

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL TECNOLOGIA EM AQUICULTURA CONTINENTAL

Determinação da concentração espermática para melhor taxa de fertilização do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*)

Ricardo de Matos Moraes

Biólogo

Goiânia
2009

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA EM AQUICULTURA CONTINENTAL

Determinação da concentração espermática para melhor taxa de fertilização do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*)

Mestrando: Ricardo de Matos Morais
Orientadora: Profa. Dra. Delma Machado Cantisani Padua

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional – Tecnologia em Aquicultura Continental, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Aquicultura Continental.

Goiânia
Março - 2009

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ - REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL TECNOLOGIA EM AQUICULTURA CONTINENTAL

TÍTULO: Determinação da concentração espermática para melhor taxa de fertilização do híbrido tambacu (*Collossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*)

Autor: Ricardo de Matos Morais

Defesa Pública de Dissertação DEFENDIDA e APROVADA, na cidade de GOIÂNIA – GO, em 13 de Março de 2009, pela banca constituída pelos professores:

Profª. Dra. DELMA MACHADO CANTISANI PÁDUA
Universidade Católica de Goiás – Orientadora

Prof. Dr. BRENO DE FARIA E VASCONCELLOS
Universidade Católica de Goiás – Avaliador Interno

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO ALMEIDA DE ANDRADE
CEFAI - Hidrolândia – Avaliador Externo

Goiânia
2009

DEDICO

A minha esposa Daniella Paula, que nos momentos de maior angústia, com a sensação de que nada está dando certo, sabiamente me mostrou que existem alternativas para o acerto.

Meu sogro Sebastião Alves Carvelo, que me oportunizou o conhecimento prático da piscicultura.

Aos meus irmãos Claudio de Matos e Marcos Paulo, que sempre me incentivaram.

Aos meus queridos pais: Divino Alves de Moraes e Antônia de Matos Moraes, apoio, incentivo e confiança depositada.

A minhas filhas Gabriella e Giovanah Paula, que carinhosamente me distraía nos momentos de desespero.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Delma Machado Cantisani Padua, grande responsável por me mostrar o mundo da redação científica, e de forma sábia, como uma mãe, ao seu modo, segurou em minhas mãos e me conduziu a este momento tão sonhado. OBRIGADO MINHA MÃE CIENTÍFICA.

Aos Professores do MPAC, em especial: Dr. Breno Vasconcelos, Dr. Maria Eloisa e Dra. Ana Christina que muito contribuíram, não só com suas aulas ministradas, mas principalmente pelo apoio e carinho do ombro amigo quando precisei.

A minha Co-orientadora Prof. Dra. Maria Lúcia Gambarine Meirinhos, que sempre esteve receptiva as minhas dúvidas apresentadas.

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Dr José Ricardo Almeida de Andrade e MSc Fernando, pela correção e preciosos apontamentos que conduziram ao aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao Prof. Dr Mauro que juntamente com seu filho Rogério, permitiu que parte da pesquisa ocorresse na piscicultura de sua propriedade.

Ao conterrâneo e amigo João “Caranha”, ter abraçado nosso projeto, disponibilizando a Estação Ambiental de Firminópolis para realização desse trabalho. Além de contribuir de forma efetiva com aprendizado prático sobre reprodução de peixes.

Aos novos amigos: Cabral, Ivani, Janeth, Coraci, Shaytner, Marcos, Caroline, Vendrúscolo, Maria de Fátima e aos colaboradores Arlindo, Nilva e Chistiane pelo incentivo e amizade plantada.

Ao amigo Guthembeghe Kirk, fundamental, prestativo, você é co-autor desse momento.

A Profa. Fernanda Maria Hermógenes, que gentilmente ofertou todo seu conhecimento e domínio da língua estrangeira, para que este trabalho fosse concluído.

Ao colega, amigo, irmão e futuro compadre Allan Soares Machado, pelos momentos de sabedoria, incentivo e apoio.

A DEUS e todos os santos que nunca me desamparou durante esses 24 meses de dedicação.

A todos aqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que esse momento acontecesse.

SUMARIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Caracterização das espécies	14
2.2 Biologia reprodutiva de peixes reofílicos	15
2.3 Células germinativas	16
2.3.1 Ovócitos	16
2.3.2 Espermatozóide	16
2.4 Desenvolvimento gônadal	18
2.5 Reprodução induzida	19
2.5.1 Seleção dos reprodutores	19
2.5.2 Hipofisação	20
2.5.3 Fertilização	20
2.6 Dose mínima inseminante	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Local e período	23
3.2 Captura e seleção dos reprodutores	23
3.3 Instalações	24
3.4 Qualidade da água	25
3.5 Hipofisação	25
3.6 Coleta de espermatozoides	25
3.7 Avaliação qualitativa do sêmem	25
3.7.1 Análise macroscópica	25
3.7.2 Análise microscópica	26
3.8 Coleta dos ovócitos	26
3.9 Delineamento experimental	27
3.10 Fertilização e incubação dos ovos	27

3.11 Desenvolvimento dos ovos.....	27
3.12 Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Espermatozóides.....	29
4.2 Ovócitos.....	30
4.3 Fertilização.....	31
4.4 Qualidade da água.....	35
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7. ANEXOS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração espermática de algumas espécies neotropicais de água doce.(Adaptado Mojica, 2004).....	18
Tabela 2	Quantidade de espermatozóide por ovócito para melhor taxa de fecundação de algumas espécies já estudadas.....	22
Tabela 3	Tratamento x grama de ovo.....	27
Tabela 4	Tratamento: número de ovócitos por grama.....	31
Tabela 5	Resultados da percentagem de fecundação.....	32
Tabela 6	Razão ótima de espermatozoides (sptz) por ovócito de acordo com o tamanho dos ovócitos em algumas espécies.....	34
Tabela 7	Resumo da análise de variância, coeficientes de variação e médias por quadrados mínimos do n de ovos fecundados do tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1	Porcentagem de ovos fecundados de tambacu (<i>Colossoma macropomum</i> X <i>Piaractus mesopotamicus</i>)	32
----------	--	----

RESUMO

As técnicas de reprodução artificial através da indução reprodutiva de peixes que habitam águas correntes (reofílicos), faz parte do cotidiano nas pisciculturas de Goiás. Estas técnicas devem ser aprimoradas para que se tenha melhor taxa de fertilização espermatozóides/ovócitos. O híbrido tambacu é um dos peixes mais cultivados no Brasil, oriundo do cruzamento da fêmea do tambaqui (*Colossoma macropomum*) com macho de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pois tolera melhor as baixas temperaturas, e apresenta crescimento mais rápido que o pacu e tambaqui. Para determinar a melhor concentração espermática de fertilização do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*), foi selecionado uma fêmea de tambaqui com maturação gonadal avançada, abdômem abaulado e papila genital avermelhada e um macho de pacu com saída de sêmem mediante leve massagem abdominal no sentido ântero-posterior. A fêmea e o macho foram induzidos a reprodução com extrato de hipófise: fêmea (1° dose 0,5mg/kg e 2° dose 5mg/kg), macho (dose única de 3mg/kg). A fêmea liberou 654g de ovócitos contendo 1560 ovócitos/g, com uma razão de 170.040 ovócitos/kg, os ovócitos foram distribuídos em 5 tratamentos com três repetições: T1=1g, T2=1,5g, T3=2g, T4=2,5g, e T5=3g. O macho produziu 2ml de sêmem com 10×10^9 espermatozóides/ml com mais de 90% de motilidade. Para fertilização utilizou-se 20 μ l de sêmem fresco em cada repetição (T1=128.205, T2=85.470, T3=64.102, T4=51.282, T5=42.735 espermatozóides/ovócitos). Após 11 horas de incubação foram analisadas as taxas de fertilização para cada tratamento. A melhor relação espermatozóide/ovócito foi encontrado no T4=51.282 espermatozóides/ovócitos. Para melhor taxa de fertilização do híbrido tambacu é recomendado 1 ml do sêmem de pacu para cada 125g de ovócito do tambaqui

Palavras-chave: fertilização, tambacu, espermatozóide, ovócitos.

ABSTRACT

The techniques of artificial reproduction by inducing reproductive fish that inhabit running waters (reofilicos) is part of everyday life in the fish farms in Goiás. These techniques must be refined in order to provide a better fertilization rate of sperm/oocyte. The hybrid tambacu is one of the most grown fish in Brazil, from the cross of tambaqui's female (*Colossoma macropomum*) and pacu's male (*Piaractus mesopotamicus*), because it stands better low temperatures, and it shows faster growth than pacu and tambaqui. In order to determine a better sperm concentration of tambacu's cross-bred fertilization (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*), it was selected tambaqui's female with advanced gonadal maturation, domed abdomen and redish genital papilla and a pacu's male with semen output by light abdominal massage in the anterior-posterior sense. The female and the male were prompted to reproduction with pituitary extract: female (1^o dose 0,5 mg/kg and 2^o dose 5mg/kg), male (single dose 3mg/kg). The female released 654g of oocytes with 1560 oocytes/g, with a reason of 170.040 oocytes/kg, the oocytes were distributed in 5 treatments with three repetition: T1=1g, T2=1,5g, T3=2g, T4=2,5g e T5=3g. The male produced 2ml of semen with 10×10^9 sperm/ml with more than 90% of motility. For fertilization were applied 2 μ l of fresh semen in each repetition (T1=128.205, T2=85.470, T3=64.102, T4=51.282, T5=42.735 sperm /oocyte). After 11 hours of incubation were analyzed the fertilization rates for each treatment. The best connection sperm/oocyte was found in T4=51.282 sperm/oocyte. For a better fertilization rate of the hybrid tambacu it is recommended 1ml of pacu's semen for each 125g of tambaqui's oocyte.

Key words: fertilization, tambacu, sperm, oocyte.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o crescente interesse pela criação de organismos aquáticos torna imperativo que os criadores aprimorem as técnicas necessárias para assegurar o êxito da criação e reprodução dos peixes, especialmente no Brasil, onde alguns peixes nobres nativos são reofílicos, impedindo assim que esses se reproduzam em cativeiro sem a indução técnica, com destaque para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

O tambaqui destaca na piscicultura pelo rápido crescimento, carne de grande aceitação e hábito alimentar diversificado, aceitando bem a ração comercial, podendo ser criado em sistemas extensivos e intensivos.

O pacu, assim como o tambaqui, apresenta as características fundamentais para a piscicultura, porém ao contrário do tambaqui tem maior resistência a temperaturas inferiores a 24°C, apresentando ainda nessas condições bom apetite, característica não observada no tambaqui.

O híbrido tambacu oriundo do cruzamento da fêmea do tambaqui com macho de pacu tolera melhor as baixas temperaturas, e apresenta crescimento mais rápido que o pacu. No ano de 2007, a produção nacional de tambacu (10.854 t) superou a maioria da produção das espécies cultivadas no Brasil, pintado (1.592,5 t), híbrido tambatinga (2.028 t) e o piau (3.396,5 t); mas ainda é menor do que as produções de pacu (12.397 t) e tambaqui (30.598,5 t), IBAMA (2007).

As técnicas de reprodução artificial através, da indução reprodutiva de peixes que habitam águas correntes (reofílicos), faz parte do cotidiano das pisciculturas. Dos peixes produzidos, grande parte deles são peixes nativos. Em Goiás destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), o piau (*Leporinus* sp) e o híbrido tambacu (fêmea do tambaqui x macho do pacu).

As estações de piscicultura têm dificuldade em obter desova da totalidade dos peixes migradores brasileiros. Considerando-se a revisão apresentada por Zaniboni Filho e Barbosa (1996), onde são apresentados dados provenientes de trabalhos de pesquisa do setor produtivo, observa-se que das oito espécies brasileiras testadas, os valores positivos de desova variaram entre 50 e 90% dos peixes selecionados.

Para o piscicultor manter grande plantel de reprodutores, para garantir durante a estação de reprodução um aproveitamento de 50% é oneroso, esses custos podem ser minimizados a partir do momento que se tiver conhecimento da melhor razão entre espermatozoides/ovócito que assegure maior percentagem de fecundação, agregado ainda as seguintes informações: quantidade média de sêmem liberada em função do peso após indução hormonal para cada espécie, número de espermatozoides por ml de sêmem e pela quantidade média de ovócitos liberados na reprodução induzida por kg de fêmea.

Desta forma busca-se nesse trabalho a determinação da concentração espermática para melhor taxa de fertilização do híbrido tambacu, assegurando assim aos piscicultores a manutenção de um plantel equilibrado entre machos e fêmeas, uma maior percentagem de fertilização, além de facilitar seu manejo reprodutivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização das espécies

O **Tambaqui** (*Colossoma macropomum*), é um peixe originário da bacia do Rio Amazonas. Seu hábitat é caracterizado por águas ricas em nutrientes com temperatura média entre 25°C e 34°C, sendo capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (até 1mg/l), segundo Val et al.(1995). A alimentação natural da larva consiste em zooplâncton (cladóceros e copépodos), na fase juvenil, alimentam-se de invertebrados, passando a incorporar pequenas sementes na alimentação. Quando adultos, possuem dentes molariformes que lhe permitem triturar frutos, castanhas, sementes e caramujos, dentre outros alimentos que compõem sua dieta natural Waynarovich, (1986) ; Zanuy E Carrillo, (1987).

O **Pacu** (*Piaractus mesopotamicus*), espécie é encontrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai Godoy, (1975). Membro da família Characidae e da subfamília Serrasalminae, antigamente conhecido pelo nome específico de *Colossoma mitrei* Dias-Koberstein et al., (2005). Recebe outras denominações comuns, como caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu Urbinati & Gonçalves, (2005). De corpo ovalado e estreito como o tambaqui, o pacu pode atingir um metro de comprimento e ter até 20 kg. Com o dorso cinza-escuro e o ventre amarelo-dourado, na fase juvenil apresenta pintas sobre o corpo e é possuidor de dentes truncados e tricúspides CEMIG/CETEC, (2000). Segundo Dias-Koberstein et al. (2005), alimenta-se, basicamente, de folhas e de frutas de árvores, embora seja uma espécie onívora, o que leva a crer que tenha habilidade especial na digestão e na absorção de alimentos, ricos em carboidratos.

Quanto à reprodução o pacu apresenta desova total, realizando migração durante a estação seca, para a maturação das gônadas, e desova na época chuvosa, principalmente em novembro Urbinat & Gonçalves, (2005). Característica comum ao tambaqui.

Tambacu, híbrido produto do cruzamento entre a fêmea do tambaqui e o macho de pacu. Os genitores tambaqui e pacu têm o mesmo número de cromossomos ($2n=54$), distribuídos por grupos semelhantes, o que permite o pareamento e a formação de embriões normais Saracura & Castagnolli, (1990).

O cultivo do tambacu em viveiros, na densidade de 1 peixe/m², pode produzir até 2.212g, em 430 dias Melo & Pereira, (1994)

2.2 Biologia reprodutiva de peixes reofilicos

A maioria dos peixes tropicais desova várias vezes na vida, sendo este um processo que ocorre em intervalos que se repetem. Entre as espécies, os ovócitos podem maturar todos de uma única vez e serem liberados em um período do ano, sendo, portanto, produzidos em lote único, ou os ovócitos podem maturar em lotes distintos, sendo eliminados em intervalos durante a estação reprodutiva, ou ainda, sem sazonalidade. As espécies pertencentes ao primeiro grupo, de acordo com Bagenal (1978), são denominadas “desovadoras totais”, enquanto o segundo são “desovadoras múltiplas”.

Entre as espécies (tambaqui e pacu) de desova total presente nos rios tropicais brasileiros, o início da estação de cheias é o principal período de desova para peixes cujas larvas se alimentam nas planícies de inundação. A estratégia de realizar migrações entre os locais de alimentação e desova é bastante comum em peixes com desova total Ribeiro, 1983; Zaniboni-Filho, (1985). Esta estratégia de realizar migração permite que algumas espécies de peixes maximizem o aproveitamento do ecossistema, buscando os melhores locais para cada uma das etapas do ciclo de vida sendo regulada por ritmos endógenos mediados por fatores externos, tais como: variação de temperatura, mudanças cíclicas de luz (fotoperíodo), pressão da massa de água, pH, entre outras variáveis, que determinam o melhor período para a desova e proporcione grande sobrevivência da prole Waynarovich, (1986) ; Zanuy E Carrillo, (1987).

O sistema reprodutor é regido pelo eixo endócrino composto principalmente pelo hipotálamo, hipófise e gônadas. Ações de comando regulam a síntese e a liberação de hormônios na corrente sanguínea controlando, assim, o ciclo reprodutivo. Nesse processo, o sistema nervoso central (SNC) recebe e traduz para o cérebro os sinais advindos do meio ambiente que, por sua vez, são mediados pelos processos fisiológicos endógenos Redding E Patiño, (1993); Apud Zanuy E Carrillo, (1993).

2.3 Células germinativas

2.3.1 Ovócitos

Nos teleósteos como o tambaqui, a formação do ovócito (ovogênese) pode ser subdividida em diferentes fases: crescimento do ovócito incluindo a vitelogênese, maturação final e ovulação.

A fase vitelogênica caracteriza-se por estreita dependência de hormônios gonadotrópicos, rápido crescimento ovocitário e aumento extraordinariamente do seu tamanho Wallace e Selman, (1981). No citoplasma, encontram-se nesta fase, acúmulos de alvéolos corticais, gotas lipídicas e glóbulos de vitelo. Estes glóbulos constituem-se principalmente de proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, carboidratos, glicolipídios, ésteres graxos e carotenóides. Pelas características macroscópicas e microscópicas das gônadas, verifica-se que os ovários, após a fase jovem, passam durante um ciclo reprodutivo, por fases de desenvolvimento denominadas, repouso, maturação, maduro e esgotado Narahara, (1995).

Observa-se nos ovócitos maduros a presença da micrópila, pequena abertura localizada no pólo animal da célula, através da qual o espermatozóide penetra no ovócito maduro Laale, (1980).

A qualidade do ovócito é extremamente importante na piscicultura e pode ser definida como a capacidade do ovo em produzir larvas viáveis kjorsvik et al.,(1990) Ela pode ser afetada pela idade materna, nutrição, tempo de duração do ciclo na formação dos ovos, processo de maturação da ova, fator genético e fatores intrínsecos as propriedades do ovo.

2.3.2 Espermatozóide

Os espermatozoides dos peixes são imóveis nos testículos e no plasma seminal nas espécies de água doce. A motilidade é ativada quando o meio em que os espermatozoides se encontram torna-se hiposmótico, como a água do ambiente externo Cosson, (2004). A duração da motilidade dos espermatozoides dos peixes teleósteos de água doce com fertilização externa é bastante reduzida - entre um e dois minutos Billard & Cosson, (1992).

Os principais tipos de espermatozoides dos peixes incluem os de fecundação externa e os espermatozoides de fecundação interna, com ou sem acrossoma, uniflagelados

ou biflagelados Jamieson & Leung, (1991). Os espermatozoides de peixes apresentam pouca variação estrutural entre as espécies Jamieson, (1991), reflexo da evolução de mais de 550 milhões de anos Janvier, (1999). Assim como os espermatozoides de vertebrados, os espermatozoides de peixes podem ser divididos morfológicamente em cabeça, peça intermediária e cauda Nagahama, (1983). A cabeça dos espermatozoides de peixes é, na maioria dos grupos, destituída de acrossoma, o que é compensado pela presença da micrópila no córion do ovócito Cosson et al., (1999).

A cauda, ou flagelo, pode ainda ser subdividida em colo e peças intermediária, principal e terminal, assim como ocorre para os espermatozoides de mamíferos domésticos. O colo, ou peça de conexão, representa a inserção do corpo basal do flagelo à cabeça. A peça intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice responsável pela geração de energia necessária à propulsão mótil do espermatozoide Hafez, (2004).

A quantidade de sêmen (volume e número de espermatozoides) produzido por peixes varia de acordo com a espécie, o indivíduo e o método de coleta, entre outras variáveis. O tratamento hormonal aplicado algumas horas antes da coleta é comumente utilizado para se aumentar o volume de sêmen coletado. Esse tratamento facilita a coleta porque induz hidratação testicular que causa aumento do volume de sêmen. Porém, paralelamente, ocorre redução da concentração espermática Viveiros *et al.*, (2002). A concentração espermática (número de espermatozoides/mL de sêmen), parâmetro de importância em aquicultura, é altamente variável e depende da espécie e indivíduo.

A produção espermática de peixes é muito alta, devido ao grande número de divisões espermatogônicas. Os peixes produzem quantidade variável de gametas (tabela 1). Em algumas espécies, o macho produz 100 bilhões de espermatozoides/ano/kg do peso corporal ou mais de 1×10^9 espermatozoides/g de testículo/dia, o que é 10 vezes maior do que a produção relatada para mamíferos Billard, (1990a).

Tabela 1. Concentração espermática de algumas espécies neotropicais de água doce. (Adaptado Mojica, 2004)

Família / Espécie	Nome popular	Concentração espermática (espermatozóides x 10⁹/mL)	Autor(es)
Família Pimelodidae			
<i>Rhamdia quelen</i>	Jundiá Cinza	19,7	BOMBARDELLI et al (2006)
Família Characidae			
<i>Brycon insignis</i>	Piabanha	± 24,3	E. SHIMODA et al (2007)
<i>Brycon orbignyianus</i>	Piracanjuba	1 0 ± 4,3 – 14 ± 8,4	BEDORE (1999)
<i>Salminus maxillosus</i>	Dourado	4,3 – 10,8	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pacu-caranha	18,62 ± 3,31	MILIORINI et al 2002
		28,07 ± 8,2	FOGLI DA SILVEIRA et al. (1990)
		7,1 – 11,1	GODINHO & CÓSER (1995)
		36,6 ± 16,5 – 48,1 ± 38,6	BEDORE (1999)
Família Anostomidae			
<i>Leporinus elongatus</i>	Piapara	7,0 – 16,0	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Leporinus obtusidens</i>	Piapara	6,625 – 52,250	MURGAS et al. (1999)
Família Prochilodontidae			
<i>Prochilodus lineatus</i>	Curimbatá	34,19	KAVAMOTO et al. (1986)
		13,3 – 20,5	GODINHO & COSER (1995)
<i>Prochilodus marggravii</i>	Curimatá-pacu	19,2 – 26,6	GODINHO & CÓSER (1995)
Família Pimelodidae			
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	Surubim	8,0 – 16,0	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Rhamdia hilarii</i>	Bagre	55,8	FOGLI DA SILVEIRA et al. (1985)
		63,5	KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986)

2.4 Desenvolvimento gonadal

O desenvolvimento e maturação gonadal são influenciados diretamente pelos níveis de hormônios no sangue. No início do desenvolvimento gonadal ocorre aumento do nível de gonadotropina na hipófise e no plasma, atuando sobre os ovários para promover nos ovócitos o início da vitelogênese Zohar, (1989). A elevação da gonadotropina estimula também o aumento da concentração de testosterona e estrogênio Carolsfeld, (1989). Em seguida os níveis hormonais no plasma diminuem, porém o processo de vitelogênese continua. No final da vitelogênese, o nível de gonadotropina volta a crescer na hipófise e no plasma, assim como a testosterona e estrogênio do plasma.

Depois de concluída a vitelogênese, a atividade ovariana se torna mais reduzida e permanece em sintonia com as condições ambientais, para que a liberação dos ovócitos coincida com o período em que as proles terão maiores chances de sobrevivência. Essa fase é conhecida como “período de dormência” Weingartner e Zaniboni Filho, (2005).

Durante o “período de dormência”, quando as condições ambientais são propícias, tem início a etapa final de maturação gonadal. A fase final de maturação dos ovócitos é caracterizada pela migração da vesícula germinal (núcleo) para a periferia celular e a sua posterior desintegração, quando os ovócitos estão prontos para serem eliminados do envelope folicular Vazzoler, (1996). Se as condições ambientais não forem propícias ou ocorrer alguma alteração severa no meio inicia-se o processo de reabsorção celular, seguido do rearranjo gonadal.

2.5 Reprodução induzida

2.5.1 Seleção dos reprodutores

Um dos processos mais importantes da reprodução induzida está no critério de escolha dos peixes. Para seleção dos reprodutores são selecionados os peixes que apresentavam maturação gonadal descrita por Woynarovich & Hovart, 1983, nas fêmeas de tambaqui a maturação ocorre entre 4-5 anos, nos machos de pacu ocorre entre 3-4 anos.

A captura dos reprodutores é realizada com idade acima de 3 e 4 anos para machos e fêmeas, respectivamente, utilizando-se para a seleção, características extragenitais presentes no período de reprodução. A apresentação de abdômen abaulado e macio na parte posterior até a pélvis e papila genital proeminente e avermelhada são os critérios empregados para as fêmeas. Para os machos, o critério para maturidade sexual é a emissão de sêmen, de coloração branca e aparência densa, que flui com facilidade e abundância após leve pressão no abdômen Desarrollo, (1992).

2.5.2 Hipofisação

As fêmeas são hipofisadas em duas etapas, primeira dose de 0,5 mg de extrato de hipófise de carpa (EBHC)/kg de peixe. Decorridas 12 horas, é aplicado à dosagem final de 5mg EBHC/kg para as fêmeas e 3mg EBHC/kg de peixe para os machos (dose única). Lima e Goulding, (1998).

Nas fêmeas a dose preparatória ou primeira dose, corresponde a 10% da dose decisiva, responsável por acelerar o desenvolvimento das gônadas até o estágio da pré-ovulação. A dose decisiva ou segunda dose irá desencadear o processo da ovulação. O tempo entre a maturação final e a desova é variável de espécie para espécie, e também em função da temperatura da água. A fêmea do tambaqui desova entre 200 e 300 horas/grau Araujo-Lima & Gouding, (1998), variável de acordo com estágio de maturação da mesma. Nos machos a grande função do hormônio é de aumentar o volume de sêmen expelido.

2.5.3 Fertilização

As células espermáticas masculinas permanecem imóveis no testículo dos peixes devido à elevada concentração de potássio, de forma que, imediatamente após entrarem em contato com a água o potássio é diluído e as células são ativadas.

A motilidade do sêmen varia entre as diferentes espécies de peixes, porém, geralmente, é inferior a um minuto Harvey e Carolsfeld, (1993). De modo semelhante, os óvulos de diferentes espécies são ativados pelo contato com a água, iniciando o processo de hidratação, o que leva ao fechamento da micrópila, impedindo assim a entrada do espermatozóide. Considerando as características fisiológicas dos gametas, a fertilização a seco é o melhor método, onde óvulos e espermatozoides são retirados dos peixes, sem contato com água, misturando-os e somente depois se adiciona água.

O procedimento de fertilização a seco possibilita a vantagem de ampliar o tempo para o manejo dos gametas, permitindo assim, a separação e a quantificação da desova nas porções a serem estocadas em distintas incubadoras, além de aumentar a taxa de fertilização. Após a mistura dos óvulos com o sêmen, adiciona-se água para ativação dos gametas, porém, a quantidade a ser adicionada precisa ser bem dimensionada. A inclusão de muita água causa a diluição dos espermatozoides, e a diminuição da possibilidade de que encontrem a micrópila para a fertilização, da mesma forma que a quantidade insuficiente

pode causar a obstrução da micrópila pelo muco do ovário ou pelo contato de outro óvulo (Woynarovich e Horvách, (1983).

Contudo, de acordo com o diâmetro dos óvulos, fica claro que cada espermatozóide tem pouca chance de alcançar a micrópila que é única em cada óvulo, sendo necessário grande número de espermatozoides para ocorrer a fertilização em cada óvulo. O número de espermatozoides necessários para fertilizar um óvulo é relativamente alto e depende da espécie, variando até mesmo entre as espécies. Quando a fertilização é obtida usando-se proporção relativamente baixa de espermatozoides/ovo, juntamente com o fato da fertilização ocorrer durante curto período de motilidade, indica que a espécie tem alta capacidade de fertilização.

Trabalhos realizados com dourado (*Salminus brasiliensis*) têm demonstrado que a utilização do procedimento convencional de fertilização produz baixa taxa de fecundação, sendo recomendado maior volume da água de ativação – entre três a cinco vezes o volume de ovócitos – e decorridos 30 a 40 segundos do início da mistura deve ser adicionado um volume aproximado de cinco vezes o volume inicial para garantir elevada taxa de fecundação Weingartner e Zaniboni Filho, (2005).

Os ovos da maioria dos teleósteos são fertilizados externamente. Depois de passar através da micrópila, o espermatozóide penetra na membrana plasmática. Este processo ocorre quando os espermatozoides são colocados diretamente em contato com os ovos.

2.6 Dose mínima inseminante

Consiste na determinação da melhor razão entre espermatozóide.ovócitos⁻¹, que assegure um melhor percentual de fecundação. Sendo este percentual determinado pela quantidade de ovo que chega a fase de fechamento do blastóporo em função do total de ovo extrusado pela fêmea (tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de espermatozóide por ovócito para melhor taxa de fecundação de algumas espécies já estudadas.

Espécie	Nome popular	espermatozóide.ovócitos ⁻¹	Autor(es)
<i>Brycon insignis</i>	Piabanha	314.481	Shimoda et al, 2007
<i>Rhamdia quelen</i>	Jundiá cinza	89.497	Bombardelli et al, 2006
<i>Salminus brasiliensis</i>	Dourado	30. 722	Sanches et al,

O conhecimento do número de espermatozóides.ovocito⁻¹ é de fundamental importância na rotina de reprodução artificial de peixes. Tais conhecimentos além de influenciarem as taxas de fertilização Bombardelli et al., (2006a), revelam a possibilidade de limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e uma redução nos custos de produção Fogli da Silveira et al., (1988). O conhecimento da dose inseminante adequada também apresenta importância para o desenvolvimento de programas de criopreservação de sêmen e/ou ovócitos, destinados tanto para fins de conservação da biodiversidade genética de espécies ou até mesmo em programas de melhoramento genético em fazendas de cultivo Denniston et al., (2000).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Piscicultura da Estação Ambiental de Firminópolis - TURVALE, município de Firminópolis - Goiás apresentando no Sistema de Posicionamento Global as seguintes coordenadas: 22k 571607mL x 8150840mS, altitude de 598m.

Na região o período das chuvas tem início no mês de novembro prevalecendo até o mês de março, fator responsável pelo aumento da temperatura da água, condição essencial para o processo de reprodução induzida de peixes reofílicos em cativeiro. No habitat natural os peixes reofílicos de regiões tropicais como o tambaqui e pacu desovam nesse mesmo período após a piracema, fatores como aumento do nível dos rios, alagamento de encostas e o aumento da temperatura, propiciam maior oportunidade de sobrevivência dos alevinos, devido uma maior disponibilidade de alimento

3.2 Captura e seleção dos reprodutores

Para captura dos peixes abaixou-se o nível da água do viveiro para 60 cm facilitando o arraste da rede, o viveiro apresentava uma profundidade média de 140cm. Foi utilizado uma rede de arrasto com malha de 70mm pois os peixes eram de grande porte, quanto maior a distância entre um nó e outro da rede maior a facilidade para o arrasto. Redes de malha grande evita que peixes invasores de pequeno porte sejam capturados, dificultando o manejo dos peixes reprodutores de interesse.

As fêmeas selecionadas apresentavam características morfológicas externas que representava processo de maturação gonadal avançado, abdômem abaulado e papila genital avermelhada. Os machos apresentavam saída de sêmem mediante leve massagem abdominal no sentido ântero-posterior.

Após a captura os reprodutores foram levados rapidamente ao laboratório em tambores com água, onde foram individualmente pesados, marcados com fios coloridos em sua nadadeira dorsal e colocados em um tanque de alvenaria com aproximadamente 1000 litros, tendo circulação constante de água a partir de uma torneira $\frac{3}{4}$, a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Foram hipofisadas 2 fêmeas de tambaqui e 4 machos de pacu, dos quais, apenas um de cada sexo foi selecionado para o experimento. A fêmea foi selecionada pela cor dos ovos, rápida hidratação e homogeneidade dos mesmos, o macho de acordo com a viscosidade do sêmem (maior consistência) e motilidade dos espermatozoides. As fêmeas tinham idade entre 5-6 anos, os machos entre 4-5 anos. Os peixes encontravam-se em viveiros de 1000m² e eram alimentados com ração comercial balanceada contendo 28% de proteína bruta.

3.3 Instalações

O laboratório da Turvale apresenta distribuição hidráulica com canos de 100 e 50mm fixados na parte interna das paredes, saída de água através de torneiras $\frac{3}{4}$, a água é captada em um reservatório de 7000m³ que chega devidamente filtrada ao laboratório, o grande volume de água do reservatório garante pequena variação na temperatura da água, fator essencial para maior taxa de sobrevivência das larvas.

Para desenvolvimento da pesquisa foi construído de forma artesanal 15 mini-incubadoras com garrafas *pet* de 2,5l. Estas tiveram seu fundo cortado, ficando uma abertura com diâmetro de aproximadamente 100mm, onde foi encaixado um cano PVC com 20cm de altura, na lateral do cano foi feito um recorte retangular (6cm x 12cm) e o mesmo tampado com uma tela de malha 100 μ m, para contenção dos ovos (figura 1).



Figura 1: Mini incubadoras sobre o suporte com entrada de água pela parte inferior.

A oxigenação dos ovos foi obtida através da troca constante de água, que entrava na mini-incubadora pelo bico da garrafa, que se encontrava voltada para baixo encaixado em suporte próprio.

Para distribuição da água nas quinze mini-incubadoras foi construído de PVC uma estrutura com formato da letra “H” com uma entrada de água e dezesseis saídas (uma a mais do que o necessário).

3.4 Qualidade da água

Fatores como temperatura, oxigênio e pH foram monitorados antes e durante o experimento, através de aparelhos eletrônicos da marca Alfakit devidamente calibrados.

3.5 Hipofisação

A fêmea selecionada para o experimento pesava 6kg recebendo na primeira dose 3mg e na segunda dose 30mg de hipófise de carpa (EBHC), o macho pesou 3 kg, recebeu dose única de 9mg no momento da segunda dose da fêmea.

3.6 Coleta dos espermatozóides

Para extrusão do sêmem os machos foram anestesiados com solução de benzocaína: 1g de benzocaína/10 ml de álcool etílico/10 litros de água. Após a anestesia, toda a parte ventral do animal foi lavada com água destilada, principalmente na região do poro genital e da nadadeira anal, posteriormente a região foi seca com papel absorvente para não contaminar a amostra de sêmem com urina, fezes ou água. A presença de qualquer uma dessas substâncias provocaria a ativação do espermatozóide, situação não desejada naquele momento.

Logo em seguida o animal foi colocado em cima de uma mesa almofadada, evitando que o mesmo se machuque e recebeu pressão abdominal no sentido anteroposterior para coleta do sêmem. A amostra seminal foi coletada em um tubo falcom com graduação de 0,5ml para imediata determinação da quantidade de sêmem.

3.7 Avaliação qualitativa do sêmem

3.7.1 Análise macroscópica

Cor do sêmem

Maior ou menor quantidade de fluido seminal tem influência direta na concentração de espermatozóides e conseqüentemente na cor do sêmem.

Volume do sêmem

Foi observado no próprio tubo falcom, no momento da coleta.

3.7.2 Análise microscópica

- Motilidade espermática

Para motilidade espermática preparou-se uma lamina a partir do sêmem fresco, imediatamente após a coleta: uma gota do sêmem com uma gota de água. A leitura foi feita com microscopia óptica (400x). A estimativa da percentagem de células móveis seguiu a escala arbitrária de 0 a 100%, segundo Salisbury e Vandemark (1964). Sendo observado no presente estudo motilidade acima de 90%.

- Mortos e vivos

A determinação de espermatozoides mortos e vivos foi realizada através da coloração com eosina citrato Kavamoto & Fogli da Silveira, (1986). Uma gota de sêmem fresco com uma gota do corante e fez-se o esfregaço. Foram considerados vivos aqueles com coloração branca e mortos aqueles que apresentavam coloração rosada (permeável ao corante).

- Avaliação quantitativa de espermatozoide no sêmem

A proporção de espermatozoide no sêmem foi realizado a partir da diluição do sêmem 1:1000, em solução de formol salina tamponado numa concentração de 5% Hancock, (1957). A contagem do número de espermatozoides foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer com aumento de 400 x, segundo Mylonas et al., (1997).

3.8 Coleta dos ovócitos

As fêmeas foram anestesiadas com solução de benzocaína. Após a anestesia, o peixe teve a parte ventral do corpo lavada com água destilada, principalmente na região urogenital e imediatamente seca com papel toalha.

Os ovócitos foram coletados em recipiente seco, limpo e de peso conhecido. Após pesagem foi retirada duas amostras de 1g para contagem dos ovócitos.

3.9 Delineamento experimental

Após a extrusão os ovos foram distribuídos em copos de 20ml seguindo um delineamento experimental de cinco tratamentos com três repetições, totalizando 15 amostras. Variando de acordo com o peso dos ovos em cada tratamento (tabela 3).

Tabela 3: tratamento x grama de ovo

Tratamento	g de ovócitos
1	1
2	1,5
3	2
4	2,5
5	3

3.10 Fertilização e incubação dos ovos

Em cada copo foi colocado 20 μ l do sêmem fresco, sendo misturado com os ovos com a própria ponteira da micropipeta. Logo em seguida estes foram hidratados por aproximadamente 10min, e depois transferidos para as mini-incubadoras devidamente preparadas e identificadas.

3.11 Desenvolvimento dos ovos

Durante o desenvolvimento embrionário nas incubadoras, foram feitas amostragens iniciando-se duas horas após a fecundação que ocorreu às 6h da manhã. Entre as 12hs e às 18hs foram realizadas quatro amostragens, que possibilitou a observação das fases de mórula, blástula, gástrula e o fechamento do blastóporo. Após 11 horas de desenvolvimento embrionário, todos os ovos das incubadoras foram retirados e contados. A taxa de ovos em fase de fechamento de blastóporo foi mensurada em microscópio estereoscópio (20x), utilizando-se de aproximadamente 1000 ovos no tratamento um, até 3000 ovos no tratamento cinco.

3.12 Análises estatísticas

Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey a 5%) conforme procedimentos GLM do programa computacional SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espermatozóides

A coleta do sêmem foi realizada 9h após a aplicação hormonal do extrato hipófise de carpa, apresentando 2mL de volume total, esse volume não pode ser considerado o volume total de sêmem produzido pelo macho, uma vez que o método da extrusão, por pressão no sentido ântero-posterior, não garante a liberação total do sêmem presente. O valor encontrado foi superior ao encontrado em piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) por Ribeiro e Godinho,(2003). Ainda de acordo com Godinho,(2000) o volume do sêmem produzido pelos peixes é muito variável, dependendo do tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta. Este mesmo autor relata que proporcionalmente os peixes de couro produzem maiores quantidades de sêmem quando comparados aos peixes de escama.

O macho apresentou sêmem de coloração branca e aparência viscosa, o sêmem foi coletado com relativa facilidade, evidenciando boa produção seminal a partir da indução hormonal realizada.

Foi encontrada uma concentração espermática de 10×10^9 espermatozóides/mL para o sêmem do pacu. Valores próximos ao encontrado por Maria et al.(2003) de $13,89 \pm 1,26 \times 10^9$ espermatozóides/mL para a mesma espécie e diferente dos valores encontrados tanto por Silveira et al. (1990), com médias de concentração de $28,07 \pm 8,2 \times 10^9$ espermatozóides/mL quanto por Miliorini et al. (2002), cuja média foi de $18,62 \pm 3,31 \times 10^9$ espermatozóides/mL (Tabela 1).

A taxa de motilidade dos espermatozóides foi determinada através do campo visual com microscopia óptica, aumento de 400x, observando mais de 90% de motilidade. Maria et al. (2003) e Miliorini et al. (2002) para a mesma espécie encontraram respectivamente $95 \pm 3,16\%$ e $99,16 \pm 0,83\%$ de motilidade.

Na avaliação da proporção de espermatozóides mortos e vivos, a lâmina preparada apresentou os espermatozóides totalmente corados em rosa, variando apenas na tonalidade da cor, como a cor rosada determina espermatozóides mortos e a cor branca os vivos, sugere-se um erro técnico no momento da preparação da lâmina, pois o resultado apresentado para mortos e vivos são incompatíveis com a taxa de motilidade acima de 90%

visualizado no microscópio com aumento de 400x. Kavamoto & Fogli da Silveira et al. (1986), em *Rhamdia hilarii*, verificaram média de 86,73% de células vivas.

4.2 Ovócitos

A extrusão da fêmea foi realizada após o processo anestésico, garantindo assim maior segurança no manejo reprodutivo, além de evitar quedas e esfoliações desnecessárias. Seus ovócitos ainda sem sofrer o processo de hidratação foram pesados, obtendo 654g de ovócitos($1g \pm 1mL$), representando aproximadamente 10% do peso vivo da fêmea, 6 kg.



Figura 1: Processo de extrusão da fêmea de tambaqui: (A) fêmea tambaqui com abdômem abaulado; (B) fêmea de tambaqui após o processo anestésico; (C) coleta dos ovócitos através da extrusão.

Das duas amostras de 1 g coletada obteve-se uma média de 1560 ovócitos/g (figura 2). A fêmea apresentou produção média de 170.040 ovócitos/kg de peixe vivo. Os ovócitos foram distribuídos de acordo com o delineamento experimental (Tabela 4).

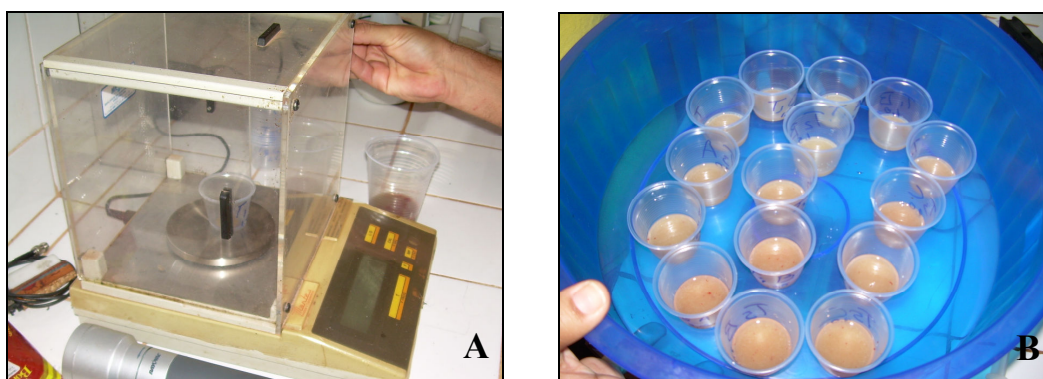


Figura 2: (A) Pesagem dos ovócitos; (B) Ovócitos distribuídos de acordo com o delineamento experimental devidamente identificado.

Tabela 4: Tratamento: número de ovócitos por grama.

Tratamento	g de ovócitos	n° ovócitos por tratamento
1	1	1.560
2	1,5	2.340
3	2	3.120
4	2,5	3.900
5	3	4.680

4.3 Fertilização

A taxa de hormônio utilizada mostrou-se satisfatória no que se refere ao processo de desova: volume, fluidez e facilidade na extrusão. Porém a taxa de fecundação máxima de 2,39% não foi satisfatória (Tabela 5). A percentagem de fertilização em cada tratamento demonstrado no gráfico 1.

Tabela 5: Resultados da percentagem de fecundação.

Tratamento	N° ovos por tratamento	N° sptz em 20 μ L de sêmem	Sptz/ovócito	N° ovos fecundados	% fecundação
1	1.560	200 x 10 ⁶	128.205	90	1,92
2	2.340	200 x 10 ⁶	85.470	108	1,54
3	3.120	200 x 10 ⁶	64.102	178	1,90
4	3.900	200 x 10 ⁶	51.282	280	2,39
5	4.680	200 x 10 ⁶	42.735	201	1,43

A mistura dos gametas utilizando a própria ponteira da micropipeta pode contribuir para a baixa fertilização. Segundo Ponzi, (2003) a mistura dos produtos sexuais, procedimento utilizado corriqueiramente nas estações de piscicultura, pode causar danos aos ovos, pela abrasão do contato direto dos mesmos com materiais mais rígidos, pela fragilidade que apresentam.

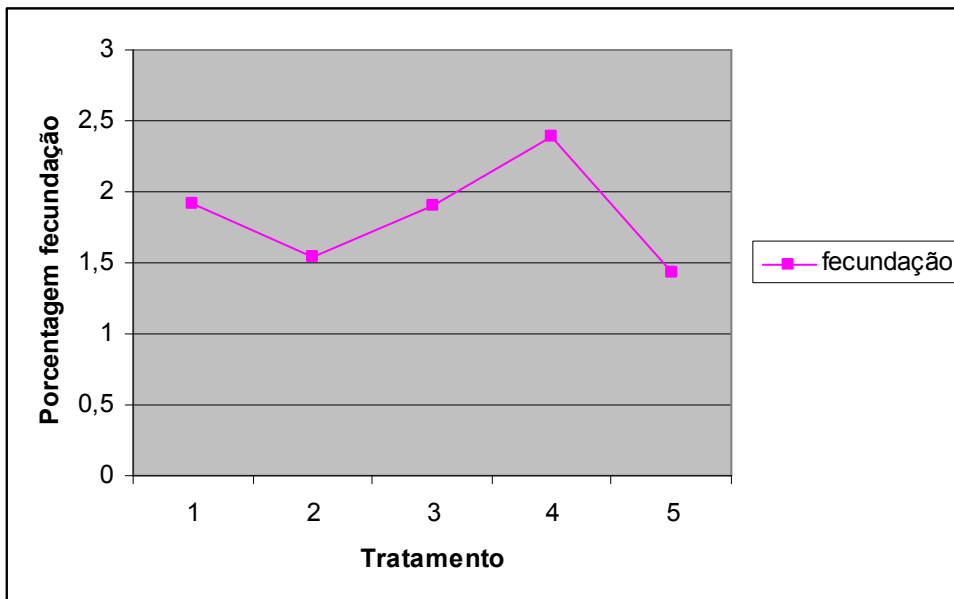


Gráfico 1: Porcentagem de ovos fecundados de tambacu (*Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*).

No presente trabalho apresentado apesar do baixo percentual de fertilização, obteve-se uma razão entre espermatozóide/ovócito de 51.282, considerada satisfatória quando comparada aos resultados apresentados por Bombardelli, (2006) e Shimoda et al (2007). Bombardelli, (2006) trabalhando com jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) obteve fertilização máxima teórica de 86,68% e a melhor relação de espermatozóide/ovócito foi de 89.497.

Fogli da Silveira et al. (1988), estudando o efeito da concentração espermática sobre as taxas de fertilização em truta (*Salmo irideus*), observaram que concentrações superiores a 2×10^5 espermatozoides.ovócito⁻¹ maximizaram as taxas de fertilização (80,83% até 87,60%). Nesse caso se faz necessário um estudo econômico, para avaliar a relação custo benefício, no ganho de aproximadamente 7% na taxa de fertilização, em relação ao custo da manutenção de um maior número de reprodutores ao longo do ano.

Outros autores verificaram ainda doses inseminantes ideais para outras espécies, como 140×10^3 espermatozóide.ovócito⁻¹ para a tilápia (*Oreochromis* spp.) Rana & McAndrew, (1989), 15×10^3 espermatozóide.ovócito para o bagre africano (*Clarias gariepinus*) Rurangwa et al., (1998), acima de 9×10^3 espermatozóide.ovócito para turbot (*Scophthalmus maximus*) Chereguini et al., (1999), $8,49 \times 10^3$ a $23,67 \times 10^3$ espermatozóides.ovócito⁻¹ para a carpa comum (*Ciprinus carpio*) (Linhart et al., 2003) e $314,428 \times 10^3$ espermatozóides.ovócito para a piabanha (*Brycon insignis*) (Shimoda et al., 2004).

Segundo Lahnsteiner (2000), a proporção ideal de espermatozóides por ovócito depende do diâmetro dos ovócitos. Espermatozóides de peixes fertilizam os ovócitos através da abertura denominada micrópila. Segundo Suquet et al. (1995), quanto menor o diâmetro do ovócito, maior a probabilidade de os espermatozóides alcançarem o aparato micropilar e fecundá-lo. Vazzoler (1996) descreve que a quantidade de ovócitos por grama tem inversa correlação com o tamanho desses gametas. Assim, quanto menor os ovócitos, maior a quantidade de ovócitos por grama e menor o seu diâmetro. No presente trabalho, o indicador do tamanho dos ovócitos foi a quantidade de ovócitos por grama. Embora o diâmetro do ovócito do tambaqui não tenha sido medido, no trabalho de Vieira et al. (1999), verificou valores entre 0,85mm e 1,25mm de diâmetro (Tabela 6).

Tabela 6. Razão ótima de espermatozóides (sptz) por ovócito de acordo com o tamanho dos ovócitos em algumas espécies.

Espécie	Indicativo do tamanho do ovócito (ovócito/mL ou diâmetro do ovócito)	Razão ideal sptz x 10^3 /ovócito	Autor
<i>Thymallus thymallus</i>	40 ovócitos/mL	1200-1600	Lahnsteiner (2000)
<i>Esox lucius</i>	Diâmetro = 2mm	700	Marcel (1981)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Diâmetro = 4mm	200	Silveira et al. (1988)
		300	Billard (1975)
<i>Coregonus lavaretus</i>	150 ovócitos/mL	300-500	Lahnsteiner (200)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Diâmetro = 3mm	1600	Suquet et al. (1995)
	701 ovócitos/g		
<i>Brycon insignis</i>	Diâmetro = 1,3mm	314	Sousa (2004)
<i>Cyprinus carpio</i>	1500 ovócitos/g	13	Marcel (1981)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Diâmetro = 1 mm	6	Suquet et al. (1995)

A razão de 51.282 espermatozóide/ovócito (Tabela 5) encontrado para fertilização do híbrido tambacu (fêmea tambaqui x macho pacu) é proporcional aos dados mostrados na tabela 6 em que ovócitos menores como é o caso do tambaqui, necessitam de menor quantidade de espermatozóides para fecundação.

As espécies *T. thymallus* (Lahnsteiner, 2000), *E. lucius* (Marcel, 1981), *C. lavaretus* (Lahnsteiner, 2000), *H. hippoglossus* (Suquet et al., 1995) apresentam ovócitos maiores que o tambaqui e, provavelmente por isso, necessitam de mais células espermáticas para fecundar os ovócitos.

Na análise de variância (Tabela 7) observa-se que o tratamento é significativo a 95%, e a repetição dos tratamentos não apresenta valor significativo. Quanto as médias do tratamento confirma-se uma melhor fertilização no tratamento quatro.

Tabela 7 . Resumo da análise de variância, coeficientes de variação e médias por quadrados mínimos do número de ovos fecundados do tambaqui, *Colossoma macropomum*

Causas de Variação	GL	Pr > F
Tratamento (T)	4	0,0412
Repetição	2	0,2539
Resíduo	8	-
CV	37,9	-
Médias tratamentos		
1g de ovócitos		30 ^b
1,5g de ovócitos		36 ^{ab}
2g de ovócitos		59 ^{ab}
2,5g de ovócitos		93 ^a
3g de ovócitos		67 ^{ab}

Pr > F: Pr ≤ 0,01 = significativo a 99 % de probabilidade; Pr >0,01 ≤ 0,05 = significativo a 95 % de probabilidade. ^{1/} Valores seguidos de mesma letra em mesma coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade

4.4 Qualidade da água

As variáveis físico-químicas da água apresentaram pequenas variações durante o experimento, porém mantiveram-se dentro dos padrões aconselháveis para as espécies: a temperatura variou de 26 a 28,5^o C, oxigênio dissolvido de 5,3 a 6,8 mg/L e o pH de 6,5 a 7,0.

5 CONCLUSÃO

O trabalho demonstra a possibilidade de manter um plantel equilibrado de reprodutores, auxiliando técnicos e piscicultores no processo e manejo reprodutivo.

Considerando que o pacu tenha uma média de 10 x 10⁹ espermatozoides/ml e que o tambaqui apresenta 1560 ovócitos/grama de desova, recomenda-se que seja utilizado 1ml do sêmem de pacu para cada 125g de ovócito do tambaqui para fertilização do híbrido tambacu.

Existem vários trabalhos no que se refere à taxa de fertilização, mas sugere-se novas pesquisas tanto para o híbrido tambacu, como para outros peixes, apresentando assim melhor consistência nos resultados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO-LIMA, C. ; GOULDING, M. **Os frutos do tabaqui: Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**, Brasília: CNPQ, 1998.

Bagenal T. *Methods for assessment of fish production in freshwaters*. Oxford: Blackwell Bayley, 1978.

BOMBARDELLI R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; et al. Dose 411 inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-13, Feb. 1992.

CAROLSFELD J. **Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of Colossomas**. In: Hernandez A. *Cultivo de Colossoma*. Bogotá: Editora Guadalupe, 1989. p.37-73.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, London, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Tempo de trânsito gastrintestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 413-417, July/Sept. 2005.

FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. Espécies cultivadas. In: MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B **Reprodução/Espécies para piscicultura: cursos de qualificação profissional a distancia**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. p. 17-28.

GODOY, M. P. de. **Peixes do Brasil. Subordem Characoidei- bacia do Rio Mogi Guassu**. Piracicaba, Franciscana, 1975. 4v.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HANCOCK, J. L. **The morphology of boar spermatozoa**. *J. Roy. Micro. Soc*1957. 76:1-84.

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, disponível em: <http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/info-estatistica/docs/Estatistica-da-Aquicultura-e-Pesca-no-Brasil-2007.pdf> Acesso em: 20 de fevereiro 2009.

JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa.** Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 139 p.

JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, L. K. P. Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.) **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa.** Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 5, p. 56-72.

JANVIER, P. Catching the first fish. **Nature**, London, v. 402, n. 6758, p. 21-22, Nov. 1999.

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

MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-194, jan./fev. 2004

MELO, J. S. C.; PEREIRA, J. A. Crescimento do híbrido tambacu (fêmea de *Colossoma macropomum* x macho de *Piaractus mesopotamicus*) em criação intensiva. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 7, p. 56-61, 1994.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; FRANCISCATTO, R. T.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, jul./set. 2002.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology.** New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 233-275.

OHTA, H., UNUMA, T., TSUJI, M., YOSHIOKA, M., KASHIWAGI, E. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potencial for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. **Aquaculture Research** v. 32, p. 385 – 392, 2001.

PONZI, J. M. Otimização da taxa de fertilização e eclosão de larvas de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sem instrumentos, 2003. 34f. **Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros) - Universidade Rural de Pernambuco**, Recife 2003.

RIBEIRO, R.I.M.A.; Godinho, H.P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.55 no.1 Belo Horizonte Feb. 2003

SARACURA, V. F.; CASAGNOLLI, N. Comparação do desempenho entre alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e híbridos de pacu e tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Ciência Zootécnica**, v. 5, p. 17-19, 1990.

SILVEIRA, W. F. da; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-13, 1990.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JR., M.V.; et al. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.877-882, 2007.

SZENTTAMÁSY, E. R.; BARBOSA, S. M. V. B.; OETTERER, M.; MORENO, I. A. M. Tecnologia do pescado de água doce: Aproveitamento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 50, n. 2, p. 303-310, jun./set. 1993.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. de C. (Org.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editoraufsm, 2005. p. 225-255

VIVEIROS, A. T. M. **Semen collection and preservation in African catfish, *Clarias gariepinus***. 2002. 143 p. Thesis (Ph D) - Wageningen University. Wageningen.

WALLACE RA, SELMAN K. **Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts**. *Am Zool*, v.21, p.325-343, 1981.

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

ZOHAR Y. **Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification**. *Fish Physiol Biochem*, v.7, p.395-405, 1989.

7 ANEXOS

Anexo 1. Apresentação das quatro amostragens realizadas durante o período de desenvolvimento do ovo, ocorridas das 12:20 h às 17:46 h.

Tratamento	Amostra N°	1		Horário
	Repetições	ovos coletados	ovos fecundados	
1(1g)	1.1	52	8	12:57
	1.2	20	3	
	1.3	41	3	
2(1,5)	2.1	40	4	
	2.2	58	7	
	2.3	44	3	
3(2g)	3.1	48	4	
	3.2	72	7	
	3.3	55	1	
4(2,5)	4.1	29	0	
	4.2	80	9	
	4.3	28	5	
5(3g)	5.1	57	5	
	5.2	34	1	
	5.3	118	15	12:20

Tratamento	Amostra N°	2		Horário
	Repetições	ovos coletados	ovos fecundados	
1(1g)	1.1	46	7	13:48
	1.2	53	6	
	1.3	26	3	
2(1,5)	2.1	30	1	
	2.2	28	3	
	2.3	64	7	
3(2g)	3.1	88	12	
	3.2	44	8	
	3.3	49	3	
4(2,5)	4.1	81	2	
	4.2	39	5	
	4.3	55	7	
5(3g)	5.1	79	10	
	5.2	78	8	
	5.3	73	4	13:05

Tratamento	Amostra N°	3		Horário
	Repetições	ovos coletados	ovos fecundados	
1(1g)	1.1	44	6	16:20
	1.2	18	1	
	1.3	25	1	
2(1,5)	2.1	21	1	
	2.2	14	0	
	2.3	57	0	
3(2g)	3.1	55	6	
	3.2	60	8	
	3.3	35	1	
4(2,5)	4.1	69	7	
	4.2	30	4	
	4.3	30	2	
5(3g)	5.1	25	2	
	5.2	59	7	
	5.3	20	1	15:22

Tratamento	Amostra N°	4		Horário
	Repetições	ovos coletados	ovos fecundados	
1(1g)	1.1		24	17:46
	1.2		16	
	1.3		12	
2(1,5)	2.1		32	
	2.2		27	
	2.3		23	
3(2g)	3.1		47	
	3.2		53	
	3.3		28	
4(2,5)	4.1		63	
	4.2		121	
	4.3		55	
5(3g)	5.1		71	
	5.2		36	
	5.3		41	17:05

