Nº de "pellets"	Nº de ovos incubados		Nº de ovos embrionados
02	13	118	5	4,24	13	118	24	20,34
03	13	129	24	18,60	13	149	47	31,54
04	15	139	25	17,99	15	177	26	14,69
05	11	125	9	7,20	11	128	27	21,09
06	16	137	20	14,60	16	129	19	14,73
08	14	122	21	17,21	14	132	12	9,09
09	8	167	20	11,98	8	119	36	30,25
10	12	200	18	9,00	12	156	23	14,74
11	12	174	14	8,05	12	126	12	9,52
12	11	178	5	2,81	11	159	7	4,40
13	11	176	62	35,23	11	192	19	9,90
14	16	151	14	9,27	16	182	16	8,79
15	15	182	23	12,64	15	195	13	6,67
16	22	149	10	6,71	22	129	6	4,65
17	21	136	5	3,68	21	197	6	3,05
18	13	142	4	2,82	13	175	3	1,71
19	20	118	7	5,93	20	144	7	4,86
20	15	188	27	12,23	15	152	6	3,95
21	15	106	3	2,83	15	232	17	7,33
22	18	149	1	0,67	18	183	11	6,01
TOTAL GERAL		2986	313	10,48		3174	337	10,62
								10,55

Devido a rápida mortalidade dos espermatozoides pós-congelamento, não foi possível avaliar com segurança a nível microscópico, a porcentagem de células viáveis.

A taxa média de fertilidade foi 10,48% e 10,62%, respectivamente, às fêmeas de 3 a 4 anos de idade, valores estes que dispensam qualquer tratamento estatístico para revelar diferença não significativa entre os mesmos. Assim, num total

de 40 (quarenta) testes a média geral de fertilização das fêmeas de 3 e 4 anos, foi 10,55%.

### 3.2 Sêmen fresco

Quanto ao sêmen fresco utilizado como controle, verifica-se pelos dados da TABELA 2 que existe uma certa regularidade nas taxas de fertilidade.

TABELA 2  
Porcentagem de ovos embrioados de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, após fertilização com sêmen fresco - junho a julho de 1981.

Nº do reprodutor	FÊMEA DE 3 ANOS DE IDADE				FÊMEA DE 4 ANOS DE IDADE				média (%)
	em média a por óvulo (x 10 <sup>6</sup> )	Nº de ovos incubados	Nº de ovos embrioados	fertilidade (%)	Nº de esp. vivos em média por óvulo (x 10 <sup>6</sup> )	Nº de ovos incubados	Nº de ovos embrioados	fertilidade (%)	
02	20,93	105	98	93,33	18,95	116	94	81,03	87,18
03	17,08	121	105	86,78	20,27	102	87	85,29	86,04
04	16,67	137	112	81,75	13,67	147	126	85,71	83,73
05	16,90	119	89	74,79	15,71	128	113	88,28	81,54
06	14,15	141	134	95,03	16,63	120	103	85,83	90,43
08	14,75	130	98	75,38	13,13	146	130	89,04	82,21
09	10,16	206	132	64,08	16,88	124	99	79,84	71,96
10	11,58	189	107	56,61	18,55	118	74	62,71	59,66
11	9,94	230	150	68,18	15,84	138	64	46,38	57,28
12	13,00	186	147	79,63	13,33	156	101	64,34	71,89
13	8,74	227	210	92,50	8,66	229	181	79,04	85,77
14	11,03	178	148	83,14	10,55	186	131	70,43	76,79
15	13,58	145	132	91,03	10,10	195	161	82,56	86,80
16	11,19	174	126	72,41	10,82	180	117	65,00	69,71
17	13,85	143	119	83,21	12,07	164	144	87,80	85,51
18	11,21	175	134	76,57	12,65	155	100	65,81	71,19
19	13,70	143	109	76,22	10,36	189	156	82,54	79,38
20	14,12	136	123	90,44	13,52	142	104	73,24	81,84
21	13,07	129	87	67,44	12,30	158	127	80,58	73,91
22	16,10	121	105	86,77	9,69	201	145	72,14	79,46
TOTAL GERAL	$\bar{X} = 13,59$	3125	2465	$\bar{X} = 78,88$	$\bar{X} = 13,80$	3094	2359	$\bar{X} = 76,24$	77,57

Do emprego de  $13 \times 10^6$  espermatozói-  
de viáveis por óvulo, em média, a taxa de  
fertilização média para fêmeas de 3 anos de  
idade foi 78,88% e 76,24% para as de  
4 anos, resultado esse que não diferiu signi-  
ficativamente ao nível de 5% de probabili-  
dade. Assim nos 40 testes realizados, obte-

ve-se uma porcentagem média de 77,57%.

Pelos dados de fertilização calculados,  
utilizando-se sêmen fresco (77,57%) e con-  
gelado (10,55%) observa-se uma diferença  
significativa à favor do sêmen fresco ao ní-  
vel de 5% (teste  $\chi^2$ ).

## 4. DISCUSSÃO

Os resultados com sêmen congelado  
revelaram uma taxa de fertilidade geral  
média de 10,55% em quarenta testes que,  
em termos médios, aproxima-se daqueles  
obtidos por HOLTZ et alii (1976) que con-  
seguiram 9% de fertilização e dos ensaios  
de Mitchum 1963, apud HORTON &  
OTT (1976); diferem, porém dos resulta-  
dos de GRAYBILL & HORTON (1969),  
OTT & HORTON (1971 b) que obtiveram  
respectivamente, 18% e 59% de fertiliza-

ção e de BUYUKHATIPOGLU & HOLTZ  
(1978), STOSS; BUYUKHATIPOGLU;  
HOLTZ (1978) que verificaram 30,9% e  
26% de eclosões respectivamente.

A diferença foi considerável quanto  
se compararam as fertilizações obtidas por  
STEIN & BAYRLE (1978) de 81,9%;  
STOSS & HOLTZ (1981 a,b) de 80,1%  
e 87,1% e LEGENDRE & BILLARD  
(1980) de 90%.

O sêmen fresco apresentou caracte-

rísticas adequadas para o seu aproveitamento, revelada ademais pela taxa de ovos embrionados obtida.

Em vistas dos resultados obtidos, pesquisas de crio-preservação deverão ainda

ser conduzidas, a fim de se conseguir uma técnica factível de ser utilizada na rotina da reprodução artificial, aliada a uma fertilidade condizente com os parâmetros econômicos das centrais de incubação.

## 5. CONCLUSÃO

A taxa de fertilização com sêmen congelado foi em média 10,55%, resultado este

que revela a possibilidade da crio-preservação do sêmen da truta arco-íris.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Profa. Dra. Massiao Mizuno Ishizuka do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Ani-

mal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela análise estatística dos dados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUYUKHATIPOGLU, S. & HOLTZ, W. 1978 Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*, Amsterdam, 14(1):49-56, May.
- ERDAHL, D. & GRAHAM, E.F. 1978 Cryopreservation of Salmonid Spermatozoa. *Cryobiology*, New York, 15(3):362-64.
- GOLDSTEIN, A. 1965 *Biostatistics: an introductory text*. 2ed. New York, Macmillan, 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.
- HOLTZ, W. et alii 1976 Preservation of trout spermatozoa for varying periods. In: FAO TECHNICAL CONFERENCE ON AQUACULTURE, 2 May - 2 June, Kioto, p. 1-3.
- HORTON, H.F. & OTT, A.G. 1976 Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 33: 995-1000.
- LEGENDRE, M. & BILLARD, R. 1980 Cryoconservation du sperm de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bull. Fr. Pisc.*, Paris, 53 (278):11-33, juil-sept.
- NAGASE, H. & NIWA, T. 1964 Deep freezing bull semen in concentrated pellet form I. Factors affecting survival of spermatozoa. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE PER LA RIPRODUZIONE ANIMALE E LA FECONDAZIONE ARTIFICIALE, 5, 6-13 set., Trento, p. 410-15.
- OTT, A.G. & HORTON, H.F. 1971b Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryopreserved sperm<sup>1</sup>. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 28(12): 1915-18, Dec.
- POLGE, C. & ROWSON, L.E.A. 1952 Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. *Nature*, London, 169: 626-27, Apr.
- ; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, London, 164: 666, Oct.
- SMITH, A.U. & POLGE, G. 1950 Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *The Veterinary Record*, London, 62(9):115-16, Mar.
- STEIN, H. & BAYRLE, H. 1978 Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleostes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4): 1073-76. (Int. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21 Sep., 1977).
- STOSS, J.; BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. 1978 Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4):1077-82. (Int. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21 Sep., 1977).
- 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.
- STOSS, J. & HOLTZ, W. 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.
- ZELL, S.R. 1978 Cryopreservation of gametes and embryos of salmonid fishes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4):1089-99. (Int. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21 Sep., 1977).