

VOLUME IDEAL DE OVOS DE CURIMBATÁ (*Prochilodus lineatus*) PARA INCUBADORA EXPERIMENTAL

Bruno Estevão de Souza, Eduardo Antônio Sanches, Diego Mendes Baggio,
Robie Allan Bombardelli, Elizabeth Romagosa. E-mail:
bruno_bes@yahoo.com.br

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharia e Ciências
Exatas – Toledo – PR.

Palavras-chave: reprodução, fertilização, incubação, peixes

Resumo:

O presente trabalho objetivou determinar volume ideal de ovos de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) para incubadora experimental. Foram utilizadas cinco fêmeas e cinco machos, ambos receberam duas doses de extrato de hipófise de carpa (dose inicial de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ e final de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$). Do sêmen dos machos foi realizado um “pool” do qual foi analisado a concentração e o índice de sobrevivência espermática, bem como a duração da motilidade espermática. Após a extrusão das fêmeas seus ovócitos foram coletados separadamente e colhidas três amostras de 0,1mL de ovócitos não hidratados os quais foram contados para se estimar o número total de ovócitos utilizados em cada unidade experimental. Após determinar o número relativo de ovócitos e a concentração espermática do “pool” de sêmen, foram colhidas separadamente 4 amostras de 0,5, 2,0, 3,5, 5,0 e 6,5mL de ovócitos não hidratados e sobre estes adicionadas a dose inseminante de 200 μ L de sêmen e 75 mL de solução ativadora para realização dos ensaios de fertilização. Os ovócitos fertilizados foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Foi considerada como uma unidade experimental uma incubadora de volume útil de 2,5L, contendo os respectivos volumes de ovócitos fertilizados. Os tratamentos foram constituídos por 5 diferentes volumes de ovócitos 0,5, 2,0, 3,5, 5,0 e 6,5mL. Após a fertilização, a água das incubadoras foi mantida aquecida em $27,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. As taxas de fertilização foram mensuradas 8 horas após o início da hidratação dos ovos, e as taxas de eclosão foram mensuradas 24 horas após a fertilização. Os melhores resultados tanto para taxa de fertilização quanto para taxa de eclosão foram encontrados no tratamento com 2mL de ovos para cada incubadora de 2,5 litros de volume útil.

Introdução

Desde a década de 80 o curimbatá tem sido adotado como um peixe modelo para diversas pesquisas no país devido a sua grande rusticidade ao

manejo, por reproduzir-se com certa facilidade através da técnica de reprodução artificial, a fácil obtenção de matrizes e ter ampla distribuição.

Muitas pesquisas científicas sobre a reprodução de peixes têm se utilizado de incubadoras experimentais de pequeno volume para obter os resultados de fertilização (Hilbig et al., 2008, Shimoda et al., 2007, Bombardelli et al, 2006; Cruz-Casallas et al, 2005).

A mensuração da taxa de fertilização é a análise de qualidade dos gametas mais determinante para o conhecimento de sua potencialidade (Kavamoto et al., 1987). Como a taxa de fertilização esta fortemente correlacionada com diversos problemas relacionados a qualidade dos gametas pode-se considerar apenas a taxa de fertilização como indicador da performance subsequente de embriões e larvas (Springate et al, 1984).

Porem nenhum estudo tem sido realizado com o intuito de obter informações que possam otimizar o uso destas estruturas. Neste sentido o presente estudo objetivou avaliar o volume ideal de ovos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) para incubadora experimental.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis - UNIOESTE, instalado no Centro de Pesquisas em Aquicultura Ambiental - CPAA/IAP - Toledo, PR.

Os reprodutores provenientes do rio Paraná estavam estocados em um tanque escavado, revestido com concreto, fundo de terra e dimensão de 200m², com renovação de água somente para compensar a água evaporada e infiltrada. Os peixes foram alimentados com ração comercial processada na forma extrusada com 32% de proteína bruta.

Após a captura dos reprodutores com o auxílio de uma rede de arrasto a seleção dos peixes foi realizada dentro do próprio tanque. Foram selecionadas cinco fêmeas que apresentavam abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada (Andrade-Talmelli et al, 2002) e coloração e tamanho dos ovócitos uniformes e cinco machos que liberavam esperma sob leve pressão da papila urogenital segundo Zaniboni e Weingartner (2007). Os animais selecionados foram levados ao laboratório de reprodução.

No laboratório os reprodutores foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo em dois tanques, dotados de aeração e constante renovação de água. Após este procedimento aplicou-se uma dose de 0,5mg de extrato de hipófise de carpa (EHC).kg de reprodutor-1 para os machos e fêmeas, respectivamente. Doze horas após a primeira aplicação, foi aplicada uma segunda dose de 5mg EHC.kg de reprodutor-1 para machos e fêmeas, respectivamente (intraperitoneal, abaixo da nadadeira peitoral). Após as aplicações, a temperatura foi mantida em 27,0±1,0°C e monitorada freqüentemente.

A coleta dos gametas masculinos foi realizada após um período de 160 horas-grau ou unidades térmicas acumuladas (UTA). Os reprodutores foram contidos e secos com pano e papel toalha. Em seguida, foi aplicada individualmente massagem na região ventral do animal sempre no sentido

encéfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação e o restante foi coletado a partir de um tubo Falcon, com graduação de 0,1mL, para mensuração do volume de sêmen liberado.

Então, logo após a coleta foi realizada a mistura do sêmen proveniente de todos os reprodutores, dando origem a um “pool” de sêmen.

Em seguida, deste “pool” de sêmen, foi mensurado a concentração espermática do sêmen, de onde foi retirada uma amostra de 5 μ L de sêmen e diluída em 5mL de formol salina tamponado, resultando na diluição de 1:1000. Após a diluição, uma câmara hematimétrica de Neubauer foi preenchida por capilaridade, e, em seguida, contaram-se os espermatozóides segundo Mataveli et al. (2007).

Também foi aferida a duração da motilidade espermática do “pool”, misturando se 5 μ L de sêmen a 200 μ L de água. Concomitantemente a mistura era iniciada a contagem do tempo através de um cronômetro e retirada uma amostra de 5 μ L para ser observando sob microscópio óptico com objetiva de 40X. A estimativa da porcentagem de células móveis seguiu a escala arbitrária de 0 a 100%, quando 50% das células perdiam a motilidade era parado o cronômetro e aferido o tempo de motilidade.

A avaliação do índice de sobrevivência espermática foi realizada, a partir método de coloração eosina-nigrosina (Murgas et al., 2003), utilizando-se de 30 μ L de sêmen e 90 μ L de cada corante, para a realização da mistura e, posteriormente, confecção do esfregaço. Após o processamento das lâminas, o material foi analisado em microscópio de luz em objetiva de 40x, sendo contados 400 espermatozóides, e células mortas apresentaram-se rosadas, pela absorção dos corantes, e os vivos não-corados, por serem impermeáveis aos corantes.

Após 160 UTA, as fêmeas foram extrusadas de forma idêntica aos machos e seus ovócitos coletados separadamente em placas de petri, onde das oito fêmeas extrusadas foi selecionado o material fecundante de apenas uma delas segundo Kjorsvik e Lonning (1983) observando-se os parâmetros de uniformidade do tamanho dos ovócitos, uniformidade da coloração dos ovócitos, e ausência de ovócitos brancos (gorados) bem como a ausência de fluidos ovarianos, sangue, urina e fezes. Logo após foram colhidas três amostras de 0,1mL de ovócitos não hidratados dos ovócitos selecionados que foram contados para se estimar o número total de ovócitos utilizados em cada unidade experimental.

Após determinar o número relativo de ovócitos e a concentração espermática do “pool” de sêmen, foram colhidas separadamente 4 amostras de 0,5, 2,0, 3,5, 5,0 e 6,5mL de ovócitos não hidratados e sobre estes adicionadas a dose inseminante de 200 μ L de sêmen e 75 mL de solução ativadora (água da incubadora) para realização dos ensaios de fertilização.

Os ovócitos fertilizados foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Foi considerada como uma unidade experimental uma incubadora de volume útil de 2,5L, contendo os respectivos volumes de ovócitos fertilizados. Os tratamentos

foram constituídos por 5 diferentes volumes de ovócitos 0,5, 2,0, 3,5, 5,0 e 6,5mL.

As fertilizações foram realizadas seqüencialmente em copos plásticos descartáveis de 250ml onde eram colocadas as amostradas de ovócitos e sêmen (200µL) até receberem 75ml da solução ativadora (água da incubadora). Após a adição da água os copos eram movimentados em sentido circular por 1 minuto para a melhor mistura do sêmen, ovócitos e água e colocados na incubadora.

Assim, foram utilizadas 70mL de ovócitos não hidratados, os quais foram misturados ao sêmen, fertilizados e distribuídos em 20 incubadoras experimentais confeccionadas em PVC, com formato cônico e de volume útil de 2,5L.

Após a fertilização, a água das incubadoras foi mantida aquecida em $27,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ a partir de resistência elétrica e termostato. As taxas de fertilização foram mensuradas 8 horas após o início da hidratação dos ovos, em microscópio estereoscópio (10X), utilizando-se aproximadamente 380 ovos de cada unidade experimental, amostra superior ao mínimo (260 ovos) recomendado por Zaniboni Filho (1992). As taxas de eclosão foram mensuradas 24 horas após a fertilização.

Resultados e Discussão

Os machos de curimatá apresentaram valores médios de peso corporal, comprimento padrão e produção espermática média de 1020,00 ± 375,17g, 35,20 ± 5,11cm e 2,12 ± 1,31mL respectivamente.

Tabela 1 – Parâmetros qualitativos do “pool” de sêmen.

Variável	Valores médios	DP*
Concentração espermática (SPZ.mL ⁻¹)	2,28x10 ¹⁰	1,81x10 ⁹
Motilidade espermática (s)	25,60	0,38
Sobrevivência espermática (%)	95,92	0,97

Desvio padrão

Os valores médios de peso corporal e comprimento padrão ficaram acima dos valores descritos por Kavamoto et al. (1996a) que trabalhou com 180 exemplares machos de curimatá de 3 anos de idade com valores médios de peso corporal e comprimento total de 465,61g e 34,11cm respectivamente.

A produção espermática média ficou acima dos valores encontrado por Streit Jr. et al., (2004) 0,45mL, Kavamoto et al. (1997) 0,22 ± 0,05mL e Kavamoto et al. (1996) 1,12 ± 0,52mL que trabalharam com a mesma espécie. Diferenças na produção espermática são rotineiramente encontradas uma vez que os volumes acima descritos não podem ser considerados como volume total de sêmen liberado pelo macho, uma vez que o método da extrusão não garante a liberação total do sêmen presente (Ferreira et al., 2001).

A concentração espermática do “pool” ficou acima dos valores encontrado por Streit Jr. et al., (2004) 1,40x10¹⁰ SPZ.mL⁻¹, Kavamoto et al.

(1989) $1,95 \times 10^{10}$ SPZ.mL⁻¹ e Kavamoto et al. (1986a) $3,06 \times 10^{10}$ SPZ.mL⁻¹ e inferior ao valor encontrado por Kavamoto et al. (1997) $3,29 \times 10^{10}$ SPZ.mL⁻¹.

São muitos os fatores que influenciam a concentração espermática, dentre eles, a aplicação ou não de hormônios indutores (Kavamoto et al., 1989), tipo de hormônio aplicado (Streit Jr. et al., 2004), número de doses hormonais (Kavamoto et al., 1996), intervalo de tempo entre as aplicações de hormônio (Castagnolli & Cyrino, 1980), período de coleta dos gametas (Kavamoto et al., 1997), idade dos reprodutores (Kavamoto et al., 1996a) entre outros.

A duração da motilidade espermática diferiu dos outros autores como Murgas et al. (2007) e (Streit Jr. et al., 2004) uma vez que foi utilizado um protocolo diferentes dos demais autores para aferir este parâmetro. O valor encontrado para a sobrevivência espermática foi superior aos valores encontrados por Kavamoto et al., (1996) $93,84 \pm 1,86$ % e Kavamoto et al. (1996a) $93,73 \pm 1,95$ %.

A fêmea de curimatá selecionada apresentou valores de peso corporal, comprimento padrão e número total de ovócitos de 900g, 33,5cm e 113741 ovos respectivamente.

A fêmea apresentou valor de peso corporal e comprimento padrão inferior aos descritos por Antoniutti et al, (1995) que trabalhou com exemplares de curimatá de 2 anos de idade com valores médios de peso corporal e comprimento padrão de 957,78g e 40,97cm respectivamente.

Os resultados da taxa de fertilização estão expressos na figura 1.

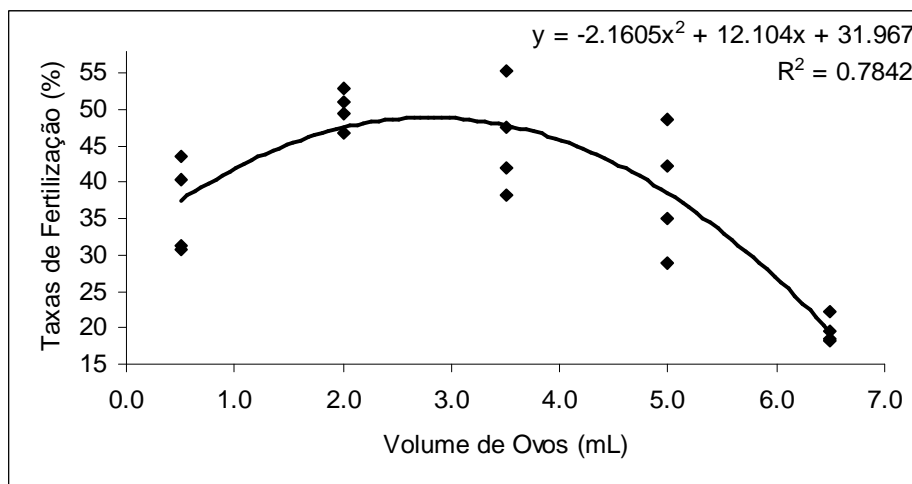


Figura 1: Taxas de fertilização dos ovos de curimatá testando diferentes densidades de ovos na incubadora.

Os resultados da taxa de eclosão estão expressos nas figuras 2.

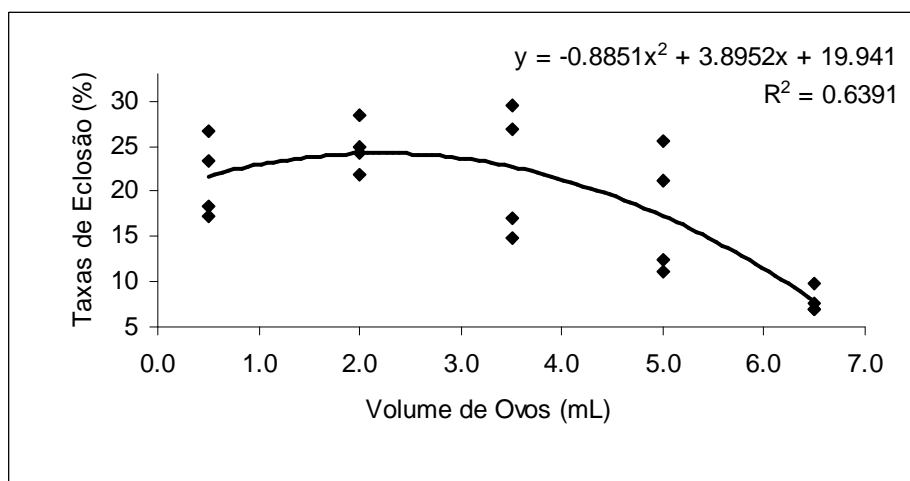


Figura 2: Taxas de eclosão de ovos de curimatá testando diferentes densidades de ovos na incubadora.

Os melhores resultados tanto para taxa de fertilização quanto para taxa de eclosão foram encontrados no tratamento com 2mL de ovos para cada incubadora de 2,5 litros de volume útil. Segundo Zaniboni e Weingartner, (2007) a quantificação da desova bem como a sua separação nas corretas porções a serem estocadas em incubadoras distintas aumentam significativamente a taxa de fertilização.

Segundo Godinho, (2007) a proporção correta dos ovos a serem acondicionados na incubadora artificial tem relação direta com o diâmetro do ovo após a hidratação sendo assim quantidades inferiores ou superiores de ovócitos podem acarretar em quedas taxa de fertilização uma vez que poucos ovos na incubadora podem acometer um fluxo excessivo de água sobre os mesmos causando um efeito deletérios devido a ação mecânica da água sobre os ovos da mesma forma que o excesso de ovos pode acarretar na baixa circulação dos mesmos dentro da incubadora podendo levar a falta de oxigenação dos ovos devido a deposição dos mesmos uns sob os outros.

Conclusões

Incubadoras experimentais de pequeno volume podem ser usadas para testes de fertilização apresentando taxas de fertilização superiores a 50%.

Os melhores resultados tanto para taxa de fertilização quanto para taxa de eclosão para incubadoras experimentais com 2,5L de volume útil foram encontrados no tratamento com 2mL de ovos de curimatá (*Prochilodus lineatus*).

Referências

Andrade-Talmelli, E. F.; Kavamoto, E. T.; Narahana, M. Y.; Fenerich-Verani, N. (Reprodução Induzida da Piabanha, *Brycon insignis*

- (Steindachner, 1876), mantida em Cativoiro). *R. Bras. Zootec.*, 2002.31, 2, p.803-811.
- Antoniutti, D. M.; Narahana, M. Y.; Romagosa, E. (Reprodução induzida e custo operacional de produção de alevinos de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881)). *Boletim do Instituto de Pesca*, 1995, 22, 1, 41-47.
- Bombardelli, R.A.; Mörschbacher, E.F.; Campagnolo, R. et al. (Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824)). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2006, 35, 4, 1251-1257.
- Castagnolli, N. e Cyrino, J. E. P. (Desova induzida do Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae)). *Ciência e Cultura*, 1980, . 32 9, 1245-1253.
- Cruz-Casallassa P. E.; Pardo-Carrasco, S. C.; Arias-Cstellanos, J. A.; et al., (Cryopreservation of Yamu *Brycon siebenthalae* Milt) *Journal Of The World Aquaculture Society*, 2004, 35,4, 529-535.
- Kavamoto, E. T.; Mainardes-Pinto, C. S. R.; Andrade-Talmelli, E. F.; Campos, B. E. S. (Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881.) *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, p. 73-78, 1997.
- Hilbig, C. C.; Bombardelli, R. A.; Sanches, E. A.; Oliveira, J. D. S.; Baggio, D. M.; Souza, B. E.(Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*)) *Acta Sci. Anim. Sci.*, 2008, 30, 2, 217-224.
- Godinho, H. P.(Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção) *Rev Bras Reprod*, 2007, 31, 3, 351-360.
- Kjorsvik E. & Lonning S. (Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L.) *The Fisheries Society of the British Isles*, v. 23, p. 1-12, 1983.
- Kavamoto, E. T. e Fogli Da Silveira, W. (Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *rhamdia hilarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo.) *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.
- Kavamoto, E. T.; Fogli Da Silveira, W.; Godinho, H. M. (Características seminais do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 45-50, 1986a.
- Kavamoto, E. T.; Fogli Da Silveira, W.; Godinho, H. M.; Romagosa, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 16, n.1, p. 29-36, 1989.
- Kavamoto, E. T.; Narahana, M. Y.; Mainardes-Pinto, C. S. R.; ANDRADE-Talmelli, E. F.; Romagosa, E.; Ferraz, E. M.; Efeito do HCG na produção de sêmen do curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Revista Ceres*, v. 43, n. 245, p. 76-85, 1996.
- Kavamoto, E. T.; Ferraz, E. M.; Andrade-Talmelli, E. F.; Mainardes-Pinto, C. S. R.; Romagosa, E.; Narahana, M. Y.; Barnabe, V. H.; Campos, B. E.

S. Estimulação da espermiacão em curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) através de aplicações de HCG (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Viçosa, v. 13, n. 1, p. 27-38, 1996a.

Kavamoto, E. T.; Mainardes-Pinto, C. S. R.; Andrade-Talmelli, E. F.; CAMPOS, B. E. S. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, p. 73-78, 1997.

Mataveli, M.; Moraes, G. V.; Streit Jr, D. P.; Vargas Mendez, L. D.; Sakaguti, E. S.; Toninatp, J. C.; Barbosa, R. C.; Merlini, L. Avaliação da qualidade do sêmen de Tilapia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 33(1): 1 - 7, 2007.

Murgas, L.D.S. et al. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003. Supl. 2.

Murgas, L. D. S.; Miliorini, A. B.; Freitas, R. T. F.; Pereira, G. J. M. P. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

Shimoda, E.; Andrade, D. R.; Vidal Júnior, M. V.; Godinho, H. P.; Yasui, G. S. (Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae)). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007, 59, 4, 877-882.

Springate J. R. C.; Bromage N. R.; Elliot J. A. K.; Hudson D. L. 9The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)). *Aquaculture*, 1984. 43, 313–322.

Streit JR., D.P.; Moraes, G.V.; Ribeiro, R.P. et al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa, *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, 41, 147-153.

Zaniboni Filho, E. Incubação, larvicultura e alevinagem do Tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1992. 202p. Tese (Doutorado em Ecologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 1992.

Zaniboni Filho, E.; Weingartner, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2007, 31, .3, p.367-373.