

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

**RETORNO REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE TAMBAQUI E QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE MACHOS ENDOGÂMICOS DE TILÁPIA-DO-NILO**

Luana Barbosa Pires

CAMPO GRANDE, MS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

**RETORNO REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE TAMBAQUI E QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE MACHOS ENDOGÂMICOS DE TILÁPIA-DO-NILO**

**EVALUATION OF THE REPRODUCTIVE RETURN OF TAMBAQUI, SURUBIM
AND NILE TILAPIA**

Luana Barbosa Pires
Orientador: Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção
animal.

CAMPO GRANDE, MS - 2021



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

LUANA BARBOSA PIRES

Retorno reprodutivo de fêmeas de tambaqui e qualidade espermática de machos endogâmicos de tilápia-do-nilo

Return to reproduction in tambaqui females and sperm quality in inbred Nile Tilapia males

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Aprovada em: 26-02-2021

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Jayme Aparecido Povh
(UFMS) – (Presidente)

Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
UFMS

Dr. Eduardo Antônio Sanches
UNESP

Dr. Luís Antonio Kioshi Aoki Inoue
EMBRAPA

Dr. Ruy Alberto Caetano Correa Filho
UFMS



Documento assinado eletronicamente por **Ruy Alberto Caetano Correa Filho, Professor do Magisterio Superior**, em 01/03/2021, às 13:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antônio Sanches, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 13:25, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 13:50, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eurico dos Santos Fernandes, Professor do Magisterio Superior**, em 01/03/2021, às 14:11, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jayme Aparecido Povh, Professor do Magisterio Superior**, em 01/03/2021, às 17:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2429575** e o código CRC **379429F5**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone: .

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33

SEI nº 2429575

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

O saber se aprende com mestres e livros.

A Sabedoria, com o corriqueiro, com a vida e com os humildes.

O que importa na vida não é o ponto de partida, mas a caminhada.

Caminhando e semeando, sempre se terá o que colher.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, e por me dar saúde e fé para poder chegar até aqui.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Ciência Animal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, Ivão e Maria, e a minha irmã, Verônica, por todos os ensinamentos e por sempre me apoiarem e vibrarem a cada vitória, estimulando-me a sempre seguir em frente, transmitindo paz e segurança nos momentos de dificuldade.

Ao meu namorado, Aderson, pela compreensão fundamental nestes anos, por estar sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e ajudando a conquistar meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jayme Ap. Povh, por sua amizade, apoio, correções, orientações, pelas horas de conversa e por sempre confiar em mim na execução deste trabalho e me incentivar a cada nova etapa.

Ao Prof. Dr. Ruy Alberto Caetano Corrêa Filho, por toda ajuda disponibilizada em todos os momentos deste trabalho. Sempre esteve disponível e presente, me ajudando e incentivando a cada nova etapa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Sanches, por todo ensinamento transmitido desde a época do Mestrado, e por me ajudar nas coletas, e por aceitar fazer parte da banca.

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, pela amizade, participação na minha banca, correções e sugestões.

Ao Dr. Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue por aceitar participar da banca e assim contribuir para o crescimento deste trabalho.

A Piscicultura Buriti por ceder os peixes para execução deste trabalho e aos funcionários que me ajudaram.

Aos colegas do grupo AQUIMS, por toda parceria ao longo desses anos e pela ajuda prestada na parte prática do experimento.

A minha amiga, Paula Graziela, pela amizade ao longo desses anos e por toda ajuda nas correções deste trabalho.

A minha amiga, Nara, pela amizade e parceria ao longo desses anos. Por toda

ajuda e incentivo para a realização deste doutorado.

E a todos os amigos que fiz ao longo desta caminhada. Meu muito Obrigada!

Resumo

PIRES, L.B. Retorno reprodutivo de fêmeas de tambaqui e qualidade espermática de machos endogâmicos de tilápia-do-Nilo. 2021. 61 f. Tese Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

O tambaqui é uma espécie reofílica, sendo que em seu ambiente natural precisa realizar piracema para que sua reprodução ocorra, enquanto na piscicultura para que a reprodução ocorra é necessário a utilização de indutores. A tilápia-do-Nilo possui vantagens reprodutivas quando relacionada a outras espécies de peixes, por apresentar maturação sexual precoce e capacidade de se reproduzir durante todo o ano em condições ambientais favoráveis. O objetivo do estudo foi avaliar a reprodução induzida de fêmeas de *Colossoma macropomum* no início do período reprodutivo e após 75 dias da primeira desova, e comparar as características espermáticas de diferentes grupos genéticos de tilápias-do-Nilo em três coletas com intervalo de 30 dias. Experimento 1: Foram utilizadas oito fêmeas com médias de peso de 6,7 kg e quatro anos de idade. Foi realizada uma indução hormonal no início do período reprodutivo (outubro) e outra após 75 dias da primeira desova (dezembro), sendo avaliados as características reprodutivas das fêmeas nestes dois momentos. Das oito fêmeas que desovaram na primeira indução reprodutiva, três fêmeas (37,5%) desovaram novamente após 75 dias. Todas as características avaliadas foram semelhantes nas duas desovas, exceto a taxa de fertilização que foi menor ($P < 0,05$) na segunda desova. A maioria das fêmeas (66,7%) que desovaram novamente (2ª vez) após 75 dias apresentaram valores superiores à primeira indução hormonal para todas as características avaliadas, exceto para taxa de fertilização. Concluímos que é possível obter retorno reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum* após 75 dias da primeira desova induzida. Experimento 2: Foram utilizados 30 exemplares de tilápia-do-Nilo (500 g), divididos em três grupos, sendo: (i) grupo com 10 peixes endogâmicos (AquaAmérica irmãos completos, consanguinidade de 25% dos pais); (ii) grupo com 10 peixes não endogâmicos (AquaAmérica sem ancestrais comuns até a terceira geração), com consanguinidade no máximo igual a 2%, sem nenhum bisavô comum dos pais; (iii) grupo com 10 peixes heterose (AquaAmérica X GIFT) cruzamento dos pais. Foram avaliadas as características seminais pelo sistema computadorizado

(Sperm Class Analyzer), integridade de membrana e atividade mitocondrial. Não houve diferença significativa entre as características espermática entre os grupos genéticos nas diferentes coletas, exceto para a frequência de batimento cruzado (BCF) na primeira coleta. Na comparação de das coletas de cada grupo genético, apenas BCF no grupo AquaAmérica endogâmico diferiu significativamente ($P<0,05$), com maior valor na coleta 3 (7,7 Hz) em relação a coleta 2 (6,86 Hz).

Com relação a integridade da membrana e atividade mitocondrial, apenas a porcentagem de membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial no grupo genético AquaAmérica endogâmica foi menor ($P<0,05$) na coleta 2 (0,29%) em relação as coletas 1 (8,34%) e 3 (8,72%); a membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial no grupo AquaAmérica não endogâmica que foi maior ($P<0,05$) na coleta 2 (27,1%) em relação a coleta 1 (2,97) e 3 (1,72) e no grupo AquaAmérica x GIFT que foi maior ($P<0,05$) na coleta 2 (68,02%) em relação as coletas 1 (6,19%) e 3 (5,79%). Conclui-se que a variedade AquaAmérica não endogâmica apresenta melhores valores para a variável BCF na primeira coleta, variável que apresenta comportamento distinto entre o grau de endogamia da variedade AquaAmérica ao longo das coletas, inclusive com grande contraste entre a integridade da membrana e atividade mitocondrial entre as coletas.

Palavras-chave: Avaliação espermática, Citometria de fluxo, *Colossoma macropomum*, *Oreochromis niloticus*, Peixes Reofílicos, Retorno reprodutivo.

Abstract

PIRES, L.B. Return to reproduction in tambaqui females and sperm quality of inbred Nile tilapia males. 2021. 61 f. Doctoral Thesis - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

The tambaqui is a rheophilic species that must perform the *piracema* (swimming upstream to lay eggs) to reproduce, when in its natural environment. In fish farming, however, inducers must be used for its reproduction to occur. Compared to other fish species, Nile tilapia has reproductive advantages provided by its early sexual maturation and ability to reproduce throughout the year in favorable environmental conditions. The objective of this study was to examine the induced reproduction of *Colossoma macropomum* females at the beginning of the reproductive period and 75 days after the first spawning, as well as to compare the sperm characteristics of different genetic groups of Nile tilapia in three collections spaced 30 days apart. Experiment 1: eight 4-year-old females with an average weight of 6.7 kg underwent hormonal induction at the beginning of the reproductive period (October) and again 75 days after the first spawning (December). Reproductive traits of the females were evaluated on these two occasions. Of the eight females that spawned in the first reproductive induction, three (37.5%) spawned again after 75 days. All evaluated traits were similar in both spawns, except fertilization rate, which was lower ($P < 0.05$) in the second spawn. Most females (66.7%) that spawned again (2nd time) after 75 days showed higher values than in the first hormonal induction for all evaluated traits, except fertilization rate. We concluded that return to reproduction in *C. macropomum* females can be achieved 75 days after the first induced spawning. Experiment 2: thirty specimens of Nile tilapia (500 g) were divided into three groups: (i) 10 inbred fish (AquaAmérica full-sibs, 25% inbreeding from parents); (ii) 10 non-inbred fish (AquaAmérica with no common ancestors up to the third generation, with inbreeding of at most 2%, without any common

great-grandparent between parents); and (iii) 10 heterozygous fish (AquaAmérica × GIFT parents). Semen characteristics were evaluated in a computerized system (Sperm Class Analyzer) and membrane integrity and mitochondrial activity were analyzed. There was no significant difference in sperm characteristics between the genetic groups in the different collections, except for beat-cross frequency (BCF) in the first collection. When the collections of each genetic group were compared, only BCF in the inbred AquaAmérica group differed significantly ($P<0.05$), with a higher value observed in collection 3 (7.7 Hz) than in collection 2 (6.86 Hz). As regards membrane integrity and mitochondrial activity, only the percentage of damaged plasma membrane with high mitochondrial potential in the inbred AquaAmérica genetic group was lower ($P<0.05$) in collection 2 (0.29%) than in collections 1 (8.34%) and 3 (8.72%). Likewise, intact plasma membrane with high mitochondrial potential in the non-inbred AquaAmérica group was higher ($P<0.05$) in collection 2 (27.1%) than collections 1 (2.97) and 3 (1.72), whereas in the AquaAmérica × GIFT group, it was higher ($P<0.05$) in collection 2 (68.02%) than collections 1 (6.19%) and 3 (5.79%). In conclusion, BCF values in the non-inbred AquaAmérica variety are better in the first collection. This variable behaves differently according to the degree of inbreeding in the AquaAmérica variety throughout collections, with a marked contrast between membrane integrity and mitochondrial activity between collections.

Keywords: *Colossoma macropomum*, Flow cytometry, *Oreochromis niloticus*, Return to reproduction, Rheophilic fish, Sperm evaluation.

Sumário

Introdução	12
Revisão Bibliográfica	13
1. Tambaqui.....	13
1.1 Reprodução	15
2. Tilápia	17
2.1. Reprodução	19
3. Análise Seminal	20
3.1 CASA (Computer-assisted Sperm Analysis)	20
3.2 Citometria de Fluxo.....	22
Referências	23
Objetivos	28
Capítulo I	29
Artigo I	30
1. Introdução.....	30
2. Material e Métodos	31
3. Resultados.....	33
4. Discussão	35
5. Conclusão.....	37
6. Agradecimentos	37
7. Referências.....	37
Capítulo II	41
Artigo II	42
1. Introdução.....	43
2. Material e Métodos	44
2.1 Análise Espermática	44
2.2 Integridade de Membrana e Potencial Mitocondrial.....	45
2.3 Análises Estatísticas.....	46
3. Resultados.....	46
4. Discussão	51
5. Conclusão.....	55
6. Agradecimentos	56
7. Referências.....	56

INTRODUÇÃO

A piscicultura tem despertado grande interesse por ser uma forma econômica de se produzir alimento nobre em curto espaço de tempo (Lenz, 2014), isso se deve ao crescimento populacional e a necessidade de alimento e a sustentabilidade ambiental (Schulter & Vieira Filho, 2017). O território brasileiro possui grande potencial na aquicultura por possuir vasta área de lâmina d'água (estima-se em 5,3 milhões de hectares de água doce represada em grandes reservatórios naturais e artificiais), condições climáticas favoráveis e disponibilidade de insumos para produção de rações (Sidonio et al., 2012; Saint-Paul, 2017).

No ano de 2020 a piscicultura brasileira apresentou um crescimento de 12,5% em relação ao ano anterior (432.149 t), fechando sua produção de peixes cultivados em 486.155 toneladas de tilápia, a espécie representa 60,6% do total da produção, já a produção de peixes nativos atingiu 278.671 t a qual teve uma redução de 3,3% em relação ao ano de 2019 (287.930 t) totalizando 34,7% da produção o que mantém o Brasil como 4º maior produtor mundial (PeixeBr, 2021).

Dentre as espécies produzidas na piscicultura Brasileira, a tilápia-do-Nilo é a espécie com maior produção devido a sua versatilidade (PeixeBr, 2021), se destacando por apresentar características favoráveis como, aceitar diferentes tipos de alimentos, rápido crescimento e reprodução, rusticidade e ótima resistência a doenças, ao superpovoamento, a baixos níveis de oxigênio dissolvido e a altas concentrações de amônia, tolerando um amplo limite de temperatura, apresentando alta prolificidade e poder ser aclimatada a altas concentrações de salinidade (Silva, 2009). Além disso, a tilápia é apreciada mundialmente por gerar um pescado de alta qualidade (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

Embora se tenha domínio na reprodução da tilápia-do-Nilo, faltam informações quanto ao efeito do melhoramento genético nas características reprodutivas de machos desta espécie. Neste sentido, análises precisas como do CASA são fundamentais, pois além de verificar o efeito da seleção na reprodução, poderá orientar o programa de melhoramento quanto ao impacto destes.

Entre as espécies nativas, o tambaqui se destaca com uma produção de 100,6 mil toneladas produzidas no Brasil no ano de 2020 (IBGE, 2021). Devido a características como o seu excelente potencial para produção intensiva, a facilidade de obtenção de juvenis, apresentar bom crescimento, alta produtividade e resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido; principalmente devido a disponibilização de tecnologias para a sua criação (Gomes et al., 2010; Izel et al., 2013, 2018; Saint-Paul, 2017; Valladão et al., 2018). Entretanto a reprodução do tambaqui é realizada uma única vez durante o período reprodutivo, não se tendo relatos da utilização desta espécie mais de uma vez dentro do mesmo período reprodutivo o que possibilitaria maximizar a produção de alevinos provenientes de reprodutores com maior potencial genético.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) apresentado na figura 1, é um peixe tropical de água doce nativo das bacias dos rios Amazonas e Orinoco e Solimões, com destaque nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste, sendo considerado o segundo maior peixe de escama da América do Sul podendo medir 90 cm de comprimento e a

pesar 30 kg (Lopera-Barrero et al., 2011). Está classificado taxonomicamente da seguinte maneira segundo Nelson (1984):

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Sub-Família: Serrasalminae

Gênero: *Colossoma*

Espécie: *Colossoma macropomum*

Nome Popular: Tambaqui



Figura 1. Exemplar de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Fonte: Arquivo pessoal)

Esta espécie possui hábito alimentar onívoro com tendência ao consumo de frutos e plâncton (filtração nos rastros branquiais), particularmente cladóceros e copépodos, sendo que as sementes são mais abundantes na dieta durante a enchente, onde as plantas frutificam (Santos et al., 2006; Baldisserotto & Gomes, 2013). Além disso, esta

espécie apresenta bom potencial de crescimento, alta produtividade e rusticidade (Gomes et al., 2003).

1.1 Reprodução

O tambaqui por ser uma espécie reofílica em seu ambiente natural realiza piracema e sua reprodução ocorre no período de chuvas, de outubro a março, com maior concentração nos meses de novembro a fevereiro (Kubitza, 2004), que é quando tem o aumento do fotoperíodo, temperatura e chuvas, esses fatores regula os estímulos fisiológicos, mediados principalmente por estes fatores externos (Muniz et al., 2008). Na piscicultura acontece a restrição dos fatores ambientais afetando diretamente o processo reprodutivo, suprimindo de alguma forma a ação dos hormônios responsáveis pela desova (Mylonas et al., 2010). Embora o desenvolvimento gonadal aconteça, o desenvolvimento final de maturação não ocorre devido às restrições sendo necessária a indução através de hormônios exógenos comumente aplicados como no caso extrato bruto de hipófise de carpas (Zoar & Mylonas, 2001).

A reprodução é o processo biológico mais importante dos organismos, já que dele depende a sobrevivência e perpetuação das espécies, por isso a possibilidade de controlar o ciclo reprodutivo dos organismos submetidos a condições de piscicultura é um dos fatores de maior importância para assegurar o êxito da atividade (Zaniboni & Weingartner, 2007). Para a continuidade do crescimento da aquicultura em larga escala, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas para a produção de quantidades adequadas de alevinos oriundos de matrizes de alta qualidade.

Os primeiros trabalhos de indução à desova de peixes reofílicos foram desenvolvidos na década de 30 paralelamente na Argentina por Bernado Houssay e no

Brasil por Rofolfo Von Ihering, quando foram obtidos resultados positivos de indução à maturação final e desova de peixes migradores, a partir da aplicação de hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros (Zaniboni & Weingartner, 2007). Segundo Zaniboni e Weingartner (2007), esta técnica continua sendo uma das alternativas mais utilizadas para induzir a reprodução de peixes migradores em todo mundo, sendo conhecida como “hipofisação”. Os autores ainda salientam que até o início de 1990, foram obtidos resultados positivos de indução hormonal a maturação final e desova de vários peixes migradores brasileiros, através da hipofisação ou aplicação de hormônios sintéticos.

O extrato bruto de hipófise de carpa é o indutor reprodutivo mais utilizado nas pisciculturas brasileiras para reprodução induzida de peixes reofílicos (Zaniboni & Weingartner, 2007). A hipofisação tem sido utilizada com sucesso em várias espécies de peixes reofílicos, tais como: tambaqui (*C. macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon cephalus* e *B. orbignyanus*), dourado (*Salminus maxillosus*), curimatás (*Prochilodus scrofa* e *P. affinis*), piapara (*Leporinus elongatus*), piauí (*Leporinus friderici*), piauí branco (*Schizodon kneri*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e lambaris (*Astyanax sp*) (Baldiasserotto, 2009).

A reprodução induzida de *C. macropomum* é realizada apenas uma vez durante o período reprodutivo, levando assim a uma subutilização das matrizes. A utilização de fêmeas mais de uma vez na estação reprodutiva permite a otimização do plantel bem como maximizar a produção de alevinos provenientes de reprodutores de maior potencial genético. Embora se tenha trabalhos avaliando o retorno reprodutivo de machos de *C. macropomum* (Pires et al., 2017), não se tinha informações científicas quanto ao retorno reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum*.

2. Tilápia

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentada na figura 2, é um peixe exótico originário do continente africano, proveniente das bacias dos rios Nilo, Níger, Chade e nos lagos do centro-oeste (Verani, 1980). Este peixe foi introduzido em mais de 100 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, na busca de melhorar a produtividade pesqueira (Coward & Bromage, 2000; Lèveque, 2002), crescendo maneira notável no agronegócio devido suas características favoráveis como a facilidade na produção, alta resistência a doenças e rápido crescimento (Shokr, 2015), a qual se enquadra na seguinte categoria taxonômica (FISHBASE, 2007):

Reino: Animal Filo: Chordata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus*



Figura 2. Exemplar de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Fonte: <https://www.pisciculturasaojeronimo.com.br/especies/tilapia-nilotica>).

No Brasil a tilapicultura teve início em 1971 com a introdução da primeira tilápia-do-Nilo relatada através da linhagem Bouaké no Ceará pelo programa do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), através do convênio com Centre Technique Forétier Tropical (CTFT), da França (Castagnolli, 1992). A segunda foi a Chitralada em 1996 no município de Londrina-PR (Zimmermann, 1999). Em 2002 foi introduzida a linhagem Supreme através da piscicultura Aquabel que ficou conhecida como linhagem GST (Genomar Supreme Tilápia), proveniente da empresa Genomar, (Cyrino et al., 2004). Em 2005 a linhagem GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) foi importada da Malásia (Oliveira et al., 2012), dando início ao programa de melhoramento da linhagem GIFT, a partir de famílias provenientes da Universidade Estadual de Maringá (UEM), World Fish Center e Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP) (Oliveira et al., 2012) dando origem a linhagem Tilamax (Zardin, 2016).

2.1 Reprodução

A tilápia apresenta reprodução parcelada, caracterizada por várias desovas ao longo do ano e ciclos reprodutivos relativamente curtos, alta prolificidade e grande número de alevinos viáveis em cada desova, além disso, as tilápias possuem cuidado parental, os machos constroem ninho para postura e a fêmea incuba e protege os ovos na boca, assim como as larvas dependentes (Tuzine, 2018). A tilápia possui vantagens reprodutivas quando comparada a outras espécies por apresentar maturação sexual precoce em condições climáticas favoráveis (Lim & Webster, 2006; Ng & Romano, 2013), podendo acontecer por volta dos 3 a 4 meses de idade, podendo se reproduzir várias vezes ao longo do ano (8-12 vezes/ano), porém com poucos ovos por desova (80-200/fêmea) no início da fase reprodutiva (Quintero et al., 2011) e de tamanho médio de 2 a 7,9 mm (Duponchelle & Legendre, 1997; De Graaf et al., 1999).

Os fatores ambientais, tamanho das fêmeas, estado nutricional e condições de cultivo são fatores que influenciam no aumento ou redução do intervalo entre desovas (EL-SAYED, 2006). O intervalo entre as desovas pode variar de 14 a 55 dias (CAMPOS-MENDOZA et al., 2004). A prática da coleta de ovos na boca contribui para a redução do intervalo entre desovas o que permite a utilização mais eficiente das fêmeas, melhorando a sincronia de desovas (Campos-Mendoza et al., 2004; Coward & Bromage, 2000; Little et al., 1993; Ridha & Cruz, 2000). Além disso, a densidade de estocagem macho:fêmea (1:2 ou 1:3) ajudam a maximizar a produção de ovos resultando assim em uma maior produção de larvas (HUGHES & BEHREND, 1983; SIDDIQUI & AL-HARBI, 1997).

3. Análise seminal

3.1 CASA (Computer-assisted Sperm Analysis)

O CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) é um sistema computadorizado que consiste em avaliar a motilidade espermática de uma forma automática de captura e análise de sucessivas fotos dos espermatozoides, que avalia de uma forma precisa a cinética individual de cada espermatozoide, as quais, quando unidas, formam um filme com o trajeto de cada célula espermática (Amann & Kartz, 2004). As análises precisam ser feitas em um microscópio com câmera acoplado a um computador (FIGURA 3) e um software que possibilita avaliar o trajeto do espermatozoide que são obtidos por meio de marcações de pontos onde a cabeça do espermatozoide está em cada imagem, embora seja o flagelo que propulsiona o movimento do espermatozoide.



Figura 3. Computador e microscópio para avaliação espermática utilizando o sistema computadorizado CASA (Computer-assisted Sperm Analysis) (Fonte: Arquivo pessoal).

Após identificação do espermatozoide o software une as imagens e traçar a trajetória de cada célula e assim possibilita a classificação do movimento realizado (Mortimer & Maxwell, 1999). Para determinar esses padrões, são mensuradas as seguintes características espermáticas (Verstegen et al., 2002):

- MOT – motilidade (%). É relação entre espermatozoides considerados móveis e o total de espermatozoides no campo de visualização.
- VCL –velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$). É a velocidade real da célula ao longo da trajetória.
- VSL –velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$). É a velocidade média em função da linha reta entre o ponto inicial e ponto final da trajetória.
- VAP –velocidade média da trajetória ($\mu\text{m/s}$). É a velocidade da trajetória média do espermatozoide.
- ALH –amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm). Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.
- LIN – linearidade (%). É representada pela relação percentual entre VSL e VCL.
- STR – retilinearidade (%). Representa a relação percentual entre VSL e VAP.
- BCF –frequência de batimentos do flagelo (Hz). É o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento.
- WOB – oscilação (%). É a oscilação entre a trajetória real e a trajetória média, calculada a partir da relação percentual entre VAP e VCL.

3.2 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo consiste em uma técnica que possibilita a contagem, classificação e o isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com uma sonda fluorescente específica, são individualmente movidas por meio de um sistema detector óptico em fluxo laminar para contagem (Figura 5) (Freitas-Dell'aqua et al., 2009). É considerada uma técnica vantajosa quando comparada com outras técnicas usadas rotineiramente, em relação a viabilidade e integridade espermática, pois este sistema por ser automatizado consegue avaliar 10.000 espermatozoides em poucos minutos permitindo assim uma maior agilidade e exatidão em seus resultados (Arruda, 2000).



Figura 4. Citometro de Fluxo (Arquivo pessoal).

A utilização de programas, tais como o CASA (Análise de esperma assistida por computador) e avaliações usando citometro de fluxo em avaliações seminais não são técnicas comuns, embora essas análises sejam importantes para assegurar a qualidade espermática com maior precisão. Isso é importante, tendo em vista que as características espermáticas afetam a eficiência reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- Amann, R., Katz D.F., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, 25, 317 – 325.
- Arruda, R.P., 2000. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Baldisserotto, B., 2009. Fisiologia aplicada à piscicultura: Fisiologia aplicada à piscicultura. Santa Maria: UFSM, 352p.
- Baldisserotto, B., Gomes, L.C., 2013. Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil. 2ª Edição. Santa Maria: UFMS, 608p.
- Castagnolli, N., 1992. Criação de peixes de água doce. Jaboticabal: FUNEP.
- Coward, K., Bromage, N.R., 2000. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 1–25.
- Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N., 2004. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt.
- Ebrahimi, M., Daeman, N. H., Chong, C. M., Karami, A., Kumar, V., Hoseinifar, S. H., Romano, N., 2017. Comparing the effects of different dietary organic acids on the growth, intestinal short-chain fatty acids, and liver histopathology of red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) and potential use of these as preservatives. *Fish physiology and biochemistry*, 43(4), 1195-1207.
- Fishbase: Catalogue of life, 2021. Disponível em < <http://www.fishbase.org/> > Acessado em 20/01/2021.

- Freitas-Dell'Aqua, C.P., Crespilho, A.M., Papa, F.O., Dell'Aqua, Junior, J.A., 2009. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Rev Bras Reprod Anim*, 33, 213-222.
- Gomes, L.C., Lima, C.A.R.A., Roubach, R., Urbinati, E.C., 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de Tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 283-290.
- Gomes, L.C., Simões, L.N., Araújo-Lima, C.A.R.M., 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C.(Ed.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2 ed. Santa Maria: UFSM, 175-204.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2021. Disponível a partir de: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>, Acessado em 22/01/2021.
- Izel, A.C.U., Crescencio, R., O'Sullivan, F.L.A. Chagas, E. C., Boijink, C.L., 2018. Cultivo do tambaqui no Amazonas, 2a edição revista e atualizada. 2a. ed. Brasília: Embrapa, 59.
- Izel, A.C.U., Crescencio, R., O'Sullivan, F.L.A. Chagas, E. C., Boijink, C.L., Silva, J.I., 2013. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 39, Manaus, 4.
- Kubitza, F., 2004. Reprodução, Larvicultura e Produção de Alevinos de peixes Nativos. 1.ed. Jundiaí, [s.n.], 71.
- Lèveque, C., 2002. Out of Africa: the success story of tilapias. *Environmental Biology of Fishes*. 64, 461–464.
- Lenz, D.R., 2014. Caracterização e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores. Dissertação – (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Mendez, L.D.V., Poveda-Parra, A.R., 2011. Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo, first ed.

Uberlândia, MG, Brasil.

Mortimer, S.T., Maxwell, W.M.C., 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fertil Dev*, 11, 25-30.

Muniz, J.A.S.M., Catanho, M.T.J., Santos, J.G., 2008. Influência do fotoperíodo na reprodução induzida do Tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34, 205-211.

Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations on fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165, 516-534.

Nelson, J.S. 1984., *Fishes in the world*. 2nd Edition. A Wiley interscience Publication. John Wiley & Sons, New York.

Oliveira, C. A., Ribeiro, R.P., Streit Junior, D.P., Povh, J.A., Resende, E.K., 2012. Melhoramento genético de peixes, uma realidade para piscicultura Brasileira. *Panorama da Aquicultura*.

PeixeBr. Anuário PeixeBR da Piscicultura 2021. São Paulo: PeixeBR, 2021. 71 p.

Pires, L.B., Sanches, E.A., Romagosa, E., Corrêa Filho, R.A.C., Streit Jr, D.P., Nass, R.A.R., Povh, J.A., 2017. Semen characteristics of *Colossoma macropomum* from three successive sample collections in the same reproductive cycle. *Aquaculture research*, 1-7.

Popma, T.J., Lovshin, L., 1996. Worldwide Prospects for Commercial Production Of Tilápia, *Internacional Center for Aquaculture and Aquatic Environments*. Auburn: Auburn University, Alabama. *Research And Development*. 41, 23.

Ribeiro, R.P., Espécies exóticas. In: Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Zimmermann, S., 2001. *Fundamentos da moderna aquicultura*. Canoas: Ulbra, 11, 91-121.

- Saint-Paul, U., 2017. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 5, 1–9.
- Santos, G., Ferreira, E., Zuanon, J., 2006. Peixes comerciais de Manaus. Edição Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manaus/AM, ProVárzea, 54.
- Sidonio, L., Cavalcanti, I., Capanema, L., Morch, R., Magalhães, G., Lima, J., Burns, V., Alves Sr. A. & Munglioli, R. (2012). Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *BNDES setorial*. 35, 421-463.
- Shokr, E.S., 2015. Effect of Follicular Stimulating Hormone and Leutinizing Hormone on Reproduction, Physiological and Biochemical Changes of *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences Physiology & Molecular Biology*, 7(1), 61-73.
- Silva, J.W.B., 2009. Tilápias: biologia e cultivo. Evolução, situação atual e perspectivas da tilapicultura no Nordeste Brasileiro. Fortaleza: Edições UFC, 326.
- Sousa, D.B., 2002. Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10, 351-369.
- Verani, J. R., 1980. Controle populacional em cultivo intensivo consorciado entre Tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1757) e o tucunaré comum, *Cichla ocellaris* (Schneider, 1801) – Aspectos quantitativos. 116. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 31, 367-373.

Zardin, A.M.S.O., 2016. Impacto da seleção genética na morfometria e desempenho de tilápias do Nilo. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

Zimmermann, S., 1999. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aquicultura*, 9, 5, 15-21.

Zimmermann, S., Fitzsimmons, K., 2004. Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. 1. ed. São Paulo: TecArt, 1, 239-266.

Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197, 99-136.

OBJETIVOS

Experimento 1:

O objetivo foi avaliar o retorno reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum* no início do período reprodutivo e após 75 dias da primeira indução hormonal.

Experimento 2:

O objetivo foi comparar as características espermáticas de diferentes grupos genéticos de tilápias-do-Nilo em três coletas com intervalo de 30 dias.

CAPÍTULO I

*ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.006>

Reprodução induzida de fêmeas de *Colossoma macropomum* no início do período reprodutivo e após 75 dias da primeira indução hormonal

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a reprodução induzida de fêmeas de *Colossoma macropomum* no início do período reprodutivo e após 75 dias da primeira desova. O experimento foi conduzido em Nova Mutum, Mato Grosso, Brasil. Foram utilizadas oito fêmeas com médias de peso de 6,7 kg e quatro anos de idade. Foi realizada uma indução hormonal no início do período reprodutivo (outubro de 2016) e outra após 75 dias da primeira desova (dezembro de 2016). Foram avaliadas as seguintes características: peso dos oócitos liberados, índice de produção, fecundidade absoluta, diâmetro dos oócitos, taxas de fertilização de eclosão. Das oito fêmeas que desovaram na primeira indução reprodutiva, três fêmeas (37,5%) desovaram novamente após 75 dias. Duas fêmeas morreram após a primeira indução hormonal. Todas as características avaliadas foram semelhantes nas duas desovas, exceto a taxa de fertilização que foi menor ($P < 0,05$) na segunda desova. A maioria das fêmeas (66,7%) que desovaram novamente (2ª vez) após 75 dias apresentaram valores superiores à primeira indução hormonal para todas as características avaliadas, exceto para taxa de fertilização. Concluímos que é possível obter retorno reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum* após 75 dias da primeira desova induzida.

Palavras-chave: Peixes reofílicos, reprodução de peixes, retorno reprodutivo, tambaqui

1. Introdução

O tambaqui *Colossoma macropomum* é nativo da bacia amazônica e representa o segundo maior peixe de escamas da América do Sul (Goulding e Carvalho, 1982), podendo atingir 40 kg e 108 cm na natureza (Froese e Pauly, 2016). Este peixe é o segundo organismo aquático mais produzido no Brasil, com produção de 136.991,5 toneladas em 2016 (IBGE, 2017), apresenta bom desempenho zootécnico, com taxas de crescimento de 8,66 e 9,34 g dia⁻¹ para machos e fêmeas, respectivamente (Mello et al., 2015), e grande aceitação do mercado consumidor (Urbinati e Gonçalves, 2005).

A reprodução de *C. macropomum* em ambiente natural tem início com o aumento do fotoperíodo, temperatura e chuvas, com maior concentração das desovas entre os meses de novembro a fevereiro (Muniz et al, 2008). Todavia, a reprodução ocorre apenas quando os peixes sobem o rio no período da piracema, sendo que a ausência de migração dos peixes mantidos em

piscicultura não desencadeia ação dos hormônios indutores da desova (Nagahama, 1983). Embora na piscicultura as fêmeas possam apresentar desenvolvimento gonadal, o processo de maturação final não acontece (Zoar e Mylonas, 2001). Desta forma, a desova de peixes reofílicos na piscicultura ocorre somente com a utilização da indução hormonal (Woynarovich, 1986).

A reprodução induzida de *C. macropomum* é realizada apenas uma vez durante o período reprodutivo, o que tem levado a uma subutilização das matrizes. Neste sentido, pode-se destacar que a utilização das fêmeas mais de uma vez na estação reprodutiva possibilita maximizar a produção de alevinos provenientes de reprodutores de maior potencial genético, ponto este importante, considerando o atual desenvolvimento do programa de melhoramento genético de *C. macropomum* (Marcos et al., 2016). Além disso, a utilização das matrizes em mais de uma vez durante o período reprodutivo permite otimizar o plantel, bem como aumentar consideravelmente a produção de formas jovens da espécie.

Trabalhos com reprodução de *C. macropomum* foram realizados considerando a criopreservação de gametas (Varela et al., 2012), resfriamento de embriões (Pessoa et al., 2013), avaliação de diferentes indutores hormonais (Martins et al., 2017), aplicação de doses inseminantes (Leite et al., 2013), qualidade dos gametas (Maria et al., 2010), e retorno reprodutivo de machos (Pires et al., 2017), mas são inexistentes informações científicas quanto ao retorno reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum*. Desta forma, objetivou-se avaliar o retorno reprodutivo de fêmeas de *C. macropomum* no início do período reprodutivo e após 75 dias da primeira indução hormonal.

2. Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido em uma piscicultura localizada no município de Nova Mutum-MT, Brasil (13° 51' 57,2" S e 56° 11' 30,2" O). Foi realizada a primeira indução hormonal no início do período reprodutivo (outubro de 2016) e após o intervalo de 75 dias (dezembro de 2016). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil (Protocolo nº 643/2014).

Foram utilizadas oito fêmeas de *C. macropomum* com peso médio de 6,7 kg e com quatro anos de idade. Os peixes foram mantidos em tanque escavado com renovação de água de 10% ao dia. Durante todo o período de preparação dos reprodutores, estes foram alimentados com ração extrusada (28,0% de Proteína Bruta, Matéria Seca 92,6%, Matéria Mineral 13,4%, Extrato Etéreo 4,5% e Fibra Bruta 4,3%), sendo fornecido na quantidade de 1% do peso vivo ao dia.

As fêmeas foram selecionadas para reprodução conforme recomendado por Zaniboni Filho e Weingartner (2007), mediante análise das características externas como coloração eritematosa e aspecto edemaciado da papila urogenital e abdômen abaulado. Além das características externas, uma amostra de oócitos foi coletada utilizando a técnica de canulação intra-ovariana (Romagosa et al., 1990) e, posteriormente, mantidos em líquido de serra (60% etanol 90°, 30% formol, 10% ácido acético glacial) por três minutos (Bruzka, 1979), sendo consideradas aptas para reprodução apenas as fêmeas que apresentavam acima de 50% dos oócitos com vesícula germinativa deslocada do centro (Romagosa et al., 1990). Os oócitos foram preservados em solução de Gilson para mensuração dos diâmetros (100 oócitos por fêmea) (Simpson, 1951).

As fêmeas selecionadas foram transferidas para tanques de alvenaria (4,0 m³) no laboratório com renovação de água de 10 litros/segundo (temperatura média 28,0°C), onde foram pesadas e identificadas com microchip. Posteriormente, as fêmeas foram submetidas à indução hormonal com 5,5 mg de extrato de pituitária de carpa/kg de peso vivo em duas doses (10% inicial; e 90% após 12 horas) (Woynarovich e Horváth, 1983; Maria et al., 2012). Os machos selecionados para realizar as análises de taxa de fertilização e de eclosão foram induzidos com dose única de 2,5 mg de extrato de pituitária de carpa/kg (Streit Jr. et al., 2005).

Os peixes foram anestesiados com eugenol (50 mg/L) para a coleta dos gametas, sendo que os oócitos foram coletados conforme descrito por Woynarovich e Horváth (1980) e Caneppele et al. (2009), e o sêmen foi coletado conforme metodologia descrita por Sanches et al. (2011). Os gametas foram coletados após 240 horas-grau (Gomes, Simões e Araujo-Lima, 2010).

Após a coleta dos gametas realizou-se a fertilização artificial, para tanto, três amostras de 1 g de oócitos recém-misturado com pool de sêmen de três machos foram alocadas em peneira (1 mm) em incubadora cilindro-cônica (vazão de 7 litros/minuto e temperatura média de 28°C). Foram realizadas três repetições por fêmea.

As características reprodutivas avaliadas foram: peso dos oócitos; índice de produção - IP (número de oócitos liberados/peso do animal*100); fecundidade absoluta - FA (número de oócitos liberados na desova induzida); taxa de fertilização (% de ovos fertilizados); e taxa de eclosão (% de larvas eclodidas). A quantidade de oócitos liberados por fêmea foi obtido a partir do peso dos oócitos liberados multiplicado pela média da contagem de três amostras de 1 g. A taxa de fertilização foi estimada 8 h após o início da hidratação do ovo (fechamento do blastóporo) (Leite et al., 2013), e a taxa de eclosão logo após eclosão das larvas (entre 15 a 20 horas pós-fertilização) (Lima, 2014; Sanches et al., 2014).

3. Resultados

Oito fêmeas desovaram na primeira indução hormonal no início do período reprodutivo (outubro 2016). Destas, três fêmeas (37,6%) desovaram novamente após 75 dias (dezembro 2016) da primeira desova. Duas fêmeas (25,0%) morreram logo após a primeira desova (Tabela 1).

As fêmeas com maior e menor peso dos oócitos na primeira desova apresentavam pesos semelhantes, 6,5 e 6,2 kg, respectivamente. Na segunda desova a fêmea de maior peso também apresentou maior peso de oócitos. O peso de oócitos foi mais variável entre as fêmeas da primeira desova (276,0 a 690,0 g) em relação às da segunda desova (436,0 a 676,0 g). Duas das três fêmeas que desovaram novamente após 75 dias apresentaram maior peso de oócitos na segunda desova em relação à primeira desova. Todavia, as médias das duas desovas foram semelhantes (Tabela 1).

O índice de produção (IP) e fecundidade absoluta (FA) foram mais variáveis entre as fêmeas da primeira desova (IP: 4,4 a 20,5%; FA: 349,7 a 874,2 x 10³) em relação às da segunda desova (IP: 6,1 a 8,4%; FA: 495,3 x 10³ a 762,5 x 10³). Duas das três fêmeas que desovaram novamente após 75 dias apresentaram maior índice de produção e fecundidade absoluta. Todavia, as médias destas características foram semelhantes nas duas desovas (Tabela 1).

O diâmetro dos oócitos variou muito pouco entre as fêmeas da primeira desova (0,8 ± 0,2 a 1,1 ± 0,1 mm) e segunda desova (1,0 ± 0,2 a 1,1 ± 0,2 mm). As médias das duas desovas foram semelhantes (Tabela 1).

Os valores da taxa de fertilização apresentaram grande variação entre as fêmeas na primeira (78,8 ± 3,9 a 97,4 ± 1,7%) e na segunda desova (62,4 ± 3,8 a 82,2 ± 1,7%). A média dos valores da taxa de fertilização foram maiores ($p < 0,05$) na primeira desova (88,8 ± 6,1%) em relação à segunda desova (74,1 ± 10,4%) (tabela 1). Por outro lado, a taxa de eclosão variou pouco entre as fêmeas na primeira (87,9 ± 4,0 a 93,3 ± 3,6%) e na segunda desova (90,2 ± 3,2 a 91,0 ± 3,1%) e, diferentemente da taxa de fertilização, as médias das duas desovas foram semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1

Características reprodutivas de fêmeas de *C. macropomum* induzidas à reprodução no mesmo período reprodutivo (outubro a dezembro de 2016) com o intervalo de 75 dias entre as duas induções.

Peso (g)	Peso oócitos (g)		IP		FA (x 10 ³)		Diâmetro oócitos (mm)		Taxa Fertilização (%)*		Taxa Eclosão (%)	
	1ª desova	2ª desova	1ª desova	2ª desova	1ª desova	2ª desova	1ª desova	2ª desova	1ª desova	2ª desova	1ª desova	2ª desova
6900,0	320,5	436,0	4,6	6,3	364,1	495,3	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2	93,8 ± 2,1	77,6 ± 2,8	87,9 ± 4,0	90,5 ± 3,6
11000,0	640,0	676,0	5,8	6,1	721,9	762,5	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	87,0 ± 4,5	62,4 ± 3,8	91,0 ± 2,5	91,0 ± 3,1
6200,0	276,0	-	4,4	-	349,7	-	0,8 ± 0,2	-	88,2 ± 2,7	-	91,2 ± 3,4	-
6500,0	690,0	547,0	10,6	8,4	874,2	693,0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	97,4 ± 1,7	82,2 ± 1,7	93,3 ± 3,6	90,2 ± 3,2
3600,0	386,0	-	10,7	-	451,2	-	1,1 ± 0,1	-	83,0 ± 7,4	-	92,0 ± 1,8	-
4300,0	520,0	-	12,1	-	643,8	-	1,0 ± 0,2	-	78,8 ± 3,9	-	92,0 ± 2,1	-
9100,0	436,0	M	14,1	M	560,7	M	0,8 ± 0,1	M	93,5 ± 2,2	M	88,2 ± 3,7	M
6000,0	390,0	M	20,5	M	480,9	M	1,0 ± 0,2	M	88,6 ± 3,0	M	91,3 ± 2,9	M
Média	457,3	553,0	10,4	6,9	555,8	650,3	0,9	1,0	88,8	74,1	90,9	90,6
Desvio	147,9	120,1	5,5	1,3	182,3	138,6	0,1	0,1	6,1	10,4	1,9	0,4
Padrão												

IP: Índice de produção (número de oócitos/peso do animal*100); FA: fecundidade absoluta (número de oócitos vitelogênicos liberados na desova induzida). M: Fêmeas que morreram após a 1ª desova. * Diferença significativa (P<0,05) das médias dos valores entre a 1ª e 2ª desova conforme teste-t.

4. Discussão

Deve-se destacar que este é o primeiro relato sobre desovas sucessivas de fêmeas *C. macropomum* no mesmo período reprodutivo. Foi observado que 37,6% das fêmeas desovaram novamente após 75 dias da primeira desova. Desta forma, evidencia-se que é possível obter retorno reprodutivo de fêmeas no mesmo período reprodutivo, prática não explorada na piscicultura (fêmeas são utilizadas para reprodução apenas uma vez durante o ano). Todavia, alguns ajustes na indução hormonal podem aumentar a porcentagem de fêmeas com duas desovas no mesmo período reprodutivo. Dessa forma, assim como foi obtido sucesso em coletas sucessivas de sêmen de *C. macropomum* (Pires et al., 2017), estes resultados mostram que é possível obter coletas sucessivas de oócitos no mesmo período reprodutivo.

Embora tenha ocorrido êxito em duas coletas sucessivas de oócitos em um intervalo de 75 dias no mesmo período reprodutivo, foi observado que 25% das fêmeas morreram após a primeira desova. Este resultado reforça a necessidade de aperfeiçoamento dos protocolos reprodutivos mediante a utilização de novos indutores hormonais (atualmente apenas o extrato de hipófise de carpa é utilizado em fêmeas de *C. macropomum*), doses e/ou intervalo entre doses. Em machos de *C. macropomum* foram avaliados com sucesso diferentes indutores reprodutivos (Martins et al., 2017), porém não há relatos de sucesso reprodutivo de outros indutores em fêmeas de *C. macropomum*.

Maior peso de oócitos e fecundidade absoluta em relação ao presente trabalho foram obtidos por Galo et al. (2015) e Vieira et al. (1999) para *C. macropomum*, os quais observaram 1015,3 g e $1007,3 \times 10^3$ oócitos, respectivamente. Os maiores valores obtido por estes autores possivelmente foi devido ao maior peso dos peixes, tendo em vista que o índice de produção (relação entre o peso de oócitos e peso do peixe) obtido por Galo et al. (2015) foi semelhante (4,9 a 16,9%) ao presente trabalho (4,4 a 20,5%).

A quantidade de oócitos liberados demonstra o potencial reprodutivo das fêmeas (Laine e Rajasilta, 1998). Dessa forma, a obtenção de duas desovas sucessivas permite aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas. No presente trabalho é evidenciado grande aumento da quantidade de total de oócitos quando as fêmeas apresentam duas desovas comparativamente quando apresenta apenas a primeira desova. Os resultados evidenciam que é possível dobrar a

produção de oócitos com duas desovas no mesmo período reprodutivo (75 dias após a primeira desova), prática que não é explorada na piscicultura. Com reproduções sucessivas é possível maximizar a obtenção de alevinos das fêmeas de maior potencial genético, prática que tende apresentar enorme importância considerando o programa de melhoramento genético de *C. macropomum* em desenvolvimento.

Média semelhante da primeira e segunda desova para quantidade de oócitos, índice de produção e fecundidade absoluta indicam que as fêmeas de *C. macropomum* podem ser utilizadas mais de uma vez no mesmo período reprodutivo. Este resultado fica evidenciado considerando que a maioria das fêmeas que retornara à reprodução após 75 dias da primeira desova apresentaram maiores valores para estas características na segunda desova.

O diâmetro dos oócitos na primeira (0,8 a 1,1 mm) e segunda desova (1,0 a 1,1 mm) foi semelhante ao observado por Romagosa et al. (1990) e Chellappa et al. (1996) para *Piaractus mesopotamicus* (1,0 a 1,1 mm) e para *C. macropomum* (0,7 a 0,9 mm), respectivamente. Estes resultados indicam que os oócitos atingiram tamanho adequado para reprodução tanto na primeira quanto na segunda desova, sugerindo que o intervalo entre as desovas foi adequado para permitir que os oócitos atingissem tamanho adequado.

A menor média dos valores para taxa de fertilização da segunda desova ($74,1 \pm 10,4\%$) em relação a primeira desova ($88,8 \pm 6,1\%$) pode indicar necessidade de ajustes no manejo reprodutivo, tais como necessidade de uma diferente suplementação nutricional das fêmeas, principalmente após a primeira desova; e necessidade de um maior intervalo de recuperação dos peixes entre a primeira e segunda desova, tendo em vista que o estresse é um dos fatores que podem afetar a reprodução (Small 2004). Todavia, os valores obtidos por Galo et al. (2015) e por Chellappa et al. (1996) para *C. macropomum* foram relativamente próximos ao obtido no presente trabalho na primeira e segunda desova, com porcentagem de 86,3 e 80,0%, respectivamente. Além disso, a taxa de eclosão da primeira ($90,9 \pm 1,9\%$) e segunda desova ($90,6 \pm 0,4\%$) foram semelhantes e próximas ao observado por Galo et al. (2015), os quais encontraram taxa de eclosão de 89,0%.

A utilização de gametas de alta qualidade em peixes é importante para fertilização e, conseqüentemente, desenvolverem embriões normais (Bromage e Roberts, 1995; Bobe e Labbé, 2010). Neste contexto, embora a primeira desova tenha apresentado melhor taxa de

fertilização, pode-se dizer que em geral os oócitos apresentavam qualidade, que foi evidenciado pela alta taxa de eclosão na segunda desova (semelhante à primeira desova).

5. Conclusão

É possível obter retorno reprodutivo de fêmeas de *Colossoma macropomum* após 75 dias da primeira reprodução induzida, com produção de gametas e larvas viáveis para a produção.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT); Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; e Piscicultura Buriti, MT.

Referências

- Bobe, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocr.* 165, 535–548.
- Bromage, N.R., Roberts, R.J., 1995. *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, Blackwell Science, Oxford.
- BRZUSKA, E., 1979. The in vivo method of estimating the stages of oocyte maturation in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Hydrobiol.* 21, 423–433.
- Caneppele, D., Honji, R.M., Hilsdorf, A.W., Moreira, R.G., 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 7, 759–762.
- Chellappa, S., Cacho, M.S.R.F., Humtingford, F.A., Beveridge, M.C.M., 1996. Observations on induced breeding of the Amazonian fish tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) using CPE and HCG treatments. *Aquac. Res.* 27, 91–94.

Froese, R., Pauly, D., 2016. Fishbase: *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). <http://www.fishbase.se/summary/Colossoma-macropomum.html> (Accessed 03 September 2017).

Galo, J.M., Ribeiro, R.P., Streit Junior, D.P., Albuquerque, D.M., Fornari, D.C., Roma, C.F.C., Guerreiro, L.R.J., 2015. Oocyte quality of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the reproductive season. *Braz. J. Biol.* 75, 279–284.

Gomes, L.C., Simões, L.N., Araujo-Lima, C.A.R.M., 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*), in: Baldissotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. UFSM, Santa Maria, pp. 175–204.

Goulding, M., Carvalho, L.C., 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae) an important Amazon food fish. *Rev. Bras. Zoo.* 1, 107–133.

IBGE, 2018. Produção de aquicultura. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21> (Accessed 20 June 2018).

Laine, P., Rajasilta, M., 1998. Changes in the reproductive properties of Baltic herring females during the spawning season. *Fish. Res.* 36, 67–73.

Leite, L.V., Melo, M.A.P., Oliveira, F.C.E., Pinheiro, J.P.S., Campello, C.C., Nunes, J.F., Salmito-Vanderley, C.S.B., 2013. Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65, 421–429.

Marcos, R., Povh, J.A., Fornari, D.C., Oliveira, C.A.L., Ribeiro, R.P., Lopera-Barrero, N.M., Corrêa Filho, R.A.C., Abreu, J.S., Murari, P.J.F., 2016. Weight gain and morphometric growth of genetically improved tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Semina: Ciênc. Agrár.* 37, 2521–2528.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Carneiro, P.C.F., 2012. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 20, 39–43.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Silva, C.A., Carneiro, P.C.F., 2010. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 779–783.

Martins, E.F.F., Streit Junior, D.P., Abreu, J.S., Correa Filho, R.A., Oliveira, C.A.L., Lopera Barrero, N.M., Povh, J.A., 2017. Ovopel and carp pituitary extract for the reproductive induction of *Colossoma macropomum* males. *Theriogenology* 98, 57–61.

Mello, F., Oliveira, C.A.L., Ribeiro, R.P., Resende, E.K., Povh, J.A., Fornari, D.C., Barreto, R.V., McManus, C., Streit Junior, D., 2015. Growth curve by Gompertz nonlinear regression

model in female and males in tambaqui (*Colossoma macropomum*). An. Acad. Bras. Ciênc. 87, 2309–2315.

Muniz, J.A.S.M., Catanho, M.T.J., Santos, J.G., 2008. Influência do fotoperíodo na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). Bol. Inst. Pesca. 34, 205–211.

Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. Fish Physiol. 9, 223–275.
Pessoa, N.O., Evangelista, J.S.A., Souza Filho, F.G.M., Souza, M.L.N.M., Arthur, V.L., Sampaio, C.M.S., 2013. Chilling of tambaqui (*Colossoma macropomum*) embryos at different times of storage. Rev. Bras. Hig. San. Anim. 7, 323–344.

Pires, L.B., Sanches, E.A., Romagosa, E., Corrêa Filho, R.A.C., Streit Junior., D.P., Nass R.A.R., Povh, J.A., 2017. Semen characteristics of *Colossoma macropomum* from three successive sample collections in the same reproductive cycle. Aquacult. Res. 48, 1–7.

Romagosa, E., Paiva, P., Godinho, H.M., 1990. Pattern of oocytes diameter frequency distribution in females of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg 1895) induced to spawning. Aquaculture 86, 105–110.

Sanches, E.A., Neumann, G., Baggio, D.M., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E., 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture 319, 453–458.

Simpson, A. C., 1951. The fecundity of the plaice, Fishery Invest, London. Small, B.C., 2004. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. J. Fish. Biol. 64, 589–596.

Souza, F.N., Martins, E.F.F., Corrêa Filho, R.A.C., Abreu, J.S., Pires, L.B., Streit Jr., D.P., Lopera-Barrero, N.M., Povh, J.A., 2018. Ovopel® and carp pituitary extract for induction of reproduction in *Colossoma macropomum* females. Anim. Reprod. Sci. 195, 53–57.

Streit Junior, D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Sakaguty, E.S., Povh, J.A., Moreira H.L.M., 2005. Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Acta Sci. Anim. Sci. 27, 439–447.

Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Gheller, S.M.M., Jardim, R.D., Lucia Junior, T., Streit Junior, D.P., Figueiredo, M.R.C., 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. Theriogenology 78, 244–251.

Vieira, E.F., Isaac, V.J., Fabre, N.N., 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo amazonas, Brasil. Acta Amazônica 29, 625–638.

Woyanovich, E., 1986. Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos, CODEVASF, Brasília.

Woynarovich, E., Horváth, L., 1983. A propagação artificial de peixes de água tropicais: Manual de extensão, FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília.

Zaniboni Filho, E., Weingartner, M., 2007. Induced breeding in migratory fishes. Ver. Bras. Reprod. Anim. 31, 367–373.

Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99–136.

CAPÍTULO II

Resumo

O objetivo do estudo foi comparar as características espermáticas de diferentes grupos genéticos de tilápias-do-Nilo em três coletas com intervalo de 30 dias. Foram utilizados 30 exemplares de tilápia-do-Nilo (500 g), divididos em três grupos, sendo: (i) grupo com 10 peixes endogâmicos (AquaAmérica irmãos completos, consanguinidade de 25% dos pais); (ii) grupo com 10 peixes não endogâmicos (AquaAmérica sem ancestrais comuns até a terceira geração), com consanguinidade no máximo igual a 2%, sem nenhum bisavô comum dos pais; (iii) grupo com 10 peixes provenientes do cruzamento AquaAmérica X GIFT. Foram avaliadas as características seminais pelo sistema computadorizado (Sperm Class Analyzer), integridade de membrana e atividade mitocondrial. Em nenhuma das coletas houve diferença significativa entre as características espermática entre os grupos genéticos nas diferentes coletas, exceto para a frequência de batimento cruzado (BCF) na primeira coleta, em a AquaAmérica endogâmica apresentou menor ($P<0,05$) valor (7,44 Hz) em relação a AquaAmérica não endogâmica (8,69 Hz). Na comparação de das coletas de cada grupo genético, apenas BCF no grupo AquaAmérica endogâmico diferiu significativamente ($P<0,05$), com maior valor na coleta 3 (7,7 Hz) em relação a coleta 2 (6,86 Hz); e no grupo AquaAmérica não endogâmico na primeira coleta 1 (8,77 Hz) em relação a segunda (7,3 Hz) e terceira (7,31 Hz) coletas. A integridade da membrana e atividade mitocondrial, apenas a porcentagem de membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial no grupo genético AquaAmérica endogâmica que foi menor ($P<0,05$) na coleta 2 (0,29%) em relação as coletas 1 (8,34%) e 3 (8,72%); a membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial no grupo AquaAmérica não endogâmica que foi maior ($P<0,05$) na coleta 2 (27,1%) em relação a coleta 1 (2,97) e 3 (1,72) e no grupo AquaAmérica x GIFT que foi maior ($P<0,05$) na coleta 2 (68,02%) em relação as coletas 1 (6,19%) e 3 (5,79%). Conclui-se que a variedade AquaAmérica não endogâmica apresenta maiores valores para a variável BCF na primeira coleta, a variável que apresenta comportamento distinto entre o grau de endogamia da variedade AquaAmérica ao longo das coletas, inclusive com grande contraste entre a integridade da membrana e atividade mitocondrial entre as coletas.

Palavras-chave: Análise espermática computadorizada assistida, Citometria de fluxo, Coletas seminais sucessivas, Qualidade Espermática.

1. Introdução

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de alto interesse comercial por apresentar características desejáveis ao cultivo como: rusticidade, adaptabilidade a diversas condições de criação, alta taxa de crescimento, além de uma boa aceitação no mercado consumidor (Turra et al., 2010). Esta espécie tem sido um dos principais organismos aquáticos produzidos no mundo, sendo que em 2019 representou o terceiro peixe mais produzido no mundo (FAO, 2020).

A tilápia-do-Nilo apresenta hábito alimenta onívoro e se reproduzem naturalmente no tanque (Kubitza, 2011). Vários trabalhos têm sido realizados para esta espécie no mundo em diversas áreas do conhecimento, tais como aprimorar características produtivas (Ponzoni et al., 2005; Fülber et al., 2009), genética (Melo et al., 2008; Fortes-Silva et al., 2010), nutricional (Tsadik e Bart, 2007; Nakaghi et al., 2009) e reprodutivas (Mataveli et al., 2007; Bombardelli et al., 2009). Embora esta espécie tenha programa de melhoramento genético consolidado no mundo (Nguyen, 2016), não há avaliações quanto ao efeito da endogamia e do cruzamento entre variedades quanto as características reprodutivas de machos.

O uso de gametas de alta qualidade é um fator indispensável na seleção de reprodutores a fim de garantir a excelência na produção de descendentes na aquicultura (Kjørsvik et al., 1990; Bromage e Roberts, 1995). Embora a reprodução da tilápia-do-Nilo ocorra de forma natural é crucial a utilização de gametas de alta qualidade. A utilização de programas, tais como o CASA (Análise de espermatozoides assistida por computador) para avaliações seminais não é uma técnica comum, embora essas análises sejam importantes para assegurar a qualidade espermática com maior precisão. Isso é importante, tendo em vista que as características espermáticas afetam a eficiência reprodutiva (Billard et al., 1995; Cosson et al., 1999; Rurangawa et al., 2004). O objetivo do estudo foi avaliar as características espermáticas de diferentes grupos genéticos de tilápias-do-Nilo em três coletas com intervalo de 30 dias.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Piscicultura da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), localizada no Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (20°29'58" S e 54°36'51" W). Foram realizadas três coletas de sêmen ao longo de 60 dias, com intervalo entre as coletas de 30 dias. No início do experimento, em dezembro, a temperatura máxima e mínima do ar e pluviosidade foram 30,39°C, 21,07°C e 50 mm, respectivamente; e no final, em fevereiro, a temperatura máxima e mínima do ar e pluviosidade foram 30,24°C, 20,84°C e 92 mm, respectivamente (CEMTEC/MS).

Os peixes foram alimentados com ração extrusada (32% de proteína bruta, 6,5% extrato etéreo, 4% matéria fibrosa, 14% matéria mineral, e 12% de umidade) até a saciedade aparente. Foram utilizados 30 exemplares de tilápia-do-Nilo, com peso médio de 500 g divididos em três grupos, sendo o primeiro grupo com 10 peixes endogâmicos (aquAmérica irmãos completos, consanguinidade de 25% dos pais); segundo grupo com 10 peixes não endogâmicos (AquAmérica sem ancestrais comuns até a terceira geração), com consanguinidade no máximo igual a 2%, sem nenhum bisavô comum dos pais; e terceiro grupo com 10 peixes provenientes do cruzamento AquAmérica X GIFT.

3. Análise Espermática

Para análise do sêmen os peixes foram envoltos com uma toalha úmida, a papila urogenital foi seca com papel toalha e o sêmen coletado mediante compressão dos testículos no sentido céfalo-caudal, sendo descartada a primeira gota para evitar contaminação com água, urina ou sangue, conforme recomendação por Poupard et al., (1998). O sêmen foi coletado em seringas graduadas (5 mL) até a redução da liberação, conforme protocolo descrito por Billard et al., (1993).

As seringas contendo sêmen foram armazenadas diretamente em caixas de isopor (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 20 cm de altura) com gelo (uma camada de 4 cm). As seringas foram colocadas (horizontalmente) sobre um suporte 2 cm acima do gelo, possibilitando assim manter a temperatura média de $16,9 \pm 2,1^{\circ}\text{C}$ (média obtida durante todo o

período experimental usando um termômetro que foi fixado dentro da caixa) conforme protocolo adaptado por de Pires et al., (2018).

A cinética espermática foi avaliada de forma objetiva pelo sistema computadorizado (Sperm Class Analyzer, SCA®, Microptic, Barcelona, Espanha), sendo avaliadas as seguintes variáveis: taxas de motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), amplitude lateral de cabeça (ALH), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e frequência de batimento transposto (BCF). Para estas análises os espermatozoides foram ativados em água destilada na proporção de 1:250 (sêmen:água destilada) e, após a ativação, foram colocados na câmara de Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel), sendo que o aparelho foi calibrado conforme as recomendações do fabricante para análise de sêmen de peixe. Foram avaliados aleatoriamente cinco campos por amostra.

4. Integridade de Membrana e Potencial Mitocondrial

A avaliação da integridade de membrana e atividade mitocondrial espermática foi realizada por citometria de fluxo utilizando o equipamento CytoFLEX® (Beckman Coulter, Pasadena, Califórnia, EUA) equipado com laser: violeta 405 nm, azul 488 nm e vermelho 638 nm, com 13 canais de detecção de fluorescência. Após a análise, avaliou-se os dados pelo programa do mesmo fabricante CytExpert Acquisition software.

Foram utilizadas as sondas fluorescentes Hoechst 33342 (Thermo Scientific™), Iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) e MitoStatus Red (BD Pharmingen™) em associação. A sonda Hoechst 33342 (excitação/emissão = 350/461 nm) foi utilizado para corar o núcleo das células. O Iodeto de propídio (intercalante de DNA - excitação/emissão = 535/617nm) foi utilizado para visualizar a fluorescência na membrana celular e determinar a permeabilidade (integridade da membrana). Por fim, Mitostatus red (cátion lipofílico que é sequestrado e se acumula na mitocôndria de células saudáveis - excitação/emissão = 622/648 nm), foi utilizado para demonstrar o potencial mitocondrial. Para as análises, foi adicionando em um tubo de ensaio uma alíquota de 5 µL de sêmen, 180 µL do diluente TALP-PVA modificado de Parrish et al., (1988); (100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio (60%), 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM

Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinílico), 50 µL (1mg/mL) de Hoechst 33363, 2 µL (50µg/mL) de Iodeto de propídio e 2µL (1µg/mL) de MitoStatus Red), conforme Freitas-Dell'Aqua et al., (2012) com modificações de Camargo et al., (2016). Após 20 minutos de incubação a 37°C em ambiente escuro, 1mL de TALP-PVA foi adicionado e procedeu-se a leitura no Citômetro de fluxo.

5. Análises Estatísticas

A verificação das pré-suposições da análise de variância (ANAVA) foi feita pelo Teste de Shapiro-Wilk para normalidade e pelo Teste de Levene para homogeneidade de variâncias. Nas comparações entre Grupos Genéticos, quando os pré-requisitos da ANAVA foram atendidos, todas as variáveis dependentes foram analisadas usando a ANOVA com uma variável independente (Grupo Genético) e posterior Teste t de Student no nível de significância de 5%. Quando os pré-requisitos da ANAVA não foram atendidos, foi utilizado o Teste de Kruskal – Wallis, seguido do teste de Dunn. Nas comparações entre Grupos Genéticos para as características espermáticas relacionadas a motilidade, somente as variáveis ALH, LIN e WOB foram submetidas a análises não paramétricas. No caso anterior, todas as características espermáticas relacionadas a integridade de membrana foram submetidas a análises não paramétricas.

Nas comparações entre Coletas, quando os pré-requisitos da ANAVA foram atendidos, todas as variáveis dependentes foram analisadas usando a ANOVA com duas variáveis independentes (Indivíduo e Coleta) e posterior Teste t de Student no nível de significância de 5%. Quando os pré-requisitos da ANAVA não foram atendidos, foi utilizado o Teste de Friedman, seguido do teste de Dunn. Nas comparações entre Coletas para as características espermáticas relacionadas a motilidade, somente as variáveis ALH, LIN e WOB foram submetidas a análises não paramétricas. No caso anterior, todas as características espermáticas relacionadas a integridade de membrana foram submetidas a análises não paramétricas. Todas as análises foram feitas seguindo as recomendações de Zar (2010) e utilizando o Sistema de Análise Estatística (SAS, 2002).

6. Resultados

Na primeira coleta a motilidade espermática assim como as demais variáveis obtidas pelo CASA não diferiram entre os grupos genéticos AquaAmérica endogâmico, AquaAmérica não endogâmico e AquaAmérica x GIFT, exceto para BCF, em a AquaAmérica endogâmica apresentou menor ($P<0,05$) valor em relação a AquaAmérica não endogâmica. Nas coletas 2 (30 dias da primeira coleta) e 3 (30 dias da segunda coleta) esta variável, assim como as demais variáveis analisadas pelo CASA, não diferiram significativamente entre nenhum dos grupos genéticos (Tabela 1).

Na comparação entre as coletas, a motilidade espermática assim como as demais características obtidas pelo CASA não diferiram entre os grupos genéticos AquaAmérica endogâmico, AquaAmérica não endogâmico e AquaAmérica x GIFT exceto para a variável BCF no grupo AquaAmérica endogâmico, que foi maior ($P<0,05$) nos machos da coleta 3 em relação aos machos da coleta 2; e no grupo AquaAmérica não endogâmico, que foi maior ($P<0,05$) nos machos da coleta 1 em relação aos machos das demais coletas. As características seminais nas coletas 1, 2 e 3 não diferiram significativamente no grupo genético AquaAmérica x GIFT (Tabela 2).

Tabela 1. Médias para características espermáticas relacionadas a motilidade em tilápias-do-Nilo de diferentes grupos genéticos na primeira (0 dia), segunda (30 dias) e terceira (60 dias) coleta respectivamente.

Características	Grupo Genético – Coleta 1 ⁽²⁾			CV(%)	Valor-P ⁽³⁾
	Aqua. Endog.	Aqua. Não Endog.	Aqua X GIFT.		
Espermáticas ⁽¹⁾					
MOT (%)	83,20	74,39	81,06	13,69	0,219
VCL (µm/s)	33,83	30,63	35,06	22,46	0,429
VSL (µm/s)	21,30	20,46	21,50	31,46	0,937
VAP (µm/s)	27,54	25,28	27,90	27,14	0,708
ALH (µm)	1,46 (12,89)	1,48 (13,33)	1,65 (17,00)	-	0,472
LIN (%)	61,93 (13,22)	66,33 (17,00)	61,33 (13,40)	-	0,541
STR (%)	76,12	80,47	76,60	10,14	0,446
WOB (%)	80,39 (14,17)	82,22 (15,39)	79,24 (14,00)	-	0,924
BCF (Hz)	7,44 ^b	8,69 ^a	7,91 ^{ab}	12,06	0,035
Grupo Genético – Coleta 2 ⁽²⁾					
MOT (%)	83,60	81,42	89,56	11,34	0,217
VCL (µm/s)	33,48	38,76	35,69	32,06	0,659
VSL (µm/s)	18,78	25,41	22,48	30,33	0,166
VAP (µm/s)	26,18	32,35	29,59	30,79	0,407
ALH (µm)	1,79 (15,31)	1,60 (11,50)	1,63 (12,28)	-	0,542
LIN (%)	57,29 (9,12)	64,51 (14,14)	64,56 (14,22)	-	0,254
STR (%)	72,32	78,19	76,54	8,42	0,187
WOB (%)	78,84 (9,31)	83,38 (14,81)	83,88 (14,67)	-	0,228
BCF (Hz)	6,86	7,41	7,92	21,83	0,418
Grupo Genético – Coleta 3 ⁽²⁾					
MOT (%)	92,01	87,80	81,50	10,14	0,056
VCL (µm/s)	36,75	37,28	32,81	20,45	0,410
VSL (µm/s)	21,92	21,05	17,51	21,16	0,097
VAP (µm/s)	29,38	28,52	24,51	19,12	0,144
ALH (µm)	1,71 (11,41)	1,75 (13,88)	1,90 (17,69)	-	0,225
LIN (%)	60,55 (16,82)	56,26 (12,38)	55,58 (11,75)	-	0,306
STR (%)	74,80	73,40	72,00	9,08	0,668
WOB (%)	80,55 (17,23)	76,38 (11,50)	76,30 (12,06)	-	0,213
BCF (Hz)	7,69	7,35	7,34	12,25	0,632

(1) - MOT – motilidade espermática, VCL - velocidade curvilinear, VAP - velocidade média de deslocamento, VSL - velocidade em linha reta, ALH- amplitude lateral de cabeça, LIN – linearidade, STR - retilinearidade, WOB – oscilação e BCF - frequência de batimento transposto.

(2) - Aqua. Endog. - AquaAmérica Endogamico, Aqua. Não Endog. - AquaAmérica Não Endogamico e Aqua X GIFT – Mestiço AquaAmérica e Gift.

(3) - Valor-P da Análise de variância para MOT, VCL, VAP, VSL, STR e BCF e do Teste de Kruskal – Wallis para ALH, LIN e WOB.

(4) - Valores médios seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste t de Student ou pelo Teste de Dunn, no nível 5% de significância. Os valores entre parênteses são os postos médios.

Tabela 2. Médias para características espermáticas relacionadas a motilidade em tilápias-do-Nilo do grupo AquaAmérica endogâmica, AquaAmérica não endogâmica e AquaAmérica x GIFT em três coletas diferentes no mesmo período reprodutivo respectivamente.

Características	Coleta - AquaAmérica endogâmica ⁽²⁾			CV(%)	Valor-P ⁽³⁾
Espermáticas ⁽¹⁾	1	2	3		
MOT (%)	82,95	83,60	93,24	12,43	0,137
VCL (µm/s)	32,54	33,47	36,54	29,14	0,708
VSL (µm/s)	20,35	18,78	22,24	31,67	0,576
VAP (µm/s)	26,22	26,18	29,50	29,92	0,655
ALH (µm)	1,45 (1,62)	1,79 (2,38)	1,64 (2,00)	-	0,289
LIN (%)	61,50 (2,12)	57,29 (1,75)	62,29 (2,12)	-	0,687
STR (%)	76,16	72,32	76,05	9,34	0,476
WOB (%)	79,65 (2,12)	78,84 (1,88)	81,65 (2,00)	-	0,882
BCF (Hz)	7,44 ^{ab}	6,86 ^b	7,70 ^a	8,37	0,045
Coleta - AquaAmérica não endogâmica ⁽²⁾					
MOT (%)	72,89	82,04	87,47	15,03	0,117
VCL (µm/s)	29,99	38,74	36,31	20,26	0,097
VSL (µm/s)	20,77	25,00	20,57	30,15	0,401
VAP (µm/s)	25,07	32,16	27,81	24,91	0,208
ALH (µm)	1,44 (1,36)	1,64 (2,21)	1,77 (2,43)	-	0,097
LIN (%)	68,71 (2,57)	64,51 (2,00)	56,39 (1,43)	-	0,101
STR (%)	82,36	77,39	73,49	9,03	0,099
WOB (%)	83,33 (2,29)	82,89 (2,29)	76,41 (1,43)	-	0,180
BCF (Hz)	8,77 ^a	7,30 ^b	7,31 ^b	8,19	0,001
Coleta - AquaAmérica x GIFT ⁽²⁾					
MOT (%)	82,33	89,30	78,18	8,45	0,058
VCL (µm/s)	35,77	37,77	33,25	27,31	0,729
VSL (µm/s)	22,58	21,93	17,08	34,65	0,379
VAP (µm/s)	28,95	30,08	24,28	29,96	0,468
ALH (µm)	1,60 (1,75)	1,70 (1,92)	1,90 (2,33)	-	0,568
LIN (%)	63,20 (2,33)	59,48 (2,17)	53,33 (1,50)	-	0,311
STR (%)	77,60	73,53	70,82	10,40	0,346
WOB (%)	80,63 (2,00)	80,62 (2,33)	74,50 (1,67)	-	0,513
BCF (Hz)	7,70	8,28	7,10	25,73	0,601

(1) - MOT – motilidade espermática, VCL - velocidade curvilinear, VAP - velocidade média de deslocamento, VSL - velocidade em linha reta, ALH- amplitude lateral de cabeça, LIN – linearidade, STR - retilinearidade, WOB – oscilação e BCF - frequência de batimento transposto.

(2) - 1 – primeira coleta, 2 – segunda coleta e 3 – terceira coleta.

(3) - Valor-P da Análise de variância para MOT, VCL, VAP, VSL, STR e BCF e do Teste de Friedman para ALH, LIN e WOB.

(4) Valores médios seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste t de Student ou pelo Teste de Dunn, no nível 5% de significância. Os valores entre parênteses são os postos médios.

A porcentagem de membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial (PI+ MTS+), membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial (PI+ MTS-),

membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial (PI- MTS-) e membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial (PI-MTS+) não diferiram nos grupos genéticos avaliados nas coletas 1, 2 e 3 (Tabela 3).

Tabela 3. Medianas (Postos Médios) para características espermáticas relacionadas a integridade de membrana plasmática em sêmen de tilápias-do-Nilo de diferentes grupos genéticos na primeira (0 dia), segunda (30 dias) e terceira (60 dias) coleta respectivamente.

Características espermáticas ⁽¹⁾	Grupo Genético – Coleta 1 ⁽²⁾			Valor-P ⁽³⁾
	Aqua. Endog.	Aqua. Não Endog.	Aqua. X GIFT	
PI+ MTS+ (%)	8,34 (11,25)	8,86 (13,33)	6,64 (10,38)	0,694
PI+ MTS- (%)	51,58 (10,25)	57,45 (12,50)	58,90 (12,00)	0,784
PI- MTS- (%)	27,52 (13,00)	27,03 (11,25)	24,51 (10,19)	0,682
PI-MTS+ (%)	7,64 (13,50)	2,97 (9,33)	6,19 (11,12)	0,483
	Grupo Genético – Coleta 2 ⁽²⁾			
	Aqua. Endog.	Aqua. Não Endog.	Aqua. X GIFT	
PI+ MTS+ (%)	0,29 (8,00)	0,78 (14,33)	0,38 (9,71)	0,142
PI+ MTS- (%)	44,42 (12,14)	33,72 (12,50)	11,53 (7,14)	0,175
PI- MTS- (%)	28,83 (11,86)	26,98 (13,17)	14,65 (6,86)	0,119
PI-MTS+ (%)	37,02 (9,00)	27,10 (7,67)	68,02 (14,43)	0,085
	Grupo Genético – Coleta 3 ⁽²⁾			
	Aqua. Endog.	Aqua. Não Endog.	Aqua. X GIFT	
PI+ MTS+ (%)	8,72 (12,62)	1,24 (7,50)	0,95 (8,80)	0,206
PI+ MTS- (%)	30,06 (7,12)	75,20 (13,33)	59,77 (10,60)	0,119
PI- MTS- (%)	15,42 (10,25)	20,21 (9,50)	19,89 (10,20)	0,965
PI-MTS+ (%)	20,85 (12,38)	1,72 (7,25)	5,79 (9,50)	0,234

(1) PI+ MTS+ - Membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial, PI+ MTS- - Membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial, PI- MTS- - Membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial e PI-MTS+ - Membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial.

(2) - Aqua. Endog. - Aquamerica Endogâmico, Aqua. Não Endog. - Aquamerica Não Endogâmico e Aqua X GIFT – Mestiço Aquamerica e Gift.

(3) - Valor-P do Teste de Friedman.

(4) Valores medianos seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Dunn, no nível 5% de significância.

A porcentagem de membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial (PI+ MTS+) no grupo genético AquaAmérica endogâmica foi menor ($P < 0,05$) na coleta 2 em relação as coletas 1 e 3. As demais variáveis de integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial não diferiu significativamente no referido grupo genético nas três coletas (Tabela 4).

A porcentagem de membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial (PI-MTS+) nos grupos genéticos AquaAmérica não endogâmica e AquaAmérica x GIFT foram

maiores ($P < 0,05$) na coleta 2 em relação a coleta 1 e em relação a coleta 1 e 3, respectivamente. As demais variáveis de integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial não diferiu significativamente nos referidos grupos genéticos nas três coletas (Tabela 4).

Tabela 4. Medianas (Postos Médios) para características espermáticas relacionadas a integridade de membrana plasmática em sêmen de tilápias-do-Nilo do grupo AquaAmérica endogâmica, AquaAmérica não endogâmica e AquaAmérica x GIFT em três coletas diferentes no mesmo período reprodutivo respectivamente.

Características espermáticas ⁽¹⁾	Coleta - AquaAmérica endogâmica ⁽²⁾			Valor-P ⁽³⁾
	1	2	3	
PI+ MTS+ (%)	8,34 (2,25) ^a	0,29 (1,03) ^b	8,72 (2,38) ^a	0,020
PI+ MTS- (%)	51,58 (2,37)	44,42 (1,79)	30,06 (1,62)	0,270
PI- MTS- (%)	27,52 (2,38)	28,83 (1,94)	15,42 (1,50)	0,195
PI-MTS+ (%)	7,64 (1,38)	37,02 (2,39)	20,85 (2,12)	0,114
Coleta - AquaAmérica não endogâmica ⁽²⁾				
PI+ MTS+ (%)	8,86 (2,67)	0,78 (1,67)	1,24 (1,67)	0,135
PI+ MTS- (%)	57,45 (2,17)	33,72 (1,33)	75,20 (2,50)	0,114
PI- MTS- (%)	27,03 (2,00)	26,98 (2,33)	20,21 (1,67)	0,513
PI-MTS+ (%)	2,97 (1,50) ^b	27,10 (2,83) ^a	1,72 (1,67) ^{ab}	0,042
Coleta - AquaAmérica x GIFT ⁽²⁾				
PI+ MTS+ (%)	6,64 (2,25)	0,38 (1,38)	0,95 (1,41)	0,111
PI+ MTS- (%)	58,90 (2,12)	11,53 (1,05)	59,77 (2,15)	0,050
PI- MTS- (%)	24,51 (2,00)	14,65 (1,69)	19,89 (1,39)	0,529
PI-MTS+ (%)	6,19 (1,25) ^b	68,02 (2,60) ^a	5,79 (1,34) ^b	0,011

- (1) - PI+ MTS+ - Membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial, PI+ MTS- - Membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial, PI- MTS- - Membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial e PI-MTS+ - Membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial.
- (2) - Aqua. Endog. - AquaAmérica Endogamico, Aqua. Não Endog. - AquaAmérica Não Endogamico e Aqua X GIFT – Mestiço AquaAmérica e Gift.
- (3) - Valor-P do Teste de Friedman.
- (4) Valores medianos seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Dunn, no nível 5% de significância.

7. Discussão

Importante destacar que embora os programas de melhoramento genético de tilápia-do-Nilo no Brasil estejam bastante consolidados, não tem sido observado informações quanto ao efeito da seleção nas características reprodutivas e, da mesma forma, da possibilidade da inserção de novo material genético (cruzamento entre diferentes variedades) no sentido de minimizar os possíveis efeitos negativos da endogamia na reprodução. Além disso, a

intensidade de utilização de reprodutores de diferentes variedades é pouco documentada, principalmente para machos, tendo em vista que a reprodução da espécie usualmente é realizada de forma natural nos tanques de reprodução. Neste presente estudo não é possível observar grandes variações entre os grupos genéticos em três coletas (intercaladas a cada 30 dias) para a características reprodutivas do macho, no entanto, é interessante observar que a variedade AquaAmérica não endogâmica apresentou melhores valores para a variável BCF na primeira coleta. Além disso, chama atenção que a referida variável teve comportamento distinto entre o grau de endogamia da variedade AquaAmérica ao logo das coletas, inclusive com grande contraste entre a integridade da membrana e atividade mitocondrial entre as coletas nos grupos genéticos avaliados.

A motilidade espermática é a principal característica relacionada a movimentação do espermatozoide e está ligada a fecundação, sendo assim muitos estudos têm sido realizados mostrando a relação entre motilidade e a taxa de fertilização (Correa et al., 1997; Farrell et al., 1998; Januskaukas et al., 2003; Gillan et al., 2008). O sêmen fresco de peixes neotropicais costuma apresentar motilidade espermática considerada alta, acima de 70% quando ativados (Viveiros e Godinho, 2009). Dessa forma, embora não se tenha um valor mínimo estipulado que garanta a eficácia de fertilização, valores acima de 70% são considerados viáveis (Murgas et al., 2015). Embora estes valores sejam padrões estabelecidos para análises subjetiva, sem a utilização de programas computacionais mais precisos como o CASA, a motilidade espermática observada entre os três grupos genéticos nos diferentes tempos de coleta indica que a endogamia na variedade AquaAmérica não interferiu negativamente. Da mesma forma, não houve melhora nesta variável com o cruzamento entre as variedades AquaAmérica x GIFT. Por fim, a motilidade espermática obtido para os diferentes grupos genéticos apresentaram valores próximos ao observado por Mataveli et al., (2007) para tilápia-do-Nilo (77,9 a 81,1%) da variedade Chitralada (não melhorada geneticamente) avaliada no Brasil por análise subjetiva (sem a utilização do programa CASA), e em relação ao observado por Dzyuba et al., (2019) para tilápia-do-Nilo de uma variedade selvagem no Egito (84 a 96%) com a utilização do programa CASA, indicando que os valores encontrados no presente trabalho estão dentro do esperado para motilidade espermática, e que o intervalo de 30 dias entre as coletas não interferiu nesta característica e, portanto, esta intensidade de utilização dos machos é adequada.

Embora as características seminais VCL, VSL e VAP não diferiram entre os grupos genéticos nas coletas e nos grupos genéticos nas coletas, os valores encontrados foram menores ao observado por Gennotte et al., (2012) (VCL: $\sim 75 \mu\text{m/s}$; VSL: $\sim 40\% \mu\text{m/s}$; e VAP: $\sim 45 \mu\text{m/s}$). Esta diferença contrastante destes autores em relação ao presente trabalho para estas variáveis pode ser devido a temperatura da água no momento da ativação do espermatozoide, tendo em vista que Dzyuba et al., (2019) encontraram alterações para as variáveis VCL e VSL (também observaram para motilidade espermática e LIN) nas temperaturas de 15°C (VCL: $\sim 33 \mu\text{m/s}$; e VSL: $\sim 20\% \mu\text{m/s}$), 25°C (VCL: $\sim 42 \mu\text{m/s}$; e VSL: $\sim 28 \mu\text{m/s}$), 35°C (VCL: $\sim 48 \mu\text{m/s}$; e VSL: $\sim 52 \mu\text{m/s}$) e 45°C (VCL: $\sim 68 \mu\text{m/s}$; e VSL: $\sim 63 \mu\text{m/s}$) com avaliação após 30 segundos da ativação. O tempo de avaliação após a ativação é outro fator que os autores constataram diferença significativa bastante acentuado para as variáveis VCL, VSL, motilidade espermática e LIN. Esta última variável ficou dentro da faixa observada por Gennotte et al., (2012) (LIN: 55%) e por Dzyuba et al., (2019) (58 a 70%, dependendo da temperatura de ativação). Dessa forma, estas alterações entre os trabalhos podem se justificar por estavas condições de análise (temperatura e tempo de avaliação após ativação). Portanto, estas variáveis observadas no presente trabalho podem ser consideradas adequadas nos três grupos nas três coletas.

O programa computacional CASA apresenta muitas variáveis, no entanto, algumas são mais comumente exploradas nos artigos do que outras. Neste último caso, as variáveis ALH, STR e WOB tem sido pouco documentado na avaliação reprodutiva de machos. Neste sentido, as variáveis apresentadas podem ser utilizadas como valor referencial para os grupos genéticos avaliados em coletas sucessivas. Além disso, associação futura destas variáveis com a taxa de fertilização poderá evidenciar uma importância maior ou não para manutenção destes em outros trabalhos com os referidos grupos genéticos. Independente disso, estas não se alteram com o grupo genético avaliado e nem nas coletas sucessivas, indicando que não há efeito da endogamia, cruzamento e intensidade de utilização dos machos em coletas sucessivas a cada 30 dias.

Por fim, a variável do BCF é determinada pela frequência com que a linha da cabeça atravessa a trajetória celular, sendo que no presente trabalho esta variável foi prejudicada pelo grau de endogamia na primeira coleta, pois os valores foram menores neste grupo em relação a AquaAmérica não endogâmica. Isso reflete um efeito negativo da endogamia nos machos

da variedade AquaAmérica. Embora não tenha sido observado trabalhos que avaliaram o efeito da endogamia em variedades de tilápia-do-Nilo melhoradas geneticamente para a característica BCF, Silva et al., (2020) observaram efeito negativo na reprodução (natural) da variedade AquaAmérica endogâmica, evidenciando a necessidade do controle destas características no processo de seleção para ganho de peso. Cabe salientar que futuros trabalhos avaliando a importância da característica BCF na taxa de fertilização são necessários para determinar se esta característica é importante ser monitorada no processo de seleção. Interessante observar que nas demais coletas (coleta 2 e coleta 3) esta alteração não foi observada e, portanto, isso pode ter ocorrido por efeito da temperatura. Isso é evidenciado por Dzyuba et al., (2019) para algumas características seminais, mas os autores não documentaram este efeito para BCF.

A característica seminal BCF também foi afetada pelas coletas na variedade AquaAmérica endogâmica e não endogâmica, mas com redução na segunda coleta e aumento na terceira coleta para o primeiro grupo genético e redução na segunda e terceira coleta para o segundo grupo genético. Neste sentido, a variedade AquaAmérica endogâmica foi menos prejudicada com a intensidade de utilização dos machos em relação a esta variedade não endogâmica. No entanto, os valores médios observados nas duas primeiras coletas foram maiores na ausência de endogamia. Uma hipótese é que a temperatura da água de ativação pode ter exercido um efeito maior na variedade não endogâmica na última coleta.

A integridade da membrana e o alto potencial mitocondrial estão diretamente relacionados a qualidade espermática e a sua capacidade de fertilização, tendo em vista que lesões na membrana afetam a capacidade de fertilização. Os grupos genéticos não diferiram para nenhuma das variáveis estudadas de membrana/atividade mitocondrial (PI+ MTS+: membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial; PI+ MTS-: membrana plasmática lesada com baixo potencial mitocondrial; PI- MTS-: membrana plasmática íntegra com baixo potencial mitocondrial; e PI-MTS+: Membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial), indicando não haver efeito da endogamia, nestas variáveis independentemente da coleta, na variedade AquaAmérica e nem do cruzamento desta variedade com a GIFT para estas características.

As alterações na integridade da membrana plasmática estão associadas com a redução da capacidade fecundante (Thomas et al., 2006). A maior porcentagem da característica PI+

MTS+ (membrana plasmática lesada com alto potencial mitocondrial) no grupo AquaAmérica endogâmico na primeira e terceira coletas revelam um efeito negativo da endogamia para lesão da membrana, mas com efeito positivo na atividade da mitocôndria (alta atividade). O inverso ocorreu com a segunda coleta para esta variedade AquaAmérica endogâmica. Estas características estão relacionadas a temperatura de resfriamento do sêmen (Moraes et al., 2015; Souza et al., 2016) e, portanto, é possível que estas variáveis tenham sido afetadas pela temperatura da água de ativação nas coletas (não houve ajuste desta temperatura nas coletas). Dessa forma, não é possível afirmar que a intensidade de utilização tenha efetivamente rompido mais membranas e aumentado a atividade da mitocôndria na segunda coleta.

A membrana plasmática precisa estar íntegra para que assim a célula espermática seja considerada com capacidade de fertilizar (Parks e Graham, 1992; Kumi-Diaka, 1993). Neste sentido, as variedades AquaAmérica não endogâmica e o cruzamento desta com a variedade GIFT apresentaram porcentagem bastante superior da característica PI-MTS+ (membrana plasmática íntegra com alto potencial mitocondrial) na segunda coleta comparativamente a primeira e terceira coletas, resultado que expressa uma melhor capacidade de fertilização na segunda coleta comparativamente a primeira e terceira coletas. Uma hipótese seria a efeito da temperatura da água no momento da ativação, como evidenciado por Dzyuba et al., (2019) para algumas variáveis do programa CASA em tilápia-do-Nilo (os autores não avaliaram as variáveis de membrana). No entanto, não é possível descartar que a intensidade de exploração possa ter interferido na terceira coleta para esta característica. Interessante observar que este efeito na característica PI-MTS+ não foi observado para a variedade AquaAmérica endogâmica e, portanto, os diferentes grupos genéticos teriam efeitos distintos para esta característica nas temperaturas da água utilizada para fertilização durante as coletas, caso esta hipótese seja corroborada em futuros trabalhos.

8. Conclusão

A variedade AquaAmérica não endogâmica apresenta maiores valores para a variável BCF na primeira coleta, a variável que apresenta comportamento distinto entre o grau de

endogamia da variedade AquaAmérica ao logo das coletas, inclusive com grande contraste entre a integridade da membrana e atividade mitocondrial entre as coletas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Referências

- Billard, R., Cosson, J., & Crim, L.W.1993., Motility of fresh and aged halibut sperm. Aquatic Living Resources 6, 67–75.
- Billard, R., Cosson, J., CRIM, L.W., Suquet, M. Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.) Broodstock management and egg and larval quality. Lonon: Blackwell Science, 1995. p.25-52. Billard, R., Cosson, M.P. Some problem.
- Bombardelli, R.A., Hayashi, C., Natali, M.R.M., Sanches, E.A., Piana, P.A., 2009.Reproductive performance and zootechnique and lipid deposition in hepatocytes from female Nile tilapia fed with rations with various energy levels. R. Bras. Zootec. 38, 1391-1399.
- Bromage, N.R., Roberts, R.J., 1995. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Oxford: Blackwell Science.
- Camargo, L.S., Freitas-Dell’aqua, C.P., Schmit, R., Guasti, P.N., Volpato, M.A.S., Souza, F.F., 2016. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa by flow cytometer. Poster abstracts. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Campos do Jordão, SP, Brazil.

- Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M., 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 30, 721-731.
- Cosson, J., Linhart, O., Mims, S., Shelton, W., Rodina, M., 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J. Fish Biol.* 56, 1348 – 1367.
- Dzyubaa, B., Legendreb, M., Baroillerb, J.F., Cossona J., 2019. ,Sperm motility of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of temperature on the swimming characteristics. *Animal Reproduction Science* 202, 65–72.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H., 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49, 871-879.
- Fortes-Silva, R., Torres, R.A., Ribeiro-Filho, O.P., Schiavettivi-Pereira, M.M., Bastos, R.T., Yamaki, M., Sarmiento, J.L.R., 2010. Genetic evaluation of the growth of Nile tilapia at low temperatures. *Zootecnia Trop.* 28, 395-401.
- Freitas-dell'aqua, C.P., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Maziero, R.R.D., Dell'aqua Jr, J.A., Papa, F.O., 2012. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction* 9:941.
- Fülber, V.M., Mendez, L.D.V., Braccini, G.L., Barrero, N.M.L., Digmeyer, M., Ribeiro, R.P., 2009. Comparative improvement of three strains of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in different stock densities. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 31, 177-182.

- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W.M.C., Evans, G., 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* 103, 201-214.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60, 743-758.
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes, *Advances in Marine Biology*, 26, 71–113.
- Kubitza, F., 2011. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: Acqua Supre, 316p.
- Kumi-Diaka, J., 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic teste. *Theriogenology* 39, 1279-1289.
- Mataveli, M., Moraes, G.V., Streir junior, D.P., Vargas, L.D.M., Sakaguti, E.S., Toninato, J.C., Barbosa, R.C., Merlini, L., 2007. Evaluation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) semen quality, chitralada strain, supplemented with different concentrations of vitamin C. *B. Inst. Pesca* 33,1-7.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Seerig, A., Carvalho, D.C., 2008. Practical applications of microsatellite markers in the genetic characterization and identification of tilapia schools. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 32, 220-224.
- Nakaghi, L.S.O., Moya, C.F., Dias-Koberstein, T.C.R., Zaiden, S.F., Paes, M.C.F., Makino, L.C., 2009. Performance of *Oreochromis niloticus* feed testing different ration granule

sizes according to the development of the mouth. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., 7, 415-421.

Nguyen, N.H., 2016. Genetic improvement for important farmed aquaculture species with a reference to carp, tilapia and prawns in Asia: achievements, lessons and challenges. Fish Fish., 17, 483-506.

Parks, J.E., Grahan, J.K., 1992. Effects os cryopreservation procedures on Sperm membranes. Theriogenology 38, 209-222.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, I.L., Winer, M.A, First, N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 38, 1171-80.

Pires, L.B., Sanches, E.A., Romagosa, E., Corrêa Filho, R.A.C., Nass, R.A.R., Lopera-Barrero, N.M., Povh, J.A., 2018. Sperm quality of *Colossoma macropomum* after roomtemperature and cold storage. Journal of Applied Ichthyology.

Ponzoni, R.W., Hamzah, A., Tan, S., Kamaruzzaman, N., 2005. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 247, 203–210.

Poupard, G. P., Paxion, C., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. Aquaculture 160, 317–328.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1-28.

SAS-Statistical Analysis System. System for Microsoft Windows, release 9.1. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2002-2003.

Silva, A.C.F., Corrêa Filho, R.A.C., Ventura, A.S., Nunes, A.L., Laice, L.M., Ribeiro, R.P., Oliveira, C.A.L., Almeida, L.C., Barbosa, P.T.L., Povh, J.A., 2020. Reproductive traits in different Nile tilapia genetic groups. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72,5, 1797-1804.

Tsadik, G.G., Bart, A.N., 2007. Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 272, 380-388.

Thomas, A.D., Meyers, S.A., Ball, B.A., 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1531-1550.

Turra, E.M., Oliveira, D.A.A., Teixeira, E.A., Luz, R.K., Prado, A.S., Melo, D.C., Faria, P.M.C., Sousa, A.B., 2010. Reproductive control in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) by chromosomal and sexual manipulations. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 34, 21-28.

Viveiros, A.T.M., Godinho, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology Biochemistry* 35, 137-150.

Zar, J.H., 2010. *Bioestatistical Analysis*. Pearson Prentice Hall. Nova Jersey.