

FERTILIDADE DO SÊMEN DA TRUTA ARCO-ÍRIS, *SALMO IRIDEUS* GIBBONS,  
EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZÓIDES POR OVULO.

(Fertility of rainbow trout *Salmo irideus* Gibbons semen, diluted at various levels.)

Washington FOGLI DA SILVEIRA<sup>1</sup>  
Enrico Tabira KAVAMOTO<sup>1</sup>  
Marcos Guilherme RIGOLINO<sup>2</sup>  
Yara Aiko TABATA<sup>2</sup>

RESUMO

O presente experimento foi conduzido na Estação Experimental de Salmoicultura de Campos do Jordão, SP (22°45'S e 45°30'W) e teve como finalidade básica verificar qual a quantidade mínima de espermatozóides viáveis à fertilização de um óvulo de truta arco-íris, *Salmo irideus*, no período reprodutivo de 1985. Foram efetuadas várias diluições de um pool de sêmen de quatro machos, com plasma seminal, obtendo-se um mínimo de  $10 \times 10^3$  e um máximo de  $10 \times 10^6$  espermatozóides por óvulo. Após a fertilização artificial, verificou-se pela análise dos dados que os melhores resultados de fertilidade foram obtidos a partir de 200 mil espermatozóides por óvulo (80,83%). Concluiu-se que o trabalho além de subsidiar a rotina de reprodução artificial com sêmen fresco ou congelado, revelou a possibilidade em limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e propiciar uma redução nos custos de produção.

ABSTRACT

This experiment was carried out at Trout Culture Experimental Station of Campos do Jordão, São Paulo, Brazil (22°45'S and 45°30'W) in order to determine the minimum amount of alive spermatozoa necessary to fertilize one egg of rainbow trout, *Salmo irideus*, during the reproductive season of 1985. Various dilution levels were done with a semen pool of the four males, with seminal plasma, so that the lower density was  $10 \times 10^3$  and the higher density was  $10 \times 10^6$  sperm cell/egg. The best results of fertilization were obtained from 200,000 sperm/egg (80,83%) upwards. The present investigation will improve the artificial reproduction with fresh or frozen semen, the possibility to reduce the stock males at the intensive fisheries, rational exploration of selected sires and will decrease the production cost.

1. INTRODUÇÃO

A avaliação das características seminais é importante na rotina da reprodução artificial em qualquer espécie animal. A quantidade de espermatozóides vivos é que determina se um sêmen deve ou não ser aproveitado, tendo em vista que se deve procurar um máximo de óvulos fertilizados com um número mínimo de espermatozóides. Salisbury et alii apud SALISBURY & VANDEMARK (1964) conduziram uma série de experimentos com sêmen de bovinos e verificaram que em touros de fertilidade conhecida foram necessários um mínimo de 5 a 10 milhões de espermatozóides viáveis para se obter uma taxa ótima de fertilidade. Billard et alii, apud BLAXTER (1974) conseguiram na truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, 80,42% de óvulos

fertilizados com 200 mil espermatozóides para fecundar um óvulo e na mesma espécie FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984) fixaram a média de 13 milhões de espermatozóides por óvulo e obtiveram 78% fertilizados.

Este trabalho tem por objetivo determinar qual a quantidade mínima desejável de células espermáticas por óvulo através da avaliação das taxas de fertilização obtidas com sêmen fresco diluído contendo diferentes concentrações de espermatozóides com vistas a melhores resultados de fertilidade com sêmen fresco e/ou congelado. Consequentemente pode-se limitar o estoque de machos em piscicultura intensiva e uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados.

(1) Pesquisadores Científicos - Seção de Biologia Aquática - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca.  
(2) Pesquisadores Científicos - Estação Experimental de Salmoicultura de Campos do Jordão - Instituto de Pesca.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão, São Paulo, no período reprodutivo de 1985. Quatro exemplares machos e três exemplares fêmeas de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, com dois anos de idade foram submetidos a coleta de sêmen e óvulos, respectivamente. Constituíram-se um pool de sêmen e um pool de óvulos. O material espermático foi examinado em microscopia de contraste de fase (400 x) para avaliação quali-quantitativa e logo após sofreu várias diluições em plasma seminal obtido por centrifugação (3.000 r.p.m.) do sêmen proveniente de outros exemplares. Assim, conseguiram-se concentrações que variaram de  $10 \times 10^3$  até  $10 \times 10^6$  espermatozoides viáveis. Em copos de plástico transparentes, foram separadas 102 parcelas do pool de óvulos contendo cada uma ao redor de 20 gametas. Ato contínuo, quantidades diferentes do pool de sêmen diluído, correspondentes às concentrações de espermatozoides pré estabelecidas, foram adicionadas a cada parcela de óvulos, onde processou-se a fertilização. Em

seguida, após a hidratação dos ovos, por sorteio, cada parcela foi transferida às incubadoras que recebiam água em fluxo constante. Após dez dias de incubação, os ovos foram retirados das incubadoras e colocados em tubos de ensaio contendo solução de STOCKARD modificada (ácido acético = 5ml, glicerol = 5ml, formol = 5ml, água destilada = 85ml). O exame de 2.047 ovos foi efetuado através de microscópio estereoscópico (100 x) a fim de verificar a porcentagem de óvulos fertilizados.

O delineamento estatístico foi o de blocos casualizados com 17 (dezessete) tratamentos e 6 (seis) repetições cada (102 parcelas), sendo 16 (dezesseis) tratamentos em 96 parcelas testes, constituídos de concentrações de espermatozoides viáveis que variaram de  $10 \times 10^3$  a  $10 \times 10^6$  e, 1 (um) tratamento em 6 (seis) parcelas controles contendo  $14 \times 10^7$  espermatozoides por óvulo do pool de sêmen fresco não diluído.

Para avaliar se houve diferença de fertilidade entre tratamentos, aplicou-se o teste de TUKEY ao nível de 1% de probabilidade (PI-MENDEL GOMES, 1966).

## 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados de fertilidade obtidos com diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo encontram-se individualizados na TABELA 1. Nesta tabela pode-se observar que acima de 200 mil espermatozoides por óvulo o número de ovos embrionados foi superior em relação às concentrações contendo abaixo de 100 mil células espermáticas por óvulo. Observa-se ainda pela aplicação do teste de TUKEY ( $\Delta = 7,01$ ) nos tratamentos contendo concentrações acima de 200 mil espermatozoides que não houve diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade. Concorda com o resultado descrito por FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984) que na truta arco-íris, *Salmo irideus*, obtiveram a média de 78% de fertilidade quando utilizaram em média 13 milhões de espermatozoides por óvulo.

A concentração de 200 mil espermatozoides apresentou 80,83% de fertilização, aproximando-se do resultado de BILLARD et alii apud BLAXTER (1974) que na truta arco-íris, *Salmo gairdneri* obtiveram 80,42% de ovos fertilizados quando empregaram a mesma concentração.

Os tratamentos contendo de 10 a 100 mil espermatozoides apresentaram porcentagens de fertilidade que variaram de 19,17% a 49,17%, respectivamente (TABELA 1). Estes valores diferem daqueles de BILLARD et alii apud BLAXTER (1974), que encontraram 69,48% a 67,63% de fertilização empregando, respectivamente, ao redor de 20 a 150 mil células espermáticas por óvulo.

O tratamento controle com 140 milhões de espermatozoides que apresentou uma taxa de 65% de fertilidade e efetuado no fim do

TABELA 1

Número de espermatozoides por óvulo, ovos embrionados por parcela, total e média de ovos embrionados por tratamento, porcentagem de fertilidade da truta arco-íris, *Salmo irideus*, no período reprodutivo de maio a agosto de 1985 (Campos do Jordão).

| Tratamentos | Nº de espermatozoides por óvulo | Nº de ovos embrionados em cada parcela |     |     |     |     |     | ovos incubados | ovos embrionados | média de ovos embrionados | fertilidade (%)   |
|-------------|---------------------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|------------------|---------------------------|-------------------|
|             |                                 | 1                                      | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |                |                  |                           |                   |
| B           | 8.000.000                       | 16                                     | 18  | 17  | 20  | 17  | 18  | 121            | 106              | 17,67                     | 87,60             |
| E           | 2.000.000                       | 18                                     | 9   | 19  | 17  | 19  | 20  | 120            | 102              | 17,00                     | 85,00             |
| I           | 400.000                         | 17                                     | 15  | 17  | 17  | 17  | 17  | 124            | 100              | 16,67                     | 80,65             |
| H           | 600.000                         | 17                                     | 14  | 17  | 17  | 15  | 19  | 120            | 99               | 16,50                     | 82,50             |
| A           | 10.000.000                      | 12                                     | 15  | 18  | 17  | 17  | 19  | 119            | 98               | 16,50                     | 82,35             |
| F           | 1.000.000                       | 16                                     | 11  | 15  | 20  | 18  | 17  | 120            | 97               | 16,17                     | 80,83             |
| J           | 200.000                         | 15                                     | 12  | 17  | 18  | 17  | 18  | 120            | 97               | 16,17                     | 80,83             |
| C           | 6.000.000                       | 11                                     | 14  | 18  | 20  | 15  | 15  | 119            | 93               | 15,50                     | 78,15             |
| D           | 800.000                         | 12                                     | 18  | 18  | 10  | 17  | 18  | 120            | 93               | 15,50                     | 77,50             |
| G           | 4.000.000                       | 18                                     | 9   | 20  | 18  | 5   | 18  | 119            | 88               | 14,67                     | 73,95             |
| K           | 100.000                         | 8                                      | 10  | 12  | 14  | 6   | 9   | 120            | 59               | 9,83                      | 49,17             |
| M           | 60.000                          | 9                                      | 13  | 9   | 9   | 9   | 8   | 121            | 57               | 9,50                      | 47,11             |
| L           | 80.000                          | 9                                      | 13  | 7   | 8   | 14  | 5   | 120            | 56               | 9,33                      | 47,07             |
| N           | 40.000                          | 6                                      | 12  | 8   | 6   | 6   | 7   | 122            | 45               | 7,50                      | 36,89             |
| O           | 20.000                          | 2                                      | 6   | 1   | 10  | 5   | 9   | 122            | 33               | 5,50                      | 27,05             |
| P           | 10.000                          | 6                                      | 5   | 1   | 3   | 3   | 5   | 120            | 23               | 3,83                      | 19,17             |
| Controle    |                                 |                                        |     |     |     |     |     |                |                  |                           |                   |
| Q           | 140.000.000                     | 8                                      | 13  | 15  | 16  | 13  | 13  | 120            | 78               | 13,00                     | 65,00             |
|             |                                 | 200                                    | 207 | 229 | 240 | 213 | 235 | 2.047          | 1.324            | $\bar{x} = 12,98$         | $\bar{x} = 64,68$ |

TUKEY  
 $\Delta(1\%) = 7,01$

experimento com sêmen não diluído, foi inferior às taxas obtidas com 200 mil a 10 milhões de espermatozoides (TABELA 1). Este resultado encontra-se entre os valores descritos por Billard et alii apud BLAXTER (1974), que obtiveram com sêmen controle 66,9% a 64,1% de fer-

tilização no início e no fim do experimento, respectivamente. Esses mesmos autores, relataram que espermatozoides em excesso quando misturados aos óvulos apresentaram uma taxa de fertilidade significativamente inferior em relação às concentrações menores.

#### 4. CONCLUSÃO

Nas condições em que se realizou o experimento, duzentos mil espermatozoides foi o número mínimo necessário à fecundação

de um óvulo com uma taxa de fertilidade considerada ótima para as centrais de incubação.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Pesquisador Científico Dr. Henrique Arruda Soares, da Seção de Aquicul-

tura do Instituto de Pesca, pela valiosa colaboração prestada à análise estatística dos dados.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILLARD, R.; PETT, J.; JALABERT, R. & SZOLLOSI, D. 1974 *Artificial insemination in trout using a sperm diluent*. In: J. H. S. BLAXTER (Editor). *The early life history of fish*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 715-73.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; PENFADO, 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, dez.
- PIMENTEL GOMES, F. 1966 *Curso de Estatística Experimental*, 3ª ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 404 p.
- SALISBURY, G. W. & VANDEMARK, N. L. 1964 *Fisiología de la reproducción artificial de los boidos*. Trad. D. José María Santiago Luque, Zaragoza. ACRIBIA. 707 p. Original inglês.