



LAURA HELENA ORFÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES E
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
PIRAPITINGA-DO-SUL *Brycon opalinus***

LAVRAS-MG

2010

LAURA HELENA ORFÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DE PIRAPITINGA-DO-SUL *Brycon opalinus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Orfão, Laura Helena.

Diversidade genética de populações e criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* / Laura Helena Orfão. – Lavras : UFLA, 2010.

131 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Banco genético. 2. Conservação de espécies. 3. Variabilidade genética. 4. DNA mitocondrial. 5. Peixe. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.97752

LAURA HELENA ORFÃO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DE PIRAPITINGA-DO-SUL *Brycon opalinus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de Agosto de 2010.

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	DZO/UFLA
Dr. João Bosco Barreto Filho	DMV/UFLA
Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf	NIB/UMC
Dr. Marcelo de Castro Leal	Utrecht University



Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
Orientadora

LAVRAS – MG

2010

A todos que, como eu, acreditam que desafios e perdas são para ser superados, dedico este trabalho!

Em especial, dedico:

*A Deus, a força maior que nos guia pra frente!
Aos meus queridos pais, Bosco e Cecília, cujo amor, carinho e apoio, me deram força para seguir em frente e tornar este trabalho possível!
Aos meus queridos irmãos, José Rodolfo e Guilherme e em especial ao Lucas (in memoriam) que me forçou a entender o que significa superação!
Ao meu noivo e grande amor, Jullian, que está sempre ao meu lado, me ajudando a superar os obstáculos de cada dia.
Aos meus avós, José, Laura, Darci (in memoriam) e Maria, pelo amor e incentivo!
Aos meus amigos e familiares que sempre acreditaram em mim!*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora e amiga Ana, responsável pela minha satisfação profissional, pela oportunidade e confiança, acreditando no meu potencial e me auxiliando sempre nessa caminhada.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

Aos professores Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas e Dr. João Bosco Barreto Filho, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Ao colega Dr. Marcelo de Castro Leal, que sempre contribui para a confecção e correções dos meus artigos.

Ao professor Dr. Alexandre Hilsdorf, que mesmo sabendo que eu nunca havia entrando em um laboratório de biologia molecular, permitiu que eu executasse meus experimentos em seu laboratório. A todos os amigos do Laboratório de Genética de Peixes e Aquicultura do Núcleo Integrado de Biotecnologia (UMC).

A amiga Ariane F. Nascimento, que me ajudou durante todo o planejamento e execução dos experimentos, sem me deixar enlouquecer e ao amigo Alexandre N. Maria, pelo auxílio em todas as horas e pela valiosa colaboração. A amiga Ziara A. Isaú, pela coragem de dividir comigo as viagens para Belo Horizonte e pelo companheirismo durante todo o curso. Aos amigos do grupo de pesquisa: Antonio, Rafael, Isabel, Thatijanne e Mariana, por toda ajuda prestada.

À Companhia Energética de São Paulo (CESP), pela disponibilização dos reprodutores e instalações da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura. À equipe da Estação, em especial à pessoa de Danilo Caneppele, por disponibilizar seu tempo, me apresentar a tantos pesquisadores importantes e por ter se tornado um grande amigo.

À Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), pelo apoio financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e pelo portal Periódicos CAPES.

A amiga Fabíola, por dividir comigo as alegrias, as tristezas, as dúvidas, as inseguranças e as contas durante todo o curso, além de aguentar tantos choros e conversas.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A espécie de peixe pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* é endêmica dos rios Paraíba do Sul e Doce. Em consequência de fatores que interferem no seu comportamento, como destruição das matas ciliares, assoreamento, poluição e barramento dos rios, o número de indivíduos dessa espécie tem declinado. Em conjunto, as técnicas que aperfeiçoam a reprodução artificial, como a preservação de sêmen e as técnicas moleculares são medidas que devem ser consideradas quando se pretende conservar uma espécie de peixe. Neste estudo (artigo 1), foram coletadas amostras de nadadeira de peixes oriundo de quatro tributários do rio Paraíba do Sul: rio Itagaçaba, rio Preto, ribeirão Santíssimo e rio Paraibuna. O sequenciamento da região do *D-loop* do DNA mitocondrial dessas amostras foi utilizado para descrever a variabilidade genética intra e inter populacional de amostras de pirapitinga-do-sul provenientes desses tributários. O valor de F_{st} (0,2179) foi significativo e mostrou a existência de diferenciação genética entre as populações de pirapitinga-do-sul dos quatro tributários. Assim, um programa de repovoamento dessa espécie deve levar em consideração essa estrutura genética, além da manutenção dos tributários onde essa espécie ainda se encontra presente. Para a preservação do sêmen, (artigo 2) foi avaliado o efeito da composição de diluidores, osmolalidade e crioprotetores na motilidade espermática antes do congelamento. Quando a osmolalidade do diluidor foi baixa (245 ou 285 mOsm/kg), a motilidade foi induzida precocemente. Em altas osmolalidades (325 ou 365 mOsm/kg), a indução da motilidade foi totalmente suprimida. Os resultados mostraram que uma solução de NaCl ou de glicose com a osmolaridade de 325 ou 365 mOsm/kg, combinados aos crioprotetores dimetil sulfóxido ou metilglicol é capaz de manter qualidade do sêmen antes do congelamento e, após ativação, e produz motilidade espermática acima de 77% com duração suficiente para fertilizar ovócitos. A partir desses resultados, métodos para a criopreservação do sêmen de pirapitinga-do-sul foram testados (artigo 3). Os resultados mostraram que o sêmen criopreservado em meio contendo glicose 365 mOsm/kg e metilglicol, após um tempo de equilíbrio de 30 min, em palhetas de 0,5 ou 4,0 mL e descongelado em banho maria a 60 °C produziu 73-81% de motilidade espermática com 47 segundos de duração, 68-70% de espermatozóides vivos e 33-43% de eclosão. O método de criopreservação desenvolvido neste estudo foi eficiente. A formação de um banco de sêmen com fins de repovoamento é possível e para isso deve-se considerar a caracterização genética das populações de pirapitinga-do-sul.

Palavras-chaves: Banco genético. Conservação de espécies. DNA mitocondrial. Peixe. Variabilidade genética.

ABSTRACT

The species of fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* is endemic to the rivers Doce and Paraíba do Sul. As a result of factors that interfere on behavior, such as destruction of riparian forests, pollution of rivers and dam construction, the number of individuals is declining. Molecular techniques in conjunction with protocols that optimize the artificial reproduction as sperm preservation are actions that should be considered when attempting to restore a species of fish from extinction. In this study (article 1), samples were collected from fish of four tributaries of Paraíba do sul basin: Itagaçaba river, Preto river, Santíssimo river and Paraibuna river. The sequence analysis of *D-loop* region of mitochondrial DNA of these samples was used to describe the genetic variability inner and interpopulations of pirapitinga-do-sul of these tributaries. The value F_{st} (0.21798) was significant and suggests the existence of genetic differentiation among populations of pirapitinga-do-sul. Thus, a program of reintroduction of this species should take into consideration the genetic structure, as well as maintenance of the tributaries where this species is still present. For sperm preservation (article 2), the effects of extender composition, osmolality and cryoprotectant agent on sperm motility before freezing were investigated. When extender osmolality was low (245 or 285 mOsm/kg), sperm motility was induced prematurely. At higher osmolalities (325 and 365 mOsm/kg), the initiation of sperm motility was completely suppressed. Sperm diluted in glucose or NaCl at 325 or 365 mOsm/kg combined with either DMSO or MG maintain sperm quality before freezing and yields motility upon activation above 77% and that will last long enough to fertilize oocytes. Based in these results, freezing methods for pirapitinga-do-sul sperm were tested (article 3). The results showed that sperm cryopreserved in medium composed of glucose at 365 mOsm/kg and methyl glycol, after 30-min equilibration time, in 0.5- or 4.0-mL straws and thawed at 60 °C water bath yielded 73-81% motility rate with 47 seconds of duration, 68-70% live spermatozoa and 33-43% hatching. The method developed in this study for cryopreservation sperm was efficient. Sperm banking for reintroduction of fish species is possible and for that the genetic characterization of populations of pirapitinga-do-sul should be considered.

Keywords: Gene bank. Species conservation. Mitochondrial DNA. Fish. Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exemplar de <i>Brycon opalinus</i>	17
Figura 2	Região controle (<i>D-loop</i>) do DNAm.	21
Figura 3	Botijão de vapor de nitrogênio <i>dry-shipper</i>	27
Figura 4	Resumo da estrutura da tese	38

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1	Rios da bacia do Paraíba do Sul em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais e indicações dos locais de amostragem.....	55
Figura 2	Árvore de Neighbour-joining mostrando a relação dos 45 haplótipos, usando o modelo de Tamura-Nei. Os locais de coleta dos haplótipos são identificados por: - Rio Itagaçaba; - Rio Preto; - Ribeirão Santíssimo; - Rio Paraibuna.....	60

ARTIGO 2

Figure 1	Effects of extender composition (glucose on the top, NaCl on the bottom), osmolality and cryoprotectant (methylglycol, MG = closed squares, DMSO = open triangles, control without cryoprotectant = open circles) on the initiation of sperm motility (%) of <i>Brycon opalinus</i> . Each dot and error bar represents mean \pm SEM of eight males and each line represents the predicted value after nonlinear regression analysis ($R^2 = 0.5728$)	87
----------	---	----

Figure 2 Effects of extender composition (glucose at the top, NaCl at the bottom), osmolality and cryoprotectant (methylglycol, MG = closed squares, DMSO = open triangles, control without cryoprotectant = open circles) on the percentage of motile sperm upon activation of *Brycon opalinus*. Motility was triggered after 0- and 30-min equilibration times at 4°C in each media. Each dot and error bar represents mean ± SEM of eight males and each line represents the predicted value in regression analyzes ($R^2 = 0.9396$). 89

Figure 3 Effects of extender composition (glucose at the top, NaCl at the bottom), osmolality and cryoprotectant (methylglycol, MG = closed squares, DMSO = open triangles, control without cryoprotectant = open circles) on the duration of sperm motility upon activation of *Brycon opalinus*. Motility was triggered after 0- and 30-min equilibration times at 4°C in each media. Each dot and error bar represent mean ± SEM obtained with eight males and each line represents predicted value in regression analysis ($R^2 = 0.3968$). 91

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Tipos de container, métodos de congelamento e de descongelamento em banho-maria utilizados na criopreservação de sêmen de espécies de peixes do gênero <i>Brycon</i>	28
Tabela 2	Diluidores, crioprotetores permeáveis e taxa de diluição utilizados na criopreservação de sêmen de espécies de peixes do gênero <i>Brycon</i> , e que produziram os melhores resultados em cada estudo.	31
Tabela 3	Parâmetros de qualidade do sêmen avaliados após a criopreservação no método mais eficiente descrito em cada estudo para espécies do gênero <i>Brycon</i>	35

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Locais de coletas das amostras de nadadeira da espécie <i>Brycon opalinus</i> na bacia do Rio Paraíba do Sul.....	54
Tabela 2	Estatística descritiva a partir das sequências do <i>D-loop</i> da espécie <i>Brycon opalinus</i>	59
Tabela 3	Valores de <i>Fst</i> entre os quatro locais de amostragem obtidos através das sequências do <i>D-loop</i> de <i>Brycon opalinus</i>	61
Tabela 4	Análise molecular de variância (AMOVA) para <i>Brycon opalinus</i> , considerando todas as populações como um único grupo.....	62

ARTIGO 2

Table 1	Fresh sperm characteristics of <i>Brycon opalinus</i>	84
Table 2	Correlation matrix (Spearman's coefficient) of fresh sperm characteristics of <i>Brycon opalinus</i> (n = 18 males).	85

ARTIGO 3

Table 1	Statistical results for the effects of extender (composition and osmolality), cryoprotectant and equilibration time (Exp 1)....	116
Table 2	Extender (composition and osmolality), cryoprotectant (DMSO and MG) and equilibration time on post-thaw sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa (mean \pm SEM; n = 8 males) of <i>Brycon opalinus</i> (Exp 1).....	117
Table 3	Statistical results for the effects of extender composition, cryoprotectant, straw volume and thawing temperature (Exp 2)....	120
Table 4	Extender composition, cryoprotectant (CPA; DMSO and MG), straw volume and thawing temperature on post-thaw sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa (mean \pm SEM; n = 7 males) of <i>Brycon opalinus</i> (Exp 2).....	121
Table 5	Pre- freezing and post-thaw sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa (mean \pm SEM; n = 4 males) of <i>Brycon opalinus</i> sperm cryopreserved in glucose 365 mOsm/kg, methylglycol and 0.5- or 4.0-mL straws. (Exp 3).....	123
Table 6	Fertilization and hatching rate (expressed as percentage of total eggs; mean \pm SEM; n = 4 males) of <i>Brycon opalinus</i> sperm, cryopreserved in glucose 365 mOsm/kg, methylglycol and 0.5- or 4.0-mL straws (Exp 3)	124

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	A espécie em estudo	17
2.2	DNA mitocondrial	19
2.3	Criopreservações do sêmen de peixes	22
2.3.1	Criobiologia e crioinjúrias	24
2.3.2	Crioprotetores e diluidores	29
2.3.3	Avaliação do sêmen após a criopreservação	32
3	OBJETIVO E ESCOPO DA TESE	37
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	41
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	47
	ARTIGO 1 Variabilidade genética da região <i>D-loop</i> do DNA mitocondrial da espécie <i>Brycon opalinus</i> encontradas em tributários do Rio Paraíba do Sul: implicações para conservação da espécie	48
	ARTIGO 2 Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on motility of sperm in the brazilian endangered species <i>Brycon opalinus</i> (characiformes)	72
	ARTIGO 3 An effective method for sperm cryopreservation of the threatened brazilian fish <i>Brycon opalinus</i> (Cuvier, 1819)	103

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.890 espécies, incluindo as introduzidas, existindo ainda muitas desconhecidas. Recente levantamento mostrou que pelo menos 40 espécies de várias famílias e gêneros são oferecidas no mercado brasileiro de alevinos, dentre as quais quatro são híbridas (GODINHO, 2007).

A produção de alevinos é um setor fundamental para a piscicultura comercial. A oferta de uma maior quantidade de alevinos das espécies já utilizadas e do desenvolvimento de tecnologia para reproduzir novas espécies são requisitos necessários para atender a maior demanda por peixes dos últimos anos. Além disso, atualmente as empresas concessionárias de energia elétrica são obrigadas a praticar ações mitigadoras para repovoar ambientes aquáticos que foram modificados como rios e represas; entretanto, não há registros publicados acerca do número de alevinos produzidos para este fim.

Com cerca de 1.000 km, o Rio Paraíba do Sul é considerado o maior rio de várzeas do Sudeste. Seu curso começa no município de Paraibuna (SP), a partir da confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, e atravessa o Rio de Janeiro de sul a norte. A foz está situada em Atafona (RJ) e sua bacia, com área de cerca de 57 mil km², espalha-se pelos estados de São Paulo (38%), Rio de Janeiro (38%) e Minas Gerais (24%). Na década de 50, o rio Paraíba do Sul e seus afluentes foram considerados um dos mais piscosos do Estado de São Paulo. Apesar da grande diversidade de peixes, poucos eram aqueles capturados em maior volume e com valor comercial, entre eles podemos relatar principalmente: a piabanha (*Brycon insignis*), piavas (*Leporinus sp.*), surubim-do-paraíba (*Steindachneridion parahybae*), piapara (*Leporinus sp.*) e o robalo

(*Centropomus sp.*) (MACHADO; ABREU, 1952). No rio Paraíba do Sul são encontradas 12 espécies exóticas, como dourado (*Salminus brasiliensis*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), mandi-guaçu (*Pimelodus maculatus*) e 115 espécies nativas como lambari (*Astyanax sp.*), piabanha (*Brycon insignis*), curimatã (*Prochilodus sp.*), bagre (*Rhamdia parahybae*) e a pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*) (ROSA; LIMA, 2008).

Ao longo dos anos, o Rio Paraíba do Sul e seus tributários vêm sofrendo represamentos, desmatamentos da mata ciliar e poluição em razão da industrialização e atividade agrícola nas áreas ribeirinhas. Esses impactos ambientais resultam na perda da diversidade genética implicando em danos consideráveis sobre ecossistemas terrestres e aquáticos (BRUTON, 1995). A habilidade de adaptação e de resposta às frequentes mudanças ambientais ocorre devido à diversidade genética. Um dos pontos centrais para o planejamento de medidas de conservação da biodiversidade aquática é o entendimento da estrutura populacional das espécies para que se determinem tanto as respostas fisiológicas às variações ambientais como as estratégias de manejo das populações naturais (DANZMANN et al., 1991). Da mesma forma, em programas de repovoamento de peixes há a necessidade de assegurar a manutenção da diversidade genética dos estoques de reprodutores, de acordo com a estrutura genética e populacional da espécie no meio ambiente.

O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta importante para determinar como a população deve ser manejada, evidenciando se a população está estruturada ou se não apresenta diferenciação.

A variabilidade do DNA mitocondrial tem sido utilizada no estudo genético populacional de peixes de água doce neotropicais. O interesse do uso desta molécula para estudos populacionais e evolutivos se deve ao fato de apresentar herança citoplasmática, isto é, ser herdada via materna, de modo que não segue os padrões de segregação mendelianos e não sofre recombinações.

Essa herança materna possibilita esboçar uma genealogia materna ou mesmo uma filogenia materna, o que pode facilitar a compreensão do modo de dispersão de muitos organismos, acasalamentos preferenciais, entre outros. Nesta molécula, existe uma região não codificadora conhecida como *D-loop* que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma e é a parte mais variável do genoma mitocondrial (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Considerando a necessidade do repovoamento dos ambientes aquáticos e uma vez que variabilidade genética de peixes já é conhecida, a reprodução artificial se faz necessária para que se alcance uma maior quantidade de alevinos a serem liberados. A grande maioria das espécies de peixes criados ou mantidos em cativeiro só produzem ovócitos de boa qualidade através do uso de hormônios maturacionais, principalmente o extrato de hipófise de carpa desidratado em acetona, conhecido pelas siglas EBHC e cPE, em inglês. Os machos produzem espermatozóides viáveis sem a necessidade de aplicação de hormônios, embora seja comum aplicá-los para aumentar o volume do sêmen coletado (VIVEIROS; GODINHO, 2009). Os espermatozóides da grande maioria das espécies de peixes são imóveis no plasma seminal e adquirem motilidade quando entram em contato com o meio exterior: a água. Para permitir a conservação do sêmen, a ativação da motilidade dos espermatozóides deverá ser evitada utilizando-se recipientes secos, e diluidores com osmolaridade semelhante ao plasma seminal. O primeiro estudo com sucesso em criopreservação de sêmen de peixes foi publicado por Blaxter (1953). O método descrito foi amplamente aplicado não somente na aquicultura para hibridização e cruzamentos seletivos, como também em programas de preservação de espécies em extinção. Até 1996, o sêmen de mais de 200 espécies de peixe já tinha sido criopreservado com sucesso (RANA; GILMOUR, 1996). De lá para cá, vários pesquisadores se dedicaram a estudar e aprimorar essa técnica, inclusive no Brasil, e essa lista deve ter sido acrescida em pelo menos 30 espécies.

Entretanto, embora exista um número grande de estudos, ainda há ambiguidade quanto aos resultados divulgados, primariamente devido à falta de padronização das metodologias utilizadas e da análise dos dados. Além disso, devido ao fato dos peixes terem evoluído para se adaptarem a praticamente todas as superfícies de água da Terra (de água doce à lagos hipersalinos, de águas geladas do Ártico às águas quentes do deserto da Califórnia), existem diferenças substanciais em sua morfofisiologia e, conseqüentemente, os espermatozóides de cada espécie demonstram reações diferentes aos protocolos de conservação (KOPEIKA et al., 2007).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie em estudo



Figura 1 Exemplar de *Brycon opalinus*

A pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus*, (Cuvier, 1819) pertencente à família Characidae, subfamília Bryconinae é um peixe de porte médio, muito apreciado pelos habitantes das regiões próximas à sua área de distribuição, ou seja, a Bacia do Rio Paraíba do Sul (ROSA; LIMA, 2008).

Segundo o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ROSA; LIMA, 2008), a distribuição original de *B. opalinus* presumivelmente abrangia todos os rios de cabeceira das bacias dos rios Doce e Paraíba do Sul, nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Atualmente, *B. opalinus* está limitado a poucos tributários mais bem preservados destas bacias. Em Minas Gerais, existem registros recentes da espécie em tributários do Rio Paraíba do Sul, no rio do Peixe (município de Torreões) e no rio Preto (município de Rio Preto). Na bacia do rio Doce, registros atuais foram feitos somente no rio Piranga e na bacia do rio Santo Antônio, sendo que nesta última existem populações ainda bastante expressivas (ROSA; LIMA, 2008).

É uma espécie de porte médio, atingindo 35 cm e pesando até 1 kg que, assim como suas espécies congêneres, apresenta hábito alimentar onívoro. Na bacia do rio Santo Antônio, exemplares ativos reprodutivamente foram detectados entre março e início de maio e juvenis da espécie foram coletados no final de agosto (LIMA, 2001), indicando uma estação reprodutiva no fim das chuvas/começo da seca. Contudo, no rio Paraibuna (SP), a reprodução ocorre entre agosto e novembro. Exemplares em cativeiro atingem a maturidade sexual no segundo ano de vida (NARAHARA, 1993). É uma espécie reofilica, ou seja, que necessita de migrações para fazer a reprodução. Porém, parece não necessitar de longas migrações para o amadurecimento gonadal e a desova. Aspectos biológicos da reprodução induzida e adaptação ao cativeiro da espécie já estão descritos (NARAHARA et al., 2002; PAIVA, 1991), o que garante a produção de alevinos em cativeiro para implementação de programas de repovoamento.

Os principais impactos que levam à redução ou mesmo ao desaparecimento das populações de *B. opalinus* são aqueles relacionados à perda ou descaracterização dos ambientes ripários, tais como destruição das matas ciliares, assoreamento, poluição e barramento de rios (HILSDORF; PETRERE JÚNIOR, 2002).

Características das espécies do gênero *Brycon* como a adaptação ao cativeiro, a alimentação com ração comercial, além do crescimento rápido e do fato de ser fonte para alimentação humana (NARAHARA et al., 2002; ZANIBONI-FILHO et al., 2006) fazem com que muitas espécies desse gênero sejam exploradas comercialmente (FERREIRA et al., 1996). Tendo por base estas características, a pirapitinga-do-sul pode também se tornar uma nova espécie potencialmente importante para consumo humano, como já aconteceu com outras espécies. Além disso, por ser endêmica de cabeceiras de rios das bacias dos rios Paraíba do Sul e Doce, esta espécie pode ser usada como um

modelo para indicar as condições ambientais, uma vez que a situação de uma comunidade de peixes é um indicador direto o indireto do estresse do ambiente aquático como um todo (FAUSCHE et al., 1990).

2.2 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (DNAm_t) animal é uma molécula circular pequena fechada covalentemente, com tamanho variável, em geral de 16 a 20 kb (AVISE et al., 1987). Apresenta um conteúdo gênico altamente conservado que contém 37 genes, representado por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (12s e 16s), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP (7 subunidades da NADH desidrogenase, 3 subunidades da citocromo c oxidase, 2 subunidades da ATP sintase e do citocromo b) (CLAYTON, 1984).

Além das características ímpares deste genoma, o amplo conhecimento desta molécula está relacionado à facilidade de purificação, quando comparada a qualquer outro fragmento de DNA nuclear. Essa facilidade de purificação deve-se a sua densidade incomum, à ocorrência de grande número de cópias e ao fato de estar localizado em uma organela e não no núcleo (WILSON et al., 1985). Outras características do DNAm_t tais como: 1. alta taxa de substituição de nucleotídeos (cinco a dez vezes superior ao DNA nuclear) (BROWN et al., 1982); 2. herança materna (DAWID; BLACKLER, 1972); 3. conservação do tamanho, conteúdo e ordem gênica (WALLACE, 1982), transformaram-no em uma ferramenta muito utilizada para detectar diferenças genéticas intra e interespecíficas, bem como um marcador molecular muito utilizado na caracterização de estoques selvagens e cultivados de peixes (BROUGHTON; DOWLING, 1994). Os peixes parecem apresentar uma taxa de substituição de nucleotídeos do DNAm_t menor do que a dos vertebrados superiores (KOCHER

et al., 1989). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a alta taxa evolutiva do DNAm, entre elas está a ineficiência dos mecanismos de reparo para corrigir as mutações que surgem durante a replicação; o relaxamento de função e/ou da seleção; e a grande exposição do DNAm a danos oxidativos (CLAYTON, 1984). Praticamente, todo o genoma mitocondrial está envolvido em funções codificadoras, sendo que íntrons, DNA repetitivo e sequências espaçadoras entre genes são raras ou ausentes. Porém, existe nos vertebrados uma região não codificadora chamada região controle “*D-loop*” (Figura 1), que recebeu este nome por conter o “displacement loop”, com cerca de 800pb que contém os promotores da transcrição das cadeias leve e pesada, assim como a origem de replicação da cadeia pesada (CLAYTON, 1984). A taxa de evolução da região controle é de duas a cinco vezes superior à dos genes mitocondriais que codificam proteínas e essa região é a mais variável do DNAm, apresentando a maior taxa de substituição de nucleotídeos, assim como a maior variação no número de sequências repetidas em tandem (200 - 4100 pb). Essas sequências são consideradas como as principais responsáveis pelas variações no tamanho do genoma mitocondrial de vertebrados (MORITZ et al., 1987).

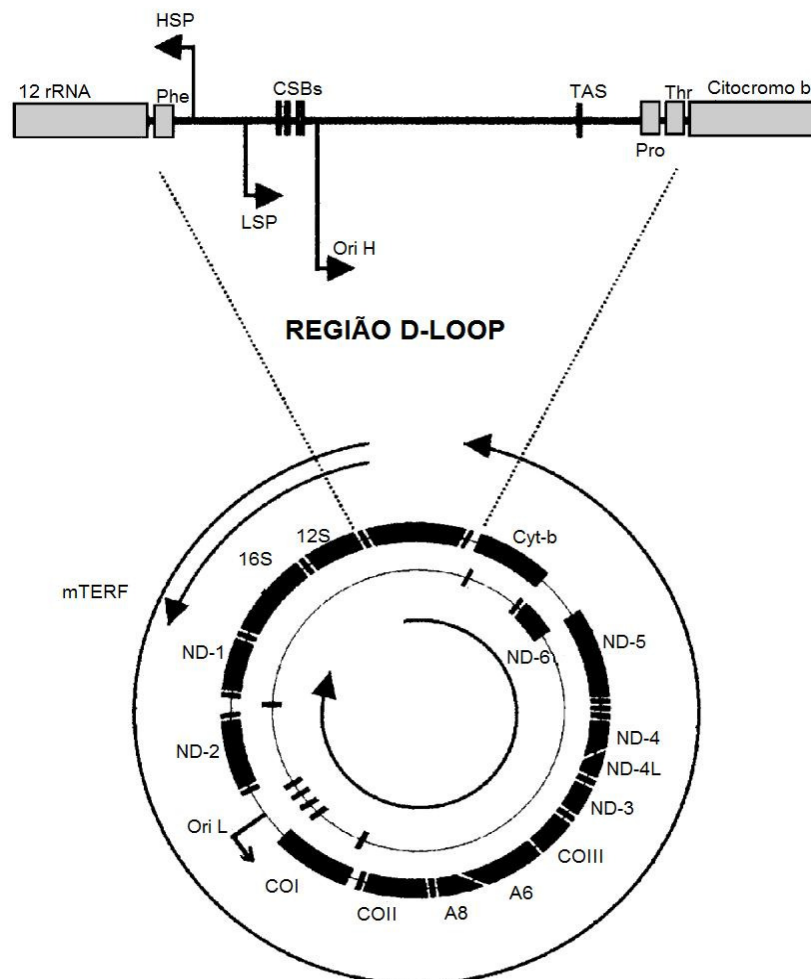


Figura 2 Região controle (*D-loop*) do DNAm_t

Fonte: Selwood et al. (2000).

A região controle também contém a mais alta frequência de mutações no comprimento em nível de população. Dos três tipos de mutações que ocorrem nas sequências, as substituições de bases (em vertebrados as transições são mais frequentes que as transversões) algumas envolvem pequenas adições/deleções de

nucleotídeos e outras são causadas por diferenças no tamanho da molécula do DNAm. Adições e deleções são frequentemente mais observadas na região controle e nos espaçadores intergênicos. Outros genes mitocondriais ou nucleares podem ter taxas de substituição mais adequada para questões particulares. A análise de base por base da região controle pode fornecer mais informações sobre a estrutura populacional e contém mais (até três vezes mais) informações filogenéticas que o citocromo b (MEYER, 1994).

Estudos de variação geográfica do DNAm vêm sendo realizados em diversas espécies de peixes, em escalas espaciais e temporais. Em razão de apresentar uma alta taxa de evolução e de gerar marcadores genéticos que distinguem populações geográficas com grande eficiência, o DNAm é capaz de fornecer informações relacionadas à estrutura populacional e à história evolutiva de uma grande variedade de organismos (MEYER, 1994).

2.3 Criopreservações do sêmen de peixes

A criopreservação do sêmen é um processo que envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido a -196°C , mantendo sua viabilidade por tempo indefinido. As aplicações de bancos de sêmen em programa de conservação de recursos genéticos em piscicultura incluem:

- a) A recuperação de estoques silvestres ameaçados de extinção;
- b) A redução do número de reprodutores (machos), utilizados em programas de propagação artificial com conseqüente redução de custos;

- c) A eliminação do problema da assincronia na maturidade gonadal entre reprodutores principalmente das espécies migratórias (ou de piracema), quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente para a reprodução; através da preservação do sêmen, os gametas masculinos são armazenados por um determinado tempo até que os gametas femininos estejam disponíveis;
- d) O estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados ou manipulados geneticamente (triplóides, transgênicos);
- e) A facilidade de transporte, difusão e troca de material genético entre organizações atuantes na área com risco reduzido de transmissão de patógenos;
- f) O fornecimento de materiais genéticos para a identificação de populações ou estoques através de técnicas de biologia molecular;
- g) O estabelecimento de programa de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes.

Embora existam muitos protocolos de congelamento de sêmen de peixes neotropicais já testados e publicados, ainda há muito trabalho a ser feito para melhorar essa tecnologia. De uma maneira geral, cerca de 40 a 90% dos espermatozoides de peixes de água doce sofrem algum tipo de danificação durante o processo de congelamento e descongelamento. Os espermatozoides dessas espécies não estão acostumados a um aumento na osmolaridade do meio extracelular e, por isso, estão sujeitos a significativo estresse durante o processo de adição de crioprotetores e a subsequente criopreservação (KOPEIKA et al., 2007).

Existe uma grande variabilidade quanto a crioresistência, não somente entre as espécies de peixes, como entre indivíduos da mesma espécie

(VIVEIROS; GODINHO, 2009). Infelizmente, não existe um único protocolo que permita a criopreservação de sêmen de espécies diferentes de peixe, visto o grande número de espécies nesse grupo de vertebrados. Para desenvolver protocolos de criopreservação de sêmen, é preciso um conhecimento mínimo sobre criobiologia, velocidades de congelamento e efeito dos crioprotetores.

2.3.1 Criobiologia e crioinjúrias

Algumas informações básicas sobre criobiologia são necessárias para a compreensão das injúrias que acontecem inevitavelmente durante o congelamento e descongelamento, e como preveni-las. O congelamento, tanto muito lento quanto muito rápido, tende a ser prejudicial às células. Quando qualquer célula em meio aquoso é submetida a temperaturas entre -5° e -15°C , ocorre formação de gelo no meio externo (cristalização). Entretanto, o conteúdo celular permanece líquido e supergelado. O calor latente do processo de cristalização eleva a temperatura para o ponto de congelamento do meio, isto é, -5°C . Como parte da água do meio extracelular é transformada em gelo, o meio se torna cada vez mais concentrado (hiperosmótico) em relação às células. Numa tentativa de manter o equilíbrio, a água do meio intracelular sai das células. Os subseqüentes eventos físicos que acontecem na célula dependem da velocidade de congelamento. Se o congelamento é suficientemente lento, a célula é capaz de perder água rapidamente, desidratar e encolher. Entretanto, a exposição prolongada das células ainda não-congeladas a um meio cada vez mais hiperosmótico causará uma desidratação excessiva e a célula murchará, além do contato com resíduos intra- e extracelulares cada vez mais concentrados. Esses efeitos são conhecidos como “efeitos de solução” (solution effects). Por outro lado, se as células são congeladas muito rapidamente, elas não são capazes de perder água suficientemente rápido para manter o equilíbrio. A água torna-se

cada vez mais supergelada e eventualmente congela-se internamente, formando cristais de gelo intracelular. Durante o descongelamento, esses cristais podem se recrystalizar em cristais maiores e destruir as membranas celulares. Não existe exatamente uma linha que separe os danos causados pela formação de gelo intracelular dos danos causados pelos efeitos de solução, principalmente porque os efeitos de solução ocorrem durante todo o processo de congelamento. Assim, a velocidade de congelamento ótima é suficientemente lenta para prevenir a formação do gelo intracelular e suficientemente rápida para minimizar o tempo em que as células ficarão expostas aos efeitos de solução. A velocidade de congelamento ótima varia de -1° a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para sêmen humano (HENRY et al., 1993) e $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para sêmen bovino (WOELDERS et al., 1997).

Durante os anos 80 e 90, pesquisadores brasileiros utilizaram principalmente duas técnicas para se congelar sêmen de peixes: pellets e em vapor de nitrogênio numa caixa de isopor. A maneira mais antiga de congelar sêmen é em pellets que são pequenas gotas formadas ao se gotejar o sêmen diluído diretamente num bloco de gelo seco (-79°C). Essa técnica foi utilizada em jundiá *Rhamdia quelen* (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1985). A adição de nitrogênio líquido numa caixa de isopor e a exposição ao frio do sêmen já diluído e envasado em palhetas colocado a alguns centímetros acima da superfície do nitrogênio permite o congelamento do sêmen sem necessidade de equipamentos caros.

A tecnologia da criopreservação de sêmen de peixes no Brasil se expandiu grandemente com a utilização de botijões portáteis de vapor de nitrogênio, conhecidos como *dry-shipper* ou botijão canadense (Figura 3). O sêmen -- envasado em palhetas (de 0,25 a 4,0 mL) -- é colocado no interior do botijão e submetido a velocidades entre -30° e $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (TAITSON et al., 2008).

O sêmen de várias espécies de peixes neotropicais das ordens Siluriformes e Characiformes -- incluindo espécies do gênero *Brycon* -- já foi congelado com sucesso através desse método de congelamento (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

Mais recentemente, o uso de congeladores programáveis tem permitido o emprego de velocidades mais lentas, o uso de mais de uma velocidade (ou etapa) por programa, a inclusão de tempo de espera entre etapas, etc. Entretanto, em função do alto custo, esse equipamento ainda não foi testado nas espécies neotropicais brasileiras.

Independentemente da forma de congelamento, o sêmen deve ser armazenado submerso em nitrogênio líquido, a -196°C . Somente no momento em que será utilizado, o sêmen deve ser descongelado. O descongelamento é feito sempre em banho-maria, em temperaturas que variam entre 30° e 80°C por 3 a 60 segundos, quando o sêmen é congelado em palhetas de 0,5 mL. A Tabela 1 mostra alguns protocolos de congelamento e descongelamento que apresentaram os melhores resultados segundo seus autores, utilizados em espécies do gênero *Brycon*.



Figura 3 Botijão de vapor de nitrogênio *dry-shipper*

Tabela 1 Tipos de container, métodos de congelamento e de descongelamento em banho-maria utilizados na criopreservação de sêmen de espécies de peixes do gênero *Brycon*

Espécie	Palhetas	Congelamento	Descongelamento	Referência
<i>B. amazonicus</i>	0,5 mL	1 cm acima superfície N ₂ L	36°C por 10 seg	Ninhaus-Silveira et al., 2006a
<i>B. cephalus</i>	0,5 ou 4,0 mL	1 cm acima superfície N ₂ L	36°C por 10-30 seg	Ninhaus-Silveira et al., 2006b
<i>B. insignis</i>	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 16 seg	Amaral, 2009
<i>B. nattereri</i>	0,25 ou 0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	50°C ou 60°C por 8 seg	Oliveira et al., 2007
	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 16 seg ou 60°C por 8 seg	Viveiros et al., 2010b
	4,0-mL	<i>Dry-shipper</i>	30°C por 32 seg ou 60°C por 24 seg	Viveiros et al., 2010b
<i>B. orbignyanus</i>	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	50°C por 10 seg	Murgas et al., 2003
	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	60°C por 8 seg	Maria et al., 2006a, b
<i>B. orthotaenia</i>	0,5 mL	<i>Dry-shipper</i>	35°C por 7-10 seg	Melo e Godinho, 2006

N₂L = nitrogênio líquido

Fonte: Adaptado de Viveiros e Godinho (2009).

2.3.2 Crioprotetores e diluidores

Embora a sobrevivência dos espermatozóides ao congelamento e descongelamento possa ser maximizada pela otimização dos protocolos, essa sobrevivência é muito baixa se agentes crioprotetores permeáveis (ou intracelulares) não forem adicionados ao meio criodiluidor. A descoberta de que o glicerol poderia prevenir as crioinjúrias causadas durante o congelamento lento e descongelamento dos espermatozóides e de células vermelhas (POLGE et al., 1949) aumentou o interesse de formação de bancos de células vivas, em temperaturas baixas. A partir daí, vários compostos foram identificados como protetores de células contra os danos causados pelo congelamento. Vários crioprotetores permeáveis tem sido testados em sêmen de peixes: dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, dimetil acetamida (DMA), etileno glicol, metil glicol e propileno glicol. Os crioprotetores que tem produzido os melhores resultados são: DMSO e metil glicol para os Characiformes, e metanol para os Siluriformes (VIVEIROS; GODINHO, 2009). Esses crioprotetores reduzem o ponto de congelamento do meio extracelular, atenuam os efeitos deletérios dos cristais de gelo, e regulam a velocidade de desidratação das células, reduzindo os danos causados pela alta concentração de solutos durante o congelamento lento, os efeitos de solução (MAZUR, 1970). Entretanto, a alta concentração dos crioprotetores ou um prolongado tempo de exposição, podem desnaturar as proteínas celulares reduzindo a viabilidade das células antes mesmo do congelamento. Esses crioprotetores são normalmente usados em concentrações de 5 a 15%.

Outro grupo de crioprotetores - impermeáveis ou extracelulares - tem sido adicionados ao meio de congelamento, em combinação com os agentes internos. Os crioprotetores impermeáveis incluem os açúcares (sacarose, glicose), polímeros (dextran) e proteínas (gema de ovo e leite desnatado). Esses

agentes recobrem a superfície da célula estabilizando a membrana. A gema de ovo e o leite em pó desnatado são os mais comumente utilizados nos meios de congelamento. Alguns desses meios testados em espécies de peixe do gênero *Brycon* são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 Diluidores, crioprotetores permeáveis e taxa de diluição utilizados na criopreservação de sêmen de espécies de peixes do gênero *Brycon*, e que produziram os melhores resultados em cada estudo

Espécie	Diluidor	Crioprotetor	Sêmem:volume total	Referência
<i>B. amazonicus</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:4	Ninhaus-Silveira et al., 2006a
<i>B. cephalus</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:4	Ninhaus-Silveira et al., 2006b
<i>B. insignis</i>	Glicose ou NaCl 0,9%	Metil glicol	1:10	Amaral, 2009
<i>B. nattereri</i>	BTS® ou NaCl 0,9%	Metil glicol	1:10	Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2010b
<i>B. orbignyana</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	-	Murgas et al., 2003
	BTS®	Metil glicol	1:10	Maria et al., 2006b
	NaCl 0,9% + gema de ovo	Metil glicol	1:10	Maria et al., 2006a
<i>B. orthotaenia</i>	Glicose + gema de ovo	DMSO	1:6	Melo e Godinho, 2006

BTS® (Beltsville Thawing Solution, Minitub®): sulfato de gentamicina, glicose, citrato de sódio, EDTA, NaHCO₃, KCl.

DMSO = dimetil sulfóxido.

- = não descrito

Fonte: Adaptado de Viveiros e Godinho (2009)

Os crioprotetores são misturados às soluções aquosas (diluidores) para que atinjam o interior e a superfície dos espermatozóides no processo de congelamento. Para que não haja a ativação da motilidade dos espermatozóides, a solução aquosa deverá conter sais (KCl, NaCl, NaHCO₃, etc) e/ou açúcares, para manter alta a osmolaridade no meio diluidor. Soluções simples como NaCl 0,9% e glicose 5%, bem como soluções mais complexas como o BTS[®] (primariamente desenvolvido como diluidor de sêmen de suíno; Minitub[®]), têm sido usadas com sucesso na criopreservação de sêmen de peixes do gênero *Brycon* (Tabela 2).

Como pode ser observado na Tabela 2, vários meios de congelamento têm sido definidos como o melhor para a mesma espécie quando testado por diferentes pesquisadores. A combinação diluidor e crioprotetor permeável pode ser mais ou menos efetiva na proteção dos espermatozóides durante o congelamento e descongelamento, de acordo com o protocolo utilizado em cada laboratório. Alguns fatores interferem no sucesso da criopreservação, tais como: taxa de diluição, temperatura do meio no momento da adição do sêmen, tempo de exposição dos espermatozóides ao meio antes do congelamento propriamente dito, entre outros. Além disso, diferenças entre exemplares domesticados em relação aos selvagens, e diferenças na alimentação e no manejo da criação podem alterar a composição do plasma seminal e, conseqüentemente a sensibilidade dos espermatozóides ao processo de criopreservação.

2.3.3 Avaliação do sêmen após a criopreservação

O sêmen criopreservado tem sido avaliado tradicionalmente em termos de percentagem de espermatozóides com movimentos progressivos, com auxílio do microscópio de luz. Essa metodologia segue os mesmos procedimentos descritos para o sêmen fresco. Usualmente, uma gota de sêmen é colocada numa

lâmina histológica rigorosamente limpa e levada ao microscópico de luz em aumento de 200 ou 400 x. Em seguida, a solução ativadora é acrescentada e a motilidade é avaliada subjetivamente. O resultado é expresso em percentagem de espermatozóides móveis em relação ao total de espermatozóides. Esse método é subjetivo, mas com alguma prática, um técnico pode ser bastante preciso na avaliação. Durante a última década, com o desenvolvimento de técnicas mais avançadas, a avaliação da motilidade espermática tem sido feita cada vez mais frequentemente através de analisador computadorizado, conhecido pela sigla em inglês CASA - Computer Assisted Semen Analysis. De acordo com a essa revisão, apenas dois estudos foram encontrados com sêmen de espécies nativas (NASCIMENTO et al., 2010; VIVEIROS et al., 2010a). Nesses dois estudos, a motilidade subjetivamente avaliada por um técnico foi comparada com a motilidade avaliada pelo CASA, e nenhuma diferença significativa foi observada. Isso garante a qualidade da avaliação feita por técnicos bem preparados e valida o uso dessa avaliação em laboratórios que não dispõem de recursos para aquisição de tal equipamento, bem como na rotina das pisciculturas.

A duração da motilidade do sêmen criopreservado tem sido avaliada com o objetivo de se verificar se os espermatozóides descongelados estarão móveis por tempo suficiente para entrar na micrúpila e fertilizar os ovócitos. A duração da motilidade do sêmen descongelado varia de 40 segundos em *P. lineatus* (COSER et al., 1984) a 1031 segundos em *B. insignis* (AMARAL, 2009). De uma maneira geral, a motilidade espermática é mais longa quando a solução de NaHCO_3 é usada como ativador, em relação à de NaCl 0,29%.

Com menor frequência do que o sêmen fresco, o sêmen criopreservado tem sido avaliado quanto à percentagem de espermatozóides vivos pela coloração eosina-nigrosina, especialmente em combinação com a avaliação subjetiva da motilidade espermática, já que a correlação entre esses dois

parâmetros é evidente também em sêmen criopreservado. Por exemplo, o sêmen criopreservado de *B. orbignyana* apresentou 60-68% de motilidade e 62-70% de espermatozóides vivos (MARIA et al., 2006b).

O parâmetro mais importante para ser avaliado no sêmen criopreservado é a sua capacidade de fertilizar ovócitos. Em função da dificuldade de se obter ovócitos de boa qualidade, esse parâmetro nem sempre é avaliado. A grande variação na qualidade de ovócitos é facilmente observada em um estudo com sêmen de *P. lineatus* criopreservado em glicose e metil glicol e usado para fertilizar ovócitos frescos de sete fêmeas. A taxa de fertilidade variou entre 47% na fêmea #7 e 83% na fêmea #1 (VIVEIROS et al., 2009). Além disso, a qualidade dos ovócitos declina muito rapidamente após a desova. Em *S. brasiliensis*, a taxa de eclosão dos ovócitos caiu de 80% para 5% em apenas 30 min após a desova, quando os ovócitos foram mantidos em temperatura ambiente de aproximadamente 24°-26°C. De uma maneira geral, a taxa de fertilização observada para o sêmen de espécies brasileiras submetido a criopreservação varia entre 39% em *Piaractus mesopotamicus* a 95% em *Prochilodus lineatus*, relativo ao controle (VIVEIROS; GODINHO, 2009). A qualidade do sêmen de espécies do gênero *Brycon* após o descongelamento é apresentada na Tabela 3. Como nenhum estudo feito anteriormente com essas espécies descreve a taxa de fertilização, na Tabela 3 a qualidade do sêmen é avaliada quanto à taxa de eclosão. Cabe aqui ressaltar que qualquer taxa de fertilização ou de eclosão baixa pode ser aumentada simplesmente aumentando-se a quantidade de espermatozóides. O número ideal de espermatozóides por ovócitos ainda não está determinado nas espécies neotropicais, mas sabe-se que um excesso de espermatozóides é utilizado nas estações de pisciculturas com o objetivo de garantir a fertilização. É necessário mais pesquisas relacionadas à otimização dos protocolos de reprodução artificial para as espécies neotropicais brasileiras.

Tabela 3 Parâmetros de qualidade do sêmen avaliados após a criopreservação no método mais eficiente descrito em cada estudo para espécies do gênero *Brycon*

Espécie	Motilidade subjetiva (%)	Duração da motilidade (segundos)	% vivos*	Eclosão (% controle)	Referência
<i>B. amazonicus</i>	-	-	-	82	Ninhaus-Silveira et al., 2006a
<i>B. cephalus</i>	-	-	-	59 - 69	Ninhaus-Silveira et al., 2006b
<i>B. insignis</i>	70 - 74	113 – 120	-	-	Amaral, 2009
<i>B. nattereri</i>	51 - 67	-	-	-	Oliveira et al., 2007
	73 - 79	392 – 1031	-	-	Viveiros et al., 2010b
<i>B. orbignyanus</i>	74 ± 22	153 ± 48	68 ± 18	-	Murgas et al., 2003
	68	-	66	77	Maria et al., 2006b
	66	-	-	-	Maria et al., 2006a
<i>B. orthotaenia</i>	70 ± 11	62 ± 8	-	-	Melo e Godinho, 2006

= não descrito

* = coloração com eosina –nigrosina;

Fonte: Adaptado de Viveiros e Godinho (2009).

Finalmente, para garantir uma maior taxa de fertilização, o sêmen quando descongelado deve ser imediatamente utilizado. Primeiramente, devem-se misturar muito bem e delicadamente os ovócitos com o sêmen. Somente então, a água (ou outro ativador) deve ser acrescentada – método seco. Após alguns minutos agitando levemente, os ovos devem ser transferidos para incubadoras do tipo funil, com renovação constante de água. A temperatura da água das incubadoras deverá ser mantida com termostato, para evitar quedas bruscas durante a noite.

3 OBJETIVO E ESCOPO DA TESE

O objetivo geral deste estudo foi o de avaliar a diversidade genética das populações encontradas em tributário do Rio Paraíba do Sul da espécie de peixe pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* e desenvolver um protocolo para criopreservação de sêmen, auxiliando em ações de conservação dessa espécie. O resumo da estrutura desta tese está apresentado na Figura 4.

No Artigo 1, o sequenciamento da região do *D-loop* do DNA mitocondrial foi utilizado para descrever a diversidade genética intra e inter populacional de amostras de *B. opalinus* provenientes de quatro tributários da bacia do Rio Paraíba do Sul. O conhecimento da diversidade de uma espécie indica se a espécie deve ser conservada como populações diferenciadas geneticamente, ou como uma única população.

Uma vez que não havia nenhuma informação sobre a ativação da motilidade espermática desta espécie, no Artigo 2, procurou-se investigar o efeito de algumas combinações de diluidores (composição e osmolaridade) e de crioprotetores, geralmente usadas na criopreservação de sêmen, na ativação da motilidade espermática, além de avaliar a qualidade do sêmen diluído nessas combinações após 30 min a 4°C, através da porcentagem de espermatozóides e da duração da motilidade. As características do sêmen fresco e correlações entre essas características foram estudadas a fim de que sejam melhor conhecidas e, possibilitando, assim, a comparação com outras espécies.

Utilizando as informações obtidas no estudo anterior, no Artigo 3 os meios que mantiveram a qualidade espermática foram utilizados na criopreservação. Além da porcentagem de espermatozóides móveis e a duração da motilidade, a qualidade seminal também foi avaliada pela porcentagem de espermatozóides vivos. Neste artigo, além dos meios de congelamento, também foram avaliados dois tempos de equilíbrio, dois volumes de palhetas e duas

temperaturas de descongelamento. O sêmen congelado no melhor meio foi utilizado para fertilizar ovócitos e boas taxas de fertilização e eclosão foram produzidas.

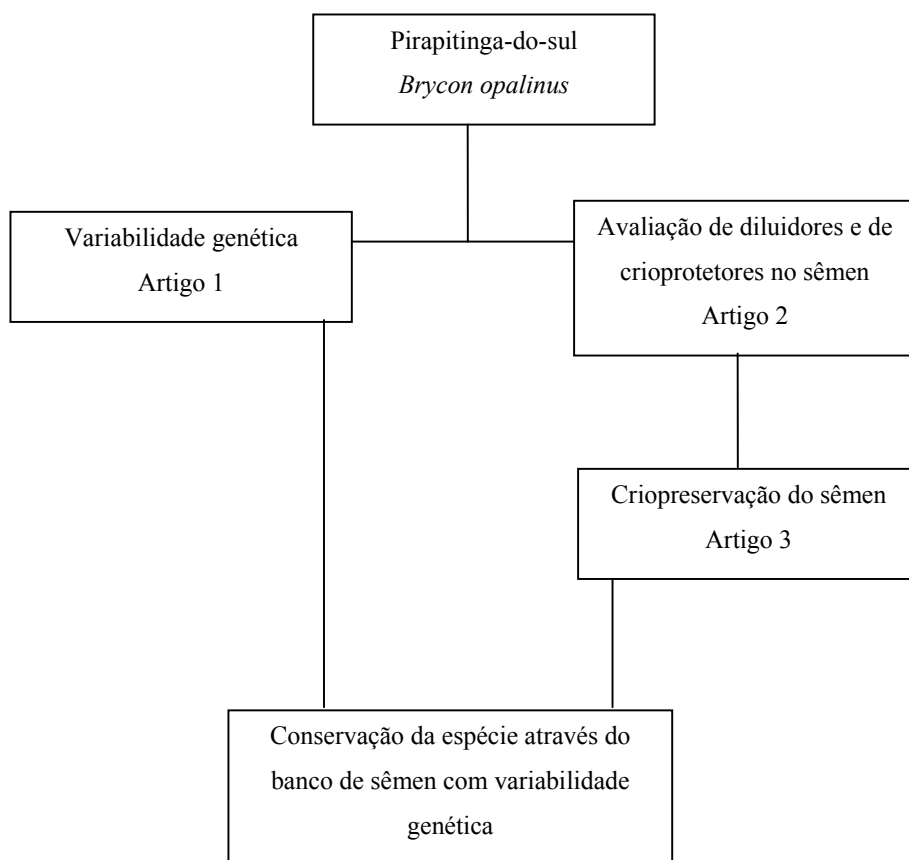


Figura 4 Resumo da estrutura da tese

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, são apresentadas informações sobre variabilidade genética e a criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus*.

O conhecimento da variabilidade genética da pirapitinga-do-sul é fundamental para traçar estratégias de conservação para esta espécie. Como as amostras avaliadas mostraram-se estruturadas, cada população dos tributários do rio Paraíba do sul deve ser considerada como uma população única e diferenciada das outras. O manejo dessas populações para fins de repovoamento deve ser diferenciado, mantendo-se os reprodutores isolados e a reprodução artificial levar em consideração a caracterização genética.

A criopreservação de sêmen é uma técnica que auxilia na reprodução artificial. No caso da espécie em estudo, por exemplo, pode-se deslocar uma equipe para os locais dos tributários onde se encontra a espécie para que se faça a coleta do sêmen na natureza. A formação de um banco de sêmen deve considerar a caracterização genética da espécie e, por isso, uma identificação minuciosa de todo material preservado precisa ser feita.

Os programas de repovoamento e outras ações para conservação da ictiofauna são objetos de vários estudos que tentam demonstrar sua eficácia. A reprodução artificial para fins de repovoamento, por exemplo, é muito questionada quanto à perda da variabilidade genética ou ainda da adaptação dos indivíduos que são liberados na natureza. Se esses programas forem delineados a partir das informações genéticas das populações e ainda utilizando gametas de grande número de reprodutores, esses efeitos negativos podem ser minimizados.

Devido à grande diversidade da ictiofauna brasileira, as informações existentes relativas às espécies de peixes e sua variabilidade genética ou criopreservação de sêmen ainda são insuficientes. As técnicas usadas neste estudo podem ser aplicadas a outras espécies, sejam elas de importância

ecológica ou comercial, as quais necessitam de mais conhecimento para a conservação ou melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, T. B. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de peixe teleósteo piabanha (*Brycon insignis*)**. 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 146-154.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. **Annual Reviews in Ecology Systematics**, USA, v. 18, p. 489-522, Nov. 1987.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, p. 1189-1190, Oct. 1953.
- BROUGHTON, R. E.; DOWLING, T. E. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*. **Genetics**, Austin, v. 138, n. 1, p. 179-190, 1994.
- BROWN, W. M. et al. Mitochondrial DNA sequences of primates: time and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 18, n. 4, p. 225-239, 1982.
- BRUTON, M. N. Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes. **Environmental Biology of Fishes**, Netherlands, v. 43, n. 1, p. 1-27, 1995.
- CLAYTON, D. A. Replication of the animal mitochondrial DNA. **Cell**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 639-705, 1984.
- COSER, A. M. et al. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

DANZMANN, R. G. et al. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. **Journal of Fish Biology**, London, v. 39, p. 69-77, Dec. 1991.

DAWID, I. B.; BLACKLER, A. W. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. **Developmental Biology**, California, v. 29, p. 152-161, Oct. 1972.

FAUSCH, K. D. et al. Fish communities as indicators of environmental degradation. In: ADAMS, S. M. (Ed.). **Biological indicators of stress in fish**. New York: American Fisheries Society, 1990. p. 123-144.

FERREIRA, E. J. G. et al. **Peixes comerciais do Médio Amazonas**: região de Santarém, Pará. Brasília: Edições Ibama, 1996. 214 p.

FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 7-11, 1985.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

HENRY, M. A. et al. Cryopreservation of human spermatozoa: IV. the effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 60 p. 911-918, Nov. 1993.

HILSDORF, A. W. S.; PETRERE JÚNIOR, M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência-Hoje**, São Paulo, v. 30, p. 62-65, jul. 2002.

KOCHER, T. D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 86, p. 6196-6200, July 1989.

KOPEIKA, E. et al. Cryopreservation of fish sperm. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa, New Jersey: Human, 2007. p. 203-217.

LIMA, F. C. T. **Revisão taxonômica do gênero *Brycon* (Müller & Troschel, 1844), dos rios da América do Sul cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. 2001. 312 p. Dissertação (Mestrado em Biociências)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MACHADO, C. E.; ABREU, H. C. F. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no estado de São Paulo: I, a pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Industrial Animal**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 145-160, 1952.

MARIA, A. N. et al. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 55-60, 2006a.

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, p. 298-306, June 2006b.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, Washington, v. 168, n. 3934, p. 939-949, 1970.

MELO, F. C. S. A.; GODINHO H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 380-385, 2006.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A. R. (Ed.). **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 219-249.

MORITZ, C.; BROWN, W. M. Tandem duplication in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 84, p. 7183-7187, Aug. 1987.

MURGAS, L. S. D. et al. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

NARAHARA, M. Y. et al. Reprodução induzida da Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 1070-1075, 2002.

NARAHARA, M. Y. Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon* no Instituto de Pesca. In: SEMINÁRIO SOBRE CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *BRYCON*, 1., Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: CEPTA, 1993. p. 5-8.

NASCIMENTO, A. F. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 324-329, 2010.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Fertilidade do sêmen criopreservado de matrinxã, *Brycon amazonicus* criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2006a.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006b.

OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen em pirapitinga (*Brycon nattereri*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

PAIVA, M. J. T. R. Características sanguíneas da Pirapitinga-do-sul, *Brycon sp.*, sob condições experimentais de criação intensiva. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 28, n. 2, p. 141-153, 1991.

POLGE, C. et al. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 666-670, Oct. 1949.

RANA, K. J.; GILMOUR, A. Cryopreservation of fish spermatozoa: effect of cooling methods on the reproducibility of cooling rates and viability. In: REFRIGERATION AND AQUACULTURE CONFERENCE, 1., 1996, Bordeaux. **Proceedings...** Bordeaux: Institut International du Froid, 1996. p. 3-12,

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, A. M; PAGLIA, A. P (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2.

SELWOOD, S. P. et al. Does the mitochondrial transcription-termination complex play an essential role in controlling differential transcription of mitochondrial DNA? **Biochemical Society Transactions**, New York, v. 28, n. 2, p. 154-158, 2000.

TAITSON, P. F. et al. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 283-291, 2008.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 293-300, 2009.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 4, p. 551-556, 2010a.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Spermatozoa ultrastructure and sperm cryopreservation of the neotropical freshwater fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, Oxford, 2010b.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, New York, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.

WALLACE, D. C. Structure and evolution of organelle genomes. **Microbiology and Molecular Reviews**, London, v. 46, n. 1, p. 208-240, 1982.

WILSON, A. C. et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 26, n. 4, p. 375- 400, 1985.

WOELDERS, H. et al. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, San Diego, v. 35, n. 2, p. 93-105, 1997.

ZANIBONI-FILHO, E. et al. Potencialidad del género Brycon en la piscicultura brasileña.. **Revista Colombiana de Ciência e Pecuária**, Medellin, v. 9, n. 2, p. 233-240, 2006.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 Variabilidade genética da região *D-loop* do DNA mitocondrial da espécie *Brycon opalinus* encontradas em tributários do Rio Paraíba do sul: implicações para conservação da espécie

Preparado de acordo com as normas da revista Aquaculture Research

RESUMO

ORFÃO, L.H; HILSDOR, A.W.S.; VIVEIROS, A.T.M Variabilidade genética da região *D-loop* do DNA mitocondrial da espécie *Brycon opalinus* encontradas em tributários do Rio Paraíba do Sul: implicações para conservação da espécie. In: _____. **Diversidade genética de populações e criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 120p., p. 31-55. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A espécie de peixe pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* é endêmica dos rios Paraíba do Sul e Doce. Em consequência de fatores que interferem no seu comportamento, como destruição das matas ciliares, assoreamento, poluição e barramento dos rios, o número de indivíduos dessa espécie tem declinado. Neste estudo, o sequenciamento da região do *D-loop* do DNA mitocondrial foi utilizado para descrever a variabilidade genética intra e inter populacional de amostras de *B. opalinus* provenientes de quatro tributários da bacia do rio Paraíba do Sul. O total de 87 indivíduos foram coletados nos tributários do Rio Paraíba do Sul. Destes animais, 45 diferentes haplótipos foram observados. Alta diversidade haplotípica e nucleotídica foram encontradas: $0,934 \pm 0,016$ e $0,0116 \pm 0,002$, respectivamente. A análise da AMOVA mostrou alta variação dentro populações (78,20%), enquanto que 21,02% do total da diversidade deveram-se à variação entre as populações. O alto Φ_{st} (0,21798) encontrado sugere a existência de diferenciação genética entre as populações de *B. opalinus*. Assim, um programa de repovoamento dessa espécie deve levar em consideração essa estrutura genética, além da manutenção dos tributários onde essa espécie ainda se encontra presente.

* Comitê Orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora); Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf- UMC (Co-orientador); Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas- UFLA (Co-Orientador);

ABSTRACT

ORFÃO, L.H; HILSDOR, A.W.S.; VIVEIROS, A.T.M Genetic variability of *D-loop* from mitochondrial DNA of *Brycon opalinus* specie from tributaries of Paraíba do Sul river: implication for specie conservation. In:____. **Genetic population diversity and sperm cryopreservation of pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 120p., p. 32-52. Thesis (Doctor in Animal Production) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The species of fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* is endemic to the rivers Doce and Paraíba do Sul. As a result of factors that interfere on behavior, such as destruction of riparian forests, pollution of rivers and dam construction, the number of individuals is declining. In this study, sequence analyses of *D-loop* region from mitochondrial DNA was used to describe the genetic variability inner and intrapopulations of *B. opalinus* from four tributaries of Paraíba do Sul basin. A total of 87 individuals were collected in tributaries of the Paraíba do Sul: Itagaçaba River, Preto River, Santíssimo River and Paraibuna River. Of the total, 45 different haplotypes were observed. High haplotype diversity and nucleotide diversity were found: 0.934 ± 0.016 and 0.0116 ± 0.002 , respectively. The analysis of AMOVA showed high variation inner populations (78.20%) while 21.02% of the total diversity was due to differences intrapopulations. The high Φ_{st} (0.21798) found suggests the existence of genetic differentiation among populations of *B. opalinus*. Thus, a program of repopulation of this species should take into consideration the genetic structure, as well as maintenance of the tributaries where the species is still present.

* Comitê Orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora); Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf- UMC (Co-orientador); Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas- UFLA (Co-Orientador);

1 INTRODUÇÃO

Com cerca de 1.000 km, o Rio Paraíba do Sul é considerado o maior rio de várzeas do Sudeste. Seu curso começa no município de Paraibuna (SP), a partir da confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, e atravessa o Rio de Janeiro de sul a norte. A foz está situada em Atafona (RJ) e sua bacia, com área de cerca de 57 mil km², espalha-se pelos estados de São Paulo (38%), Rio de Janeiro (38%) e Minas Gerais (24%).

O Rio Paraíba do Sul e seus tributários apresentam diversas espécies endêmicas e algumas introduzidas, como o dourado (*Salminus brasiliensis*) (Caramaschi, 1991) e a tilápia. A ictiofauna é composta principalmente de peixes das ordens Characiformes e Siluriformes (Britski, 1994). Algumas espécies dessas ordens, como *Steindachneridion parahybae*, *Brycon insignis* e *Brycon opalinus* estão classificadas como ameaçadas no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Rosa e Lima, 2008). Os motivos que levaram essas espécies a estarem ameaçadas de extinção são principalmente alterações nas condições dos rios, tais como destruição das matas ciliares, assoreamento, poluição e barramento (Hilsdorf e Petreire, 2002).

O gênero *Brycon* é a maior divisão dentro da família Bryconinae, constituído de 42 espécies válidas (Lima, 2003). Espécies desse gênero são importantes para o consumo e pesca esportiva e tem sido comercialmente produzidas (Carosfeld et al., 2003). A espécie *Brycon opalinus* habita rios de cabeceiras, de água relativamente fria, encachoeirados, de pequeno e médio porte, localizados nas bacias dos rios Paraíba do Sul e Doce. Em vista dessas características, *B. opalinus* pode ser uma espécie modelo para indicar as condições ambientais destes locais, uma vez que integridade de uma comunidade de peixes é um indicador sensível de estresse direto e indireto em ecossistemas aquáticos (Fausch et al., 1990).

Esta espécie é muito apreciada pelos habitantes locais, mas sua população -- assim como a de outras da mesma bacia -- tem declinado em consequência de fatores que interferem no seu comportamento. Dessa forma, tornam-se imperiosas as ações de repovoamento de rios e de reservatórios e de manutenção do ambiente onde ainda se encontra a espécie *B. opalinus*.

Diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas em estudos da diversidade genética e biologia da conservação (O'Brien, 1994; Beaumont & Bruford, 1999). Estudos com marcadores moleculares têm sido conduzidos (Hilsdorf et al., 2002; Barroso et al., 2005), avaliando-se a variabilidade genética de populações em cativeiro e selvagens de *B. opalinus*. Diferentemente de Barroso et al. (2005) que avaliaram a variabilidade através de marcador nuclear (microsatélite), Hilsdorf et al. (2002) utilizaram marcador mitocondrial e a técnica de RFLP para estimar a variabilidade genética dentro e entre populações.

O DNA mitocondrial (DNAm_t) apresenta um conteúdo gênico altamente conservado que contém 37 genes, que codificam RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP (Clayton, 1984). A região de origem da replicação do DNAm_t, caracterizada pelo *displacement loop*, conhecido como *D-loop*, contém sequências altamente polimórficas. A taxa de evolução do *D-loop* é de duas a cinco vezes superior à dos genes mitocondriais que codificam proteínas e essa região é a mais variável do DNAm_t, apresentando a maior taxa de substituição de nucleotídeos, assim como a maior variação no número de sequências repetidas em tandem (200 - 4100 pb). Essas sequências são consideradas como as principais responsáveis pelas variações no tamanho do genoma mitocondrial de vertebrados (Moritz et al., 1987).

A característica da herança materna do DNAm_t permite que este seja usado como um marcador para estudos da funcionalidade de programas de repovoamento ao longo prazo. O uso do DNAm_t possibilitou verificar o grau de

sucesso reprodutivo e competitividade de populações de brook charr *Salvelinus fontinalis*, provenientes de estações de produção de alevinos introduzidos no meio ambiente (Danzmann et al., 1991).

Neste estudo, o sequenciamento da região do *D-loop* do DNA mitocondrial foi utilizado para descrever a variabilidade genética intra e inter populacional de amostras de *B. opalinus* provenientes de quatro tributários da bacia do Rio Paraíba do Sul.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragens das populações e extração de DNA

As amostras de nadadeira caudal de *Brycon opalinus* foram coletadas durante diferentes amostragens conduzidas pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo, armazenadas em álcool etílico a 95% e estocadas a -20°C. Posteriormente foram levadas para o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) / Núcleo Integrado de Biotecnologia/Universidade de Mogi das Cruzes), onde todos os procedimentos laboratoriais foram realizados. O total de 87 indivíduos da bacia do rio Paraíba do Sul foi amostrado (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1 Locais de coletas das amostras de nadadeira da espécie *Brycon opalinus* na bacia do Rio Paraíba do Sul

Rios	Município/Estado	Coordenadas	N
Itagaçaba	Areias/SP	22°39'S 44°45'O	20
Paraibuna	Paraibuna/SP	23°20'S 45°08'O	20
Preto	Visconde de Mauá/RJ	22°19'S 44°32'O	21
Santissimo	Santa Maria Madalena/RJ	21°56'S 41°58'O	26
Total			87

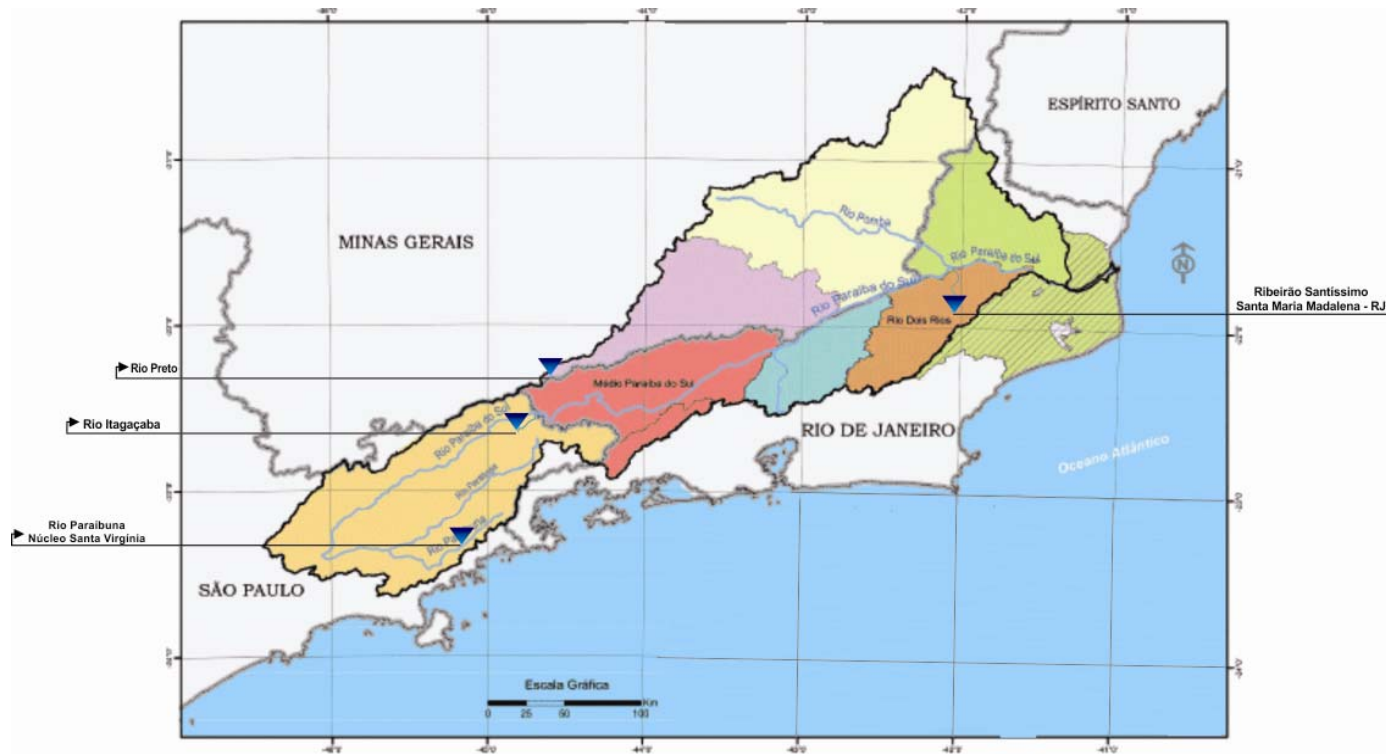


Figura 1 Rios da bacia do Paraíba do Sul em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais e indicações dos locais de amostragem

2.2 Extração de DNA

A extração do DNA total das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Taggart et al. (1992), modificado com a adição de tampão STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl e 0,001 M EDTA, pH 8,0) com concentração reduzida de EDTA. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio. A qualidade do DNA extraído foi avaliada por comparação com o marcador \square HindIII (Invitrogen[®]).

2.3 Análises das sequências da região do *D-loop* mitocondrial

As amplificações para obtenção da região do *D-loop* foram feitas pela reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”, PCR). Dois iniciadores foram utilizados dos quais, um foi desenhado no LAGOAA, específico para *B. opalinus*: BO_DLoop2-R (5’ GAGCATGTCACAACATATACACA 3’) e o outro desenhado para *Prochilodus lineatus*: F-TTF (5’ GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA 3’; Sivasundar et al., 2001).

As reações de PCR foram feitas com um mix de 1 μ M de cada iniciador, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 50-100 ng de DNA total, 5 μ l de tampão 10 \times Taq e volume de água para completar 50 μ l. As condições dos ciclos de amplificação do programa de gradiente de temperatura foram: denaturação inicial 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de denaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 54 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min com extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 0.8% e purificados usando kit (GFX[™]; GE Healthcare, São Paulo, Brazil).

O sequenciamento foi feito em uma única direção com o iniciador F-TTF (forward), usando BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil) pela empresa MacroGen Sequencing Service (MacroGen Inc., South Korea).

2.4 Análises Estatísticas

A qualidade das sequências e as sequências consensos foram feitas usando CodonCode Aligner 1.4.1 (2005). Todas as sequências consensos foram alinhadas usando ClustalX, versão 1.83 (Thompson et al., 1997) e otimizadas no Bioedit, versão 7.05.3 (Hall, 1999).

A variabilidade genética foi estimada usando os seguintes parâmetros: diversidades nucleotídicas (π) (Nei, 1987), diversidades haplotípicas (Hd) (Nei and Tajima, 1981) e número de sítios polimórficos (S) pelo programa DnaSP (Rozas et al., 2003).

A diversidade genética dentro e entre as populações amostradas foi hierarquicamente testada por análise molecular de variância (AMOVA; Excoffier et al., 1992) agrupando as amostras dentro de diferentes rios com 10.000 permutações para testar a significância da comparação entre pares das amostras. As amostras foram hierarquicamente divididas de acordo com sua proximidade geográfica, assim como, o rio as quais elas pertencem e os dados foram implementados no software Arlequin, versão 3.1 (Excoffier et al., 2005).

Os testes estatísticos D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997) foram estimados usando DNAsp (Rozas et al., 2003) e aplicados para testar a existência de pressão seletiva agindo sobre as substituições. Foi utilizado o método Neighbour-Joining (NJ) para construir uma árvore enraizada, usando o modelo de evolução nucleotídica Tamura-Nei, através do programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) para mostrar relação entre haplótipos.

3 RESULTADOS

O alinhamento final das sequências da região controle do DNAm, com 828 pares de bases de comprimento, obtidas das 87 amostras de quatro populações de *B. opalinus* analisadas (Rio Itagaçaba, Rio Preto, Rio Paraibuna e Ribeirão Santíssimo) gerou uma matriz de dados que definiu um total de 45 haplótipos (Tabela 2). Trezentos e trinta e um sítios polimórficos foram encontrados.

A média de bases nucleotídicas calculadas foi de 33,1% de adenina, 32,3% de timina, 14,1% de guanina e 20,5% de citosina, evidenciando a prevalência de AT na composição genética dessa região.

Do total de haplótipos obtidos (45), dois foram compartilhados entre populações e 43 são restritos, sendo 14 restritos à população do Rio Preto, 10 restritos ao Rio Paraibuna, 10 restritos ao Rio Itagaçaba e nove restritos ao Ribeirão Santíssimo. O haplótipo mais frequente estava presente em 17 indivíduos das populações do Rio Preto e do Ribeirão Santíssimo. A maior diversidade haplotípica (H_d) (0,976) foi encontrada no Rio Preto, onde foram encontrados 16 haplótipos, sendo 15 exclusivos para essa população. A menor diversidade haplotípica (0,720) foi encontrada no Ribeirão Santíssimo, onde 10 haplótipos foram evidenciados (Tabela 2).

A diversidade nucleotídica (π) (Tabela 2) dentro de cada população variou de 0,91% no Ribeirão Santíssimo a 9,2% no Rio Preto.

O teste estatístico D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) para os dados totais não mostraram desvio significativo da expectativa neutra das mutações para as populações estudadas ($D = -2,3267$; $P > 0,05$; $F_s = -2,12880$; $P > 0,05$), exceto quando testada a amostra separadamente. O Ribeirão Santíssimo revelou valor significativo ($P < 0,05$), $D = -2,418$ e $F_s = -3,38769$ (Tabela 2).

Tabela 2 Estatística descritiva a partir das sequencias do *D-loop* da espécie *Brycon opalinus*

Rios	N	Nº de haplótipos	Hd ± D.P.	π ± D.P.	Θ_s	Teste D de Tajima	Teste Fs de Fu
Itagaça	20	11	0,884 ± 0,067	0,0136 ± 0,004	0,28007	-2,141	-2,52201
Preto	21	16	0,976 ± 0,023	0,0184 ± 0,003	0,31782	-1,749	-1,87331
Santissimo	26	10	0,720 ± 0,099	0,0068 ± 0,002	0,17407	-2,418*	-3,38769*
Paraibuna	20	10	0,805 ± 0,090	0,0142 ± 0,004	0,28052	-2,058	-2,42191
Total	87	45 ¹	0,934 ± 0,016	0,0116 ± 0,002	0,35699	-2,3267	-2,12880

N: número de indivíduos sequenciados; Hd: Diversidade haplotípicas; π : diversidade nucleotídica;

Θ_s , parâmetro teta do S; * na coluna indica diferença ($P < 0,05$);

¹ Dois haplótipos são compartilhados entre populações

A árvore de haplótipos (Figura 2) mostra uma distribuição aleatória dos haplótipos dos diferentes locais de amostragem.

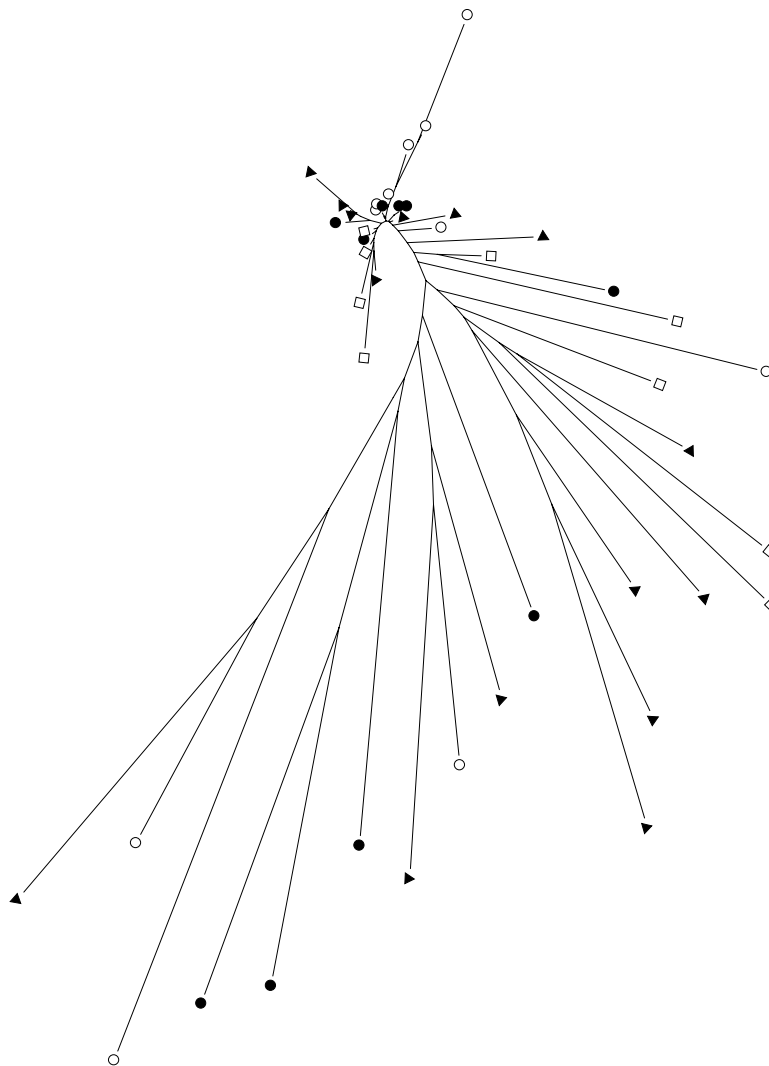


Figura 2 Árvore de Neighbour-joining mostrando a relação dos 45 haplótipos, usando o modelo de Tamura-Nei. Os locais de coleta dos haplótipos são identificados por: ○ - Rio Itagaçaba; ● - Rio Preto; □ - Ribeirão Santíssimo; ▲ - Rio Paraibuna

A comparação entre os valores F_{st} mostrou diferenças significativas entre todas as amostras (Tabela 3). O maior valor encontrado foi entre o Rio Paraibuna e o Ribeirão Santíssimo (0,31049), e o menor valor encontrado foi entre o Rio Itagaçaba e o Rio Preto (0,10989), refletindo a alta diferenciação das sequências dentro das populações.

Tabela 3 Valores de F_{st} entre os quatro locais de amostragem obtidos através das sequências do *D-loop* de *Brycon opalinus*

	Itagaçaba	Preto	Santíssimo	Paraibuna
Itagaçaba	-			
Preto	0,10989	-		
Santíssimo	0,27252	0,21972	-	
Paraibuna	0,20263	0,14908	0,31049	-

A análise molecular de variância mostrou que grande parte da variabilidade genética está concentrada dentro das populações (78,41%), com menor percentagem entre as populações (21,59%) (Tabela 4). O valor de Φ_{st} observado foi de 0,21593, indicando que a variação entre as populações é significativa. Quando a AMOVA foi feita a partir de dois conjuntos diferentes, separando as populações por localização geográfica, do Rio Preto e Ribeirão Santíssimo das populações do Rio Itagaçaba e Rio Paraibuna, nenhuma variação foi encontrada.

Tabela 4 Análise molecular de variância (AMOVA) para *Brycon opalinus*, considerando todas as populações como um único grupo

Fonte da variação	Componentes da variância	Porcentagem da variância (%)	Φ - estatística	<i>P</i> -value
Entre as populações	0,10759	21,02	$\Phi_{st}=0,21798$	< 0,05
Dentro das populações	0,39066	78,20		> 0,05

4 DISCUSSÃO

4.1 Aplicação do DNAm_t em estudos populacionais

O uso do DNAm_t para verificar a estrutura populacional em peixes tem se tornado muito comum. Neste estudo, 828 pares de base da região controle foram sequenciados para verificar possíveis variações dentro ou entre os locais amostrados. O tamanho do *D-loop* completo da espécie *B. opalinus* é maior que 828 pares de base, uma vez que no sequenciamento perdemos o início e o fim das sequências, mesmo que os iniciadores estejam antes ou após das sequências alvos.

Em um estudo feito por Lee et al. (1995), objetivou-se identificar a região mais apropriada para detectar variações haplotípicas intraespecíficas, em seis espécies de teleósteos, incluindo duas espécies de Ostariophysii: *Cyprinus carpio* e *Crossostoma lacustre*. Verificou-se que a primeira metade da região controle exibe altos níveis de substituição nucleotídicas, podendo ser muito utilizada em estudos de variação populacional intraespecíficas. Quando as sequências do *D-loop* de *B. opalinus* foram comparadas com a sequência de *D-loop* de *Dascyllus trimaculatus* (Perciformes; Chen et al., 2004), verificou-se

semelhança entre blocos de sequências conservados (CSB), como por exemplo os blocos CSB-D e CSB-3.

4.2 Diversidade genética nas populações selvagens

Neste estudo, as sequências da região do *D-loop* do DNAmT de populações de *B. opalinus* em diferentes tributários do Rio Paraíba do Sul foram analisadas. A análise molecular de variância indica que há diferenciação genética entre as populações, sugerindo que cada população deve ser tratada como um estoque geneticamente diferente. Este resultado está de acordo com Hilsdorf et al. (2002), utilizando DNAmT e também com Barroso et al. (2005), utilizando microssatélites. Em ambos os trabalhos, essa diferenciação entre as populações de *B. opalinus* foi observada.

O conhecimento dos efeitos da variabilidade genética em uma população de peixes é de fundamental importância para o entendimento de como essa diversidade está distribuída em uma espécie. Se a espécie apresenta diversidade contínua, qualquer área de sua distribuição é representativa da espécie, enquanto que, havendo estruturação, a representatividade de cada população terá que ser preservada.

A diversidade nucleotídica observada (1,16%) entre os 45 haplótipos é considerada alta, uma vez que *B. opalinus* tem distribuição restrita e é naturalmente endêmica. Hilsdorf et al. (2002) encontraram diversidade nucleotídica variando de 0,00 to 1,35%. Alta diversidade nucleotídicas também foram observadas em outras espécies de Characiformes, como *Colossoma macropomum* (Santos et al., 2007) da bacia amazônica, que tem diversidade variando de 1,10 a 1,12%, em *Leporinus elongatus* (Martins et al., 2003) variando de 1,78 a 7,70%, em *Prochilodus lineatus* (Sivasundar et al., 2001) variando de 0,3 a 36%, e em *Piaractus mesopotamicus* variando de 0,9 a 5,2% (Iervolino et al., 2010).

A diversidade haplotípica observada em todas as populações de *B. opalinus* foi alta ($0,934 \pm 0,016$). Quando comparamos as diversidades haplotípicas e nucleotídicas de amostras coletadas em 1997 e 1998 nos rios Itagaçaba e Paraibuna (Hilsdorf et al., 2002) com as amostras coletadas em 2009, observamos que houve um aumento na diversidade nucleotídica do Rio Itagaçaba (de 0,0028 para 0,0136) e também o aumento da diversidade haplotípica do Rio Paraibuna (0,600 para 0,805).

O teste de D de Tajima não foi significativo para nenhum das quatro populações indicando que as localidades estão em equilíbrio genético em relação aos haplótipos. O valor de F_s de F_u para a população do Ribeirão Santíssimo foi significativo, indicando que a localidade está em expansão populacional. Embora esses testes não tenham sido todos significativos, os valores negativos indicam que há um excesso de mutações recentes e os mesmos são indícios de crescimento populacional ou seleção (Tajima, 1989; Fu, 1997). O grande número de haplótipos únicos encontrados nestas populações corrobora esta hipótese, uma vez que um rápido crescimento populacional aumenta a retenção de novas mutações (Avice et al., 1994).

4.3 Implicações para conservação da espécie

Baseando-se nos resultados encontrados, podemos definir cada população coletada nos quatro tributários diferentes como unidades evolutivas (Moritz, 1994). Dessa forma, se torna imperiosa a manutenção dos estoques de reprodutores em bancos genéticos diferentes, evitando assim que adaptações e a estabilidade genética locais sejam perdidas. É necessário ainda que os cruzamentos durante a reprodução artificial sejam delineados tendo em vista essa diferenciação genética e o número mínimo de reprodutores necessários. O uso do estoque fundador de reprodutores para o programa de repovoamento

pode levar ao gargalo genético, conhecido também como efeito fundador, que é a perda de variabilidade genética ocorrida quando o estoque fundador é iniciado com pequeno número de indivíduos. Para se ter acima de 99% de variabilidade genética retida, o número de exemplares de estoque fundador tem que ser no mínimo de 50 indivíduos (Toledo Filho et al., 1992). Além disso, o número de fêmeas e machos deve respeitar a proporção de 1:1 para que número efetivo de reprodutores seja otimizado.

A decisão de repovoar ou não uma espécie de peixe deve levar em consideração o material genético já presente no local e as condições do ambiente onde o repovoamento será feito. Por exemplo, em um rio com poucos exemplares de uma espécie - causada pela pesca excessiva -, porém com mata ciliar e qualidade de água preservada, é possível que os indivíduos presentes naquele local possam manter ou ainda recuperar o tamanho da população local, sem que seja necessário aplicar técnicas de repovoamento e desde que sejam tomadas medidas para controlar a pesca,. De uma forma mais extrema, pode-se optar por repovoar com progênie obtida de reprodutores do próprio local, mantidos em cativeiros. Já em casos onde o ambiente está depauperado e a espécie já é considerada extinta, medidas como a recuperação do ambiente e repovoamento com material do próprio local ou ainda de outros locais se fazem necessárias.

A ictiofauna de água doce do Brasil é muito diversificada. Porém, a fragmentação e a degradação ambiental têm levado à extinção tanto da população, como de espécies inteiras. A legislação brasileira de proteção ao meio ambiente aquático compreende um conjunto de medidas que considera o repovoamento com alevinos e a construção de passagem de peixes como métodos para mitigar os impactos das barragens sobre os peixes do rio. Os programas de repovoamento com alevinos têm sido uma questão de importância em diferentes países (Philippart, 1995; Waples, 1999). Estudos têm sugerido que

a reprodução em cativeiro pode ter um impacto negativo sobre a reprodução natural e adequação de alevinos liberados no ambiente selvagem (Araki et al., 2007). Por outro lado, o uso de indivíduos criados em cativeiro para a reconstituição de estoques esgotados em alguns casos, aumentou a contribuição para pesca (Leber, 1999, Brannon et al., 2004).

Em conclusão, *B. opalinus* não pode ser tratada para fins de manejo como um único estoque na bacia do Rio Paraíba do Sul, tendo em vista o grau de diferenças genéticas entre as unidades evolutivas.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela FAPEMIG (APQ 2578-5.04/07 e APQ 5828-5.04/07), CESP/ANEEL (0061-017/2006) e CAPES (L.H. Orfão- bolsa de doutorado). Os autores agradecem à Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo e ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA) / Núcleo Integrado de Biotecnologia/Universidade de Mogi das Cruzes.

6 REFERÊNCIAS

- Araki, H., Cooper, B., Blouin, M., 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318, 100-103.
- Avise, J.C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, 551p.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello P.H., Traub-Cseko.W.Y., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*. 247, 51-65.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Mello, A.M., Guimarães, S.E.F., Cabello P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2003. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol.* 3, 297-298
- Beaumont, M.A., M.W. Bruford., 1999. Microsatellites in conservation genetics. In: Goldstein, D. & C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. New York, Oxford University Press, pp. 165-182
- Brannon, E.L., Amend, D.F., Cronin, M.A., Lannan, J.E., LaPatra, S., McNeil, W.J., Noble, R.E., Smith, C.E., Talbot, A.J., Wedemeyer, G.A., Wester, H., 2004. The controversy about Salmon hatcheries. *Fisheries* 29, 12-31.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S., 1994. A fauna de peixes brasileiros de água doce e o represamento de rios. In: COMASE. Seminário sobre a fauna aquática e o setor elétrico brasileiro; reuniões temáticas preparatórias. Foz de Iguaçu, Caderno 1: Fundamentos. Rio de Janeiro: Eletrobrás, 1994. p. 23-30.
- Brown, G.G., Gadaleta, G., Pepe, G., Saccone, C., Sbisà, E., 1986. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192, 503-511.
- Caramaschi, E.P., 1991. Levantamento da ictiofauna do Rio Paraíba do Sul e ciclo reprodutivo das principais espécies, no trecho compreendido entre Três Rios e Campo. UFRJ, Furnas Centrais Elétricas S.A., ENGEVIX, 273 P.

Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A., 2003. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, 372p.

Chen, C.A., Ablan, M.C.A., McManus, J.W., Bell, J.D., Tuan V.S., Cabanban, A. S., Shao K-T., 2004. Variable numbers of tandem repeats (VNTRs), heteroplasmy, and sequence variation of the mitochondrial control region in the threespot dascyllus, *Dascyllus trimaculatus* (Perciformes: Pomacentridae). Zool. Studies 43, 803-812.

Clayton, D.A. 1984. Replication of the animal mitochondrial DNA. Cell, 28, p. 639-705

Danzmann, R.G., Ihssen, P.E., Hebert, P.D.N., 1991. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. J. Fish Biol. 39, 69-77

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479-491.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinformatics Online 1, 47-50.

Fausch, K.D., Lyons, J., Karr, J.R., Angermeir, P. L., 1990. Fish communities as indicators of environmental degradation, in: Marshall Adams, S. (Eds), Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society, New York, pp. 123-144.

Fu, Y.-X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147, 915-925.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Sym. Ser. 41, 95-98.

Hilsdorf, A.W.S., Petrere Jr. M., 2002. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. Ciência-Hoje 30, 62-65.

Hilsdorf, A.W.S., Espin A.M.A., Krieger M.H., Krieger, J.E., 2002. Mitochondrial DNA diversity in wild and captivity population of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) in the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture* 214, 81-91.

Iervolino, F., Resende, E.K., Hilsdorf, A.W.S., 2010. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) population in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research* 101, 27-31.

Leber, K.M., 1999. Rationale for an experimental approach to stock enhancement. In: Howell, B.R., Moksness, E., Svasand, T. (Eds) *Stock enhancement and sea ranching*, pp. 63-75. Oxford: Fishing News Book, Blackwell Science Ltd.

Lee, W.-J., Conroy, J., Hunting Howell, W., Kocher, T.D., 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Mol. Evol.* 41, 54-66.

Lima, F.C.T., 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras), p.174-181. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris-Jr, C.J. (Eds). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, EDIPUCRS. 729p.

Martins, C., Wasko, A.P., Oliveira, C., Foresti, F., 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genet. Mol. Biol.* 26, 33-38.

Moritz, C., 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Mol. Ecol.* 3, 401-411.

Moritz, C., Brown, W.M., 1987. Tandem duplication in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* v. 84, p. 7183-7187.

Nei, M., Tajima, F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97, 145-163.

Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

O'Brien, S.J. 1994. A role of molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91: 5748-5755.

Pelicice, F. M., Agostinho, A. A. 2008. Fish-Passage Facilities as Ecological Traps in Large Neotropical Rivers. *Cons. Biol* 22, 180-188.

Philippart, J.C., 1995. Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biol. Cons.* 72, 281-295.

Rosa, R.S., Lima, F.C.T., 2008. Os peixes ameaçados de extinção, in: Machado, A.B.M., Drummond G.M., Paglia A.P. (Eds), Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, Brazil, pp. 9-285.

Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messenguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497

Santos, M.C.F., Ruffino, M.L., Farias, I.P., 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *J. Fish Biol.* 71, 33-44.

Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10, 407-417.

Taggart, J.B., Hynes R.A., Prodohl, P.A. e Fergusson. A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40, 963-965.

Tajima, F., 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596- 1599.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-488

Toledo-Filho, S.A., Almeida-Toledo, L.F. Foresti, F., Galhardo, E., Donola, E., 1992. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. *Cadernos de Ictiologia* 1, 39 p.

Waples, R.S., 1999. Dispelling some myths about hatcheries. *Fisheries* 24, 12-21.

Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira C., Senhorini J. A., Foresti F., 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. App. Ichthy.* 20, 4-52

**ARTIGO 2 EXTENDER COMPOSITION, OSMOLALITY AND
CRYOPROTECTANT EFFECTS ON MOTILITY OF
SPERM IN THE BRAZILIAN ENDANGERED SPECIES
Brycon opalinus (CHARACIFORMES)**

Preparado de acordo com as normas e submetido na revista Aquaculture

ABSTRACT

ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes) In: __. **Variabilidade genética e criopreservação de sêmen objetivando a formação de um banco de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 120p., p. 56-86. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Sperm preservation is an important tool for conservation of endangered fish species, such as the *Brycon opalinus* (Characiformes). An optimum medium should prevent the initiation of sperm motility during storage. The aim of this paper was to study the effects of extender composition, osmolality and cryoprotectant agent (CPA) on the motility of *B. opalinus* sperm after a 30-min equilibration time. Eight media were prepared by switching extender compositions (NaCl or glucose) and osmolalities (245, 285, 325 or 365 mOsm/kg). These media were then divided in three aliquots and combined with two CPAs (dimethyl sulfoxide, DMSO, or methylglycol, MG) at 1.4 M; the third aliquot remained without CPA (control). After dilution, all samples were observed under light microscope to confirm whether all extender-CPA combinations actually prevented the initiation of sperm motility. Then, sperm motility was triggered in NaCl 92 mOsm/kg as activating agent after 0- and 30-min equilibration time at 4 °C and the percentage of motile sperm and duration of motility were determined. All combinations of glucose or NaCl media at high osmolalities (325 and 365 mOsm/kg), completely suppressed the initiation of sperm motility. Low extender osmolalities (245 mOsm/kg), however, did not prevent the initiation of sperm motility and more than 50% of sperm diluted in

* Comitê Orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora); Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA (Co-Orientador);

all combinations of glucose media, NaCl-control and in NaCl-DMSO were motile.

When motility was triggered after both 0- and 30-min equilibration times, more than 77% motile sperm were observed in all combinations of NaCl and glucose media, except for glucose 245-DMSO and glucose 285-DMSO. The duration of motility in sperm diluted in all media was above 40 s, except for glucose 245-DMSO. Based on these findings, we can conclude that the initiation of sperm motility is triggered by low osmolality rather than the ionic composition of the surrounding medium in *B. opalinus*. Glucose or NaCl solutions at high osmolalities combined with either DMSO or MG prevent the initiation of sperm motility during storage. Sperm diluted in these media yields motility upon activation above 77% and that should last long enough to fertilize oocytes. These media are recommended as freezing media for future essays in cryopreservation of *B. opalinus* sperm.

RESUMO

ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A.T.M. Efeitos da composição e osmolalidades dos diluidores e crioprotetores na motilidade do sêmen da espécie brasileira ameaçada *Brycon opalinus* (Characiformes) In: _____. **Variabilidade genética e criopreservação de sêmen objetivando a formação de um banco de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 120p, p. 56-86. Teses (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A preservação do sêmen é uma importante ferramenta para a conservação das espécies de peixes ameaçadas de extinção, como a espécie *Brycon opalinus* (Characiformes). O meio ideal para congelamento deve impedir o início de motilidade espermática durante o armazenamento. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da composição dos diluidores, das osmolalidades e dos crioprotetores (CPA) sobre a motilidade espermática de *B. opalinus* após um período de equilíbrio de 30 min. Oito meios foram preparados combinando composições dos diluidores (NaCl ou glicose) e osmolalidades (245, 285, 325 e 365 mOsm/kg). Estes meios foram então divididos em três alíquotas e combinados com dois CPAs (dimetil sulfóxido, DMSO ou metilglicol, MG) em 1,4 M, a terceira alíquota permaneceu sem CPA (controle). Após a diluição, as amostras foram observadas em microscópio de luz para confirmar se todas as combinações diluidor-CPA realmente impediram o início da motilidade dos espermatozóides. Em seguida, a motilidade espermática foi ativada em NaCl 92 mOsm/kg como ativador, após 0 e 30 min de tempo de equilíbrio a 4 °C e a porcentagem de espermatozóides móveis e duração da motilidade foram mensurados. Todas as combinações de glicose e NaCl em osmolalidades altas (325 e 365 mOsm/kg), inibiram a iniciação da motilidade espermática. A baixa osmolalidade (245 mOsm/kg), porém, não impediu o início da motilidade

* Comitê Orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora); Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA (Co-Orientador);

espermática e mais de 50% dos espermatozóides diluídos em todas as combinações de glicose, NaCl-controle e em NaCl-DMSO foram móveis. Quando a motilidade foi ativada após 0 e 30 min de tempo de equilíbrio, mais de 77% de espermatozóides móveis foram observadas em todas as combinações de NaCl e glicose, com exceção de glicose-245-DMSO e glicose-285-DMSO. A duração da motilidade no sêmen diluído em todos os meios foi superior a 40 s, com exceção de glicose-245-DMSO. Com base nestes resultados, podemos concluir que a iniciação da motilidade dos espermatozóides é desencadeada pela baixa osmolaridade e não pela composição do meio em sêmen de *B. opalinus*. As soluções de glicose ou NaCl em altas osmolalidades combinadas com DMSO ou MG são capazes de prevenir a iniciação da motilidade espermática. Sêmen diluído nesses meios produziu motilidade após ativação acima de 77% e com duração suficiente para fertilizar ovócitos. Estes meios são recomendados como meios de congelamento para futuros ensaios em criopreservação de sêmen *B. opalinus*.

1 INTRODUCTION

The *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), known as pirapitinga-do-sul in Brazil, belongs to the order Characiformes, family Characidae and subfamily Bryconinae, is native to the Paraíba do Sul and Doce River basins in Brazil (Rosa and Lima, 2008). Changes in the river stream, urbanization, pollution and hydroelectric dams are some of the reasons why the status of *B. opalinus* is currently set as endangered. The genus *Brycon* is highly affected by environmental changes, and many species are in the red list of Brazilian threatened fauna, such as piracanjuba *B. orbignyanus*, tiete tetra *B. insignis* and pirapitinga *B. nattereri* (Rosa and Lima, 2008). Because species of the genus *Brycon* can easily adapt to captivity and commercial food, grow fast, in addition to serving as human food source, many species are exploited in commercial fisheries and in fish farming (Narahara et al., 2002 and Zaniboni-Filho et al., 2006). Based on this, *B. opalinus* may also become a new species potentially interesting for future human consumption, as happened with some fish communities, such as red snapper *Lutjanus argentimaculatus* in Southeast Asia and Australia (Vuthiphandchai et al., 2009), eurasian perch *Perca fluviatilis* in European countries (Boryshpolets et al., 2009) and dusky grouper *Epinephelus marginatus* in many areas of the European Atlantic coast and in the Mediterranean Sea (Glamuzina et al., 2000). Furthermore, because *B. opalinus* is endemic of headwater streams of the Paraíba do Sul and Doce River basins, this specie can be used as a model to indicate environmental conditions, since the relative health of a fish community is a sensitive indicator of direct and indirect stresses on the entire aquatic ecosystem (Fausch et al., 1990).

Most of fish spermatozoa are immotile in the seminal tract and hyposmotic media initiate sperm motility from freshwater fish species (Morisawa and Suzuki, 1980). Besides osmolality, pH, temperature, and ions

concentration affect sperm motility (Alavi and Cosson, 2006 and Alavi et al., 2006). Studies regarding the effects of these factors on the induction of sperm motility are necessary to establish standard activating agent (those medium that triggers motility) and immobilizing media (those medium that prevents the initiation of sperm motility) for improving both artificial fertilization and preservation techniques (Alavi et al., 2009a). In Characiformes species, only three studies describe the effects of osmolality on sperm motility. In *B. orbignyanus*, motility was induced when sperm was diluted in a medium at 240 mOsm/kg but not in media ranging from 285 to 429 mOsm/kg (Maria et al., 2006a). The media tested, however, possessed not only different osmolalities but also different compositions, thus conclusions regarding osmolality only could not be drawn. In matrinchã *Brycon orthotaeniae* sperm was diluted in NaCl solutions ranging from 25 to 200 mM (~ 46 to 368 mOsm/kg). The initiation of sperm motility was completely suppressed when NaCl at 150 mM (~ 276 mOsm/kg) or higher was used (Melo and Godinho, 2006). In a similar study, *B. insignis* sperm was diluted in NaCl solutions ranging from 0 to 547 mOsm/kg and the initiation of sperm motility was suppressed when NaCl at 410 mOsm/kg or higher was used (Shimoda et al., 2007). These studies suggest that sperm motility in Characiformes (at least in species of the genus *Brycon*) is triggered in hyposmotic medium, and that the minimum osmolality to suppress the initiation of sperm motility is different among species. A non-ionic medium in different osmolalities, however, has not yet been tested in similar experiments as activating and/or immobilizing medium in species of this order.

The aim of the present paper was to study the effects of extender composition (ionic and non-ionic), osmolality and cryoprotectant agent (CPA) on the motility of *B. opalinus* sperm after a 30-min equilibration time at 4°C. The extenders were evaluated by switching compositions (NaCl or glucose) and osmolalities (245, 285, 325 or 365 mOsm/kg). Because we plan to test these

media in future essays on sperm cryopreservation, the CPAs that are mostly used in Characiformes, dimethyl sulphoxide (DMSO) and methylglycol (MG), were added to each of these media. Furthermore, semen volume, concentration, total number of spermatozoa, pH, motility and duration of motility of fresh sperm, and seminal plasma osmolality were determined and possible correlations among these parameters were evaluated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. Fish handling and sperm collection

All fish were handled in compliance with the guidelines for animal experimentation described by Van Zutphen et al. (1993). *Brycon opalinus* broodfish were captured from the wild (Paraíba do Sul River basins) some years ago, and maintained in circular tanks at the Hydrobiology and Aquaculture Station of the Hydroelectric Company of São Paulo (CESP) in Paraíbuna (23°23'10"S; 45°39'44"W), São Paulo, Brazil, during the spawning season in October and November. Males with detectable running sperm under soft abdominal pressure received a single intramuscular dose of carp pituitary extract (cPE; Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at 5 mg/kg body weight to increase semen volume and decrease viscosity, as a routine method for Characiformes (Viveiros and Godinho, 2009). After 8 hours at ~ 25 °C, the urogenital papilla was carefully dried and sperm was hand stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (~ 22 °C), and soon after collection, the tubes containing sperm were placed in crushed ice (4 ± 2 °C).

2.2. Determination of semen characteristics

Immediately after collection, 5 μ L of each sample was placed on a glass slide and observed using a light microscope (Model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at 400 x magnification. Any sperm motility observed was considered as premature induction of motility caused by urine or water contamination and the sample discharged. In immotile samples (n = 29 males), 25 μ L activating agent, composed of NaCl 92 mOsm/kg (50 mM), was placed in the same glass slide at a final dilution ratio (volume/volume) of 1:5 (sperm: activating agent), following the methodology used as routine in our laboratory for Characiformes fish species (Maria et al., 2006a; Maria et al., 2006b; Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2009; Nascimento et al., 2010; Viveiros et al., 2010). Because sticking of sperm to glass slide has not been observed in Characiformes species, the addition of BSA or any other protein in the activating agent is unnecessary. Immediately after, motility was subjectively scored under light microscope as the percentage of spermatozoa showing progressive motility, in increments of 10%. All sperm samples used in this experiment possessed at least 80% motile sperm upon activation. Duration of motility was assessed on the same conditions: a stopwatch was triggered at the time of activating agent addition and stopped when 10% of the spermatozoa were still moving, and presented as seconds (s). Semen volume, concentration (hemacytometer/ Neubauer chamber, Boeco, Hamburg, Germany), total number of spermatozoa (concentration x volume) and pH (pH/mV meter pH 21 Hanna, Hanna Instruments, Rhode Island, United States) were also determined. The osmolality of the seminal plasma was measured cryoscopically (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany) after centrifugation of sperm at 2000 g for 30 min at room temperature. Semen characteristics of all samples were evaluated by the same technician and at room temperature (~ 22 °C).

2.3. Extender component, osmolality and CPA

All chemicals were obtained from Vetec Química Fina Ltda™ (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Eight media comprising combinations of an ionic (NaCl) or non-ionic (glucose) extender, in four osmolalities (245, 285, 325 and 365 mOsm/kg) were prepared. The extender osmolalities were also measured cryoscopically. Then each medium was divided in three and combined with the two CPAs mostly used for Characiformes sperm: DMSO and MG, at 1.4 M (Viveiros and Godinho, 2009) at 1.4 M. The third aliquot of each media remained without CPA and served as control. Each of the 24 media were placed in 20-mL beakers, and cooled at 4 ± 2 °C in a styrofoam box containing crushed ice for 30 min to equilibrate.

Sperm from each male was diluted 1:10 (sperm:total volume) in each medium (8 males x 24 media). Immediately after dilution, samples were observed under light microscope to confirm whether all extender-CPA combinations would prevent the initiation of sperm motility. If motility was observed, the percentage of motile sperm was annotated. Then sperm motility was triggered in the same NaCl 92 mOsm/kg as activating agent (volume/volume; 1:5), and the percentage of motile sperm and duration of motility were determined (expressed as equilibration time = 0 min). Because we plan to use the best extender-CPA combination as freezing media in future essays on cryopreservation, sperm was stored for 30 min at 4 ± 2 °C and evaluated again for the percentage of motile sperm and duration of motility upon activation (expressed as equilibration time = 30 min). The 30-min equilibration time represents the lag period necessary for the CPA permeation into the cells for protection against cryoinjuries and for sperm manipulation for freezing (dilution, loading and sealing straws, etc). This experiment was carried out with eight replicates (1 replicate = 1 male).

2.4. Statistical analyses

Possible relationships among semen volume, concentration, total number of spermatozoa, pH, percentage of motile sperm and duration of motility of fresh sperm, and seminal plasma osmolality were analyzed by Spearman's rank correlation ($P < 0,05$).

Percentage of motile sperm and duration of motility were expressed as mean \pm SEM and analyzed by the R computational program (version 2.9.0; R Development Core Team, 2007). A factorial design (2 extender compositions x 4 osmolalities x 3 CPAs) was used to investigate the effects of extender compositions, osmolality and CPA on sperm motility. The premature initiation of sperm motility cause by some extender-CPA combinations (percentage of motile sperm) was analyzed by nonlinear regression, using an exponential model. Motility triggered in activating agent (percentage of motile sperm and duration of motility) were analyzed by linear regression. Because data set showed normal distribution, there was no need for transformation. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05.

3 RESULTS

3.1. Semen characteristics and correlations

The observed values for each characteristic of fresh semen and osmolality of seminal plasma evaluated in this study are presented on Table 1. The correlation matrix of these semen characteristics is depicted on Table 2. The highest correlations were observed between semen volume and sperm concentration ($R = -0.723$; $P < 0.05$) and between semen volume and total number of spermatozoa ($R = 0.814$; $P < 0.05$).

Table 1. Fresh sperm characteristics of *Brycon opalinus*

Parameters	Number of males	Mean \pm SEM	Range
Motility sperm upon activation (%)	29	94 \pm 1.	80 - 100
Duration of motility (s)	29	99 \pm 2	80 - 120
Semen volume (mL)	29	7.7 \pm 0.8	2 - 15
Concentration (spermatozoa $\times 10^9$ /mL)	29	60.3 \pm 3.2	32 - 96
Total number of spermatozoa ($\times 10^9$)	29	435 \pm 40	162 - 767
Semen pH	25	8.3 \pm 0.1	8.0 - 8.6
Seminal plasma osmolality (mOsm/kg)	18	318 \pm 3	297 - 340

Table 2. Correlation matrix (Spearman's coefficient) of fresh sperm characteristics of *Brycon opalinus* (n = 18 males)

	Motility rate	Motility duration	Semen volume	Concentration	Total spermatozoa	Semen pH	Seminal plasma osmolality
Motility sperm	1.000						
Duration of motility	0.100	1.000					
Semen volume	0.365	-0.019	1.000				
Concentration	-0.553	0.133	-0.723*	1.000			
Total spermatozoa	0.002	0.036	0.814 *	-0.246	1.000		
Semen pH	0.120	-0.491	-0.015	-0.196	0.220	1.000	
Seminal plasma osmolality	0.308	0.034	-0.094	0.190	-0.049	0.179	1.000

* $P < 0.05$

3.2. Extender component, osmolality and CPA

To confirm whether all of the 24 extender-CPA combinations actually prevented the initiation of motility, diluted sperm was immediately observed under light microscope (Fig. 1). All combinations of glucose or NaCl media at higher osmolalities (325 and 365 mOsm/kg) prevented the initiation of sperm motility. However, extender at low osmolality (245 mOsm/kg) induced motility in 53 to 61% sperm in all combinations of glucose and NaCl, except for NaCl-MG (16%). At 285 mOsm/kg, motility was induced in 34 to 46% sperm diluted in NaCl-control and NaCl-DMSO and in 10 to 16% sperm diluted in NaCl-MG and in all combinations of glucose.

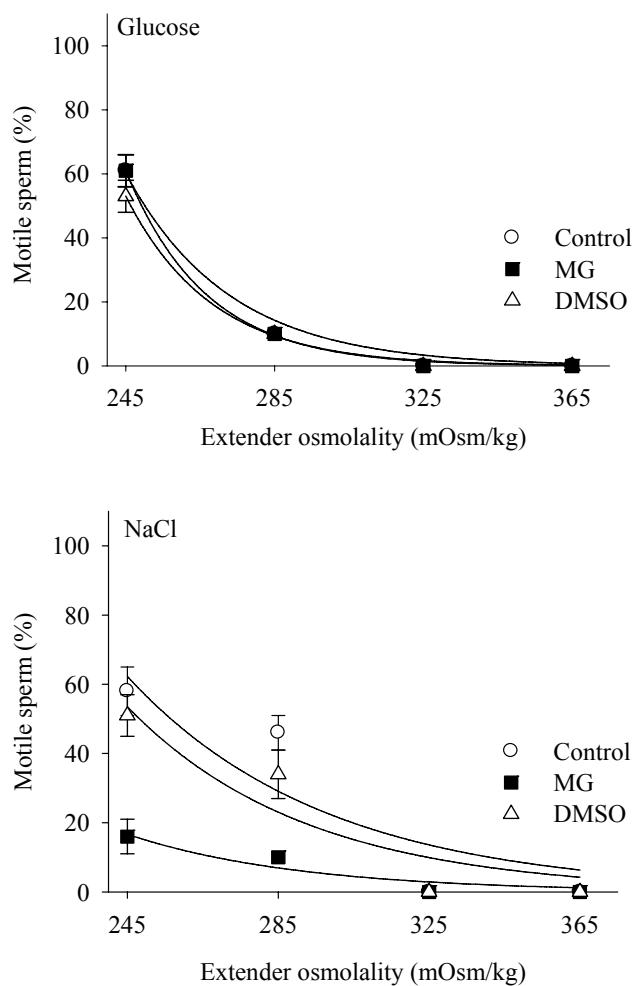


Figure 1. Effects of extender composition (glucose on the top, NaCl on the bottom), osmolality and cryoprotectant (methylglycol, MG = closed squares, DMSO = open triangles, control without cryoprotectant = open circles) on the initiation of sperm motility (%) of *Brycon opalinus*. Each dot and error bar represents mean \pm SEM of eight males and each line represents the predicted value after nonlinear regression analysis ($R^2=0.5728$)

The percentage of motile sperm upon activation was subjectively evaluated after 0- and 30-min equilibration time in each of the 24 media (Fig. 2). Immediately after dilution (0-min equilibration time) in glucose 245 mOsm/kg, motility was lower (21% motile sperm) in DMSO, and higher (83 to 96%) in MG and control. At 285 mOsm/kg, motility was again lower (68%) in DMSO, and higher (95 to 98%) in MG and control. At higher osmolalities, 93 to 99% motile sperm was observed in all combinations of glucose regardless the addition of DMSO or MG. In NaCl media, 80 to 100% motile sperm was observed in all extender osmolalities and regardless the addition of DMSO or MG. After a 30-min equilibration time at 4°C, again the medium glucose-DMSO yielded the lowest motility at both 245 (38%) and 285 mOsm/kg (51%). When sperm was diluted in glucose-MG and in glucose-control, 82 to 95% motile sperm was observed regardless the extender osmolality. In NaCl media, 70 to 95% motile sperm was observed in all extender osmolalities and regardless the addition of DMSO or MG.

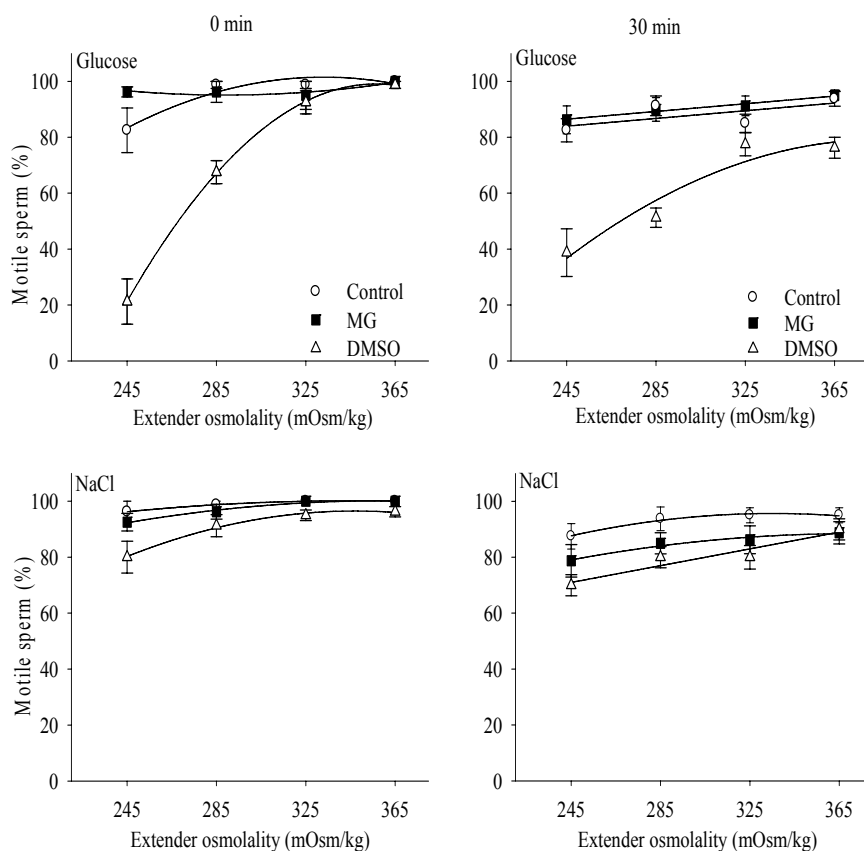


Figure 2. Effects of extender composition (glucose at the top, NaCl at the bottom), osmolality and cryoprotectant (methylglycol, MG = closed squares, DMSO = open triangles, control without cryoprotectant = open circles) on the percentage of motile sperm upon activation of *Brycon opalinus*. Motility was triggered after 0- and 30-min equilibration times at 4°C in each media. Each dot and error bar represents mean \pm SEM of eight males and each line represents the predicted value in regression analyzes ($R^2 = 0.9396$)

The duration of motility upon activation was evaluated after 0- and 30-min equilibration time in each of the 24 media (Fig. 3). Immediately after dilution (0-min equilibration time) in glucose-DMSO, duration of motility was shorter at 245 mOsm/kg (18 s) compared to higher osmolalities (33 to 49 s). When sperm was diluted in glucose-MG and glucose-control, the duration of sperm motility ranged from 44 to 69 s. In NaCl media, the duration of sperm motility ranged from 40 to 47 s in DMSO, 47 to 60 s in MG and 57 to 74 s in control. After a 30-min equilibration time at 4 °C, again the medium glucose-DMSO yielded the shortest duration of motility at 245 mOsm/kg (20 s), compared to higher osmolalities (41 to 45 s); in glucose-MG and glucose-control, duration of motility was similar and ranged from 46 to 61 s. In NaCl media, the duration of sperm motility ranged from 42 to 62 s in DMSO, 57 to 65 s in MG and 61 to 72 s in control

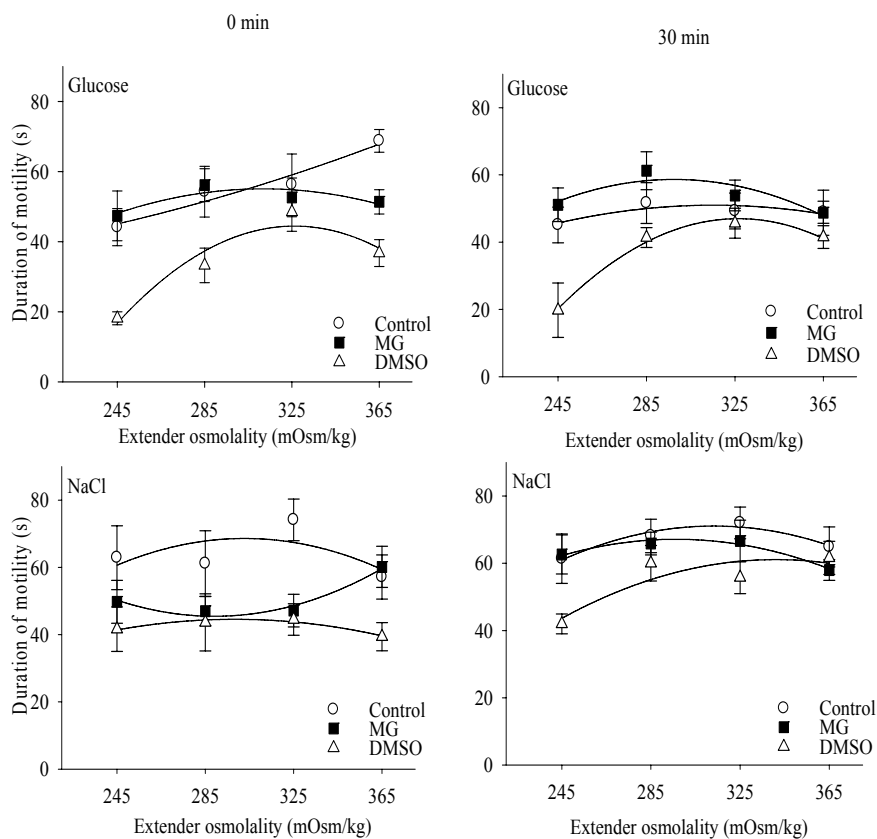


Figure 3. Effects of extender composition (glucose at the top, NaCl at the bottom), osmolality and cryoprotectant (methylglycol, MG = closed squares, DMSO = open triangles, control without cryoprotectant = open circles) on the duration of sperm motility upon activation of *Brycon opalinus*. Motility was triggered after 0- and 30-min equilibration times at 4°C in each media. Each dot and error bar represent mean \pm SEM obtained with eight males and each line represents predicted value in regression analysis ($R^2 = 0.3968$)

4 DISCUSSION

In the present study, 24 media comprising combinations of extender compositions, osmolalities and CPAs were tested in their capacity of storing *B. opalinus* sperm for 30 min at 4 °C without reducing the percentage of motile sperm and duration of motility. Furthermore, we showed that some extender-CPA combinations induced the initiation of sperm motility, while other combinations suppressed motility during storage. This is the first report on the sperm response to ionic and osmolality effects of *B. opalinus*.

4.1. Fresh sperm characteristics

Fresh sperm of *B. opalinus* was assessed after hormonal treatment with carp pituitary extract. Semen volume (7.7 mL), sperm pH (8.3) and seminal plasma osmolality (318 mOsm/kg) for the males utilized in this study were all within the range observed for fresh sperm of others species of Characiformes (Viveiros and Godinho, 2009). Sperm concentration (60.3×10^9 spermatozoa/mL), however, was one of the highest values compared to other Characiformes which ranges from 4.4×10^9 spermatozoa/mL in *Leporinus macrocephalus* to 37.7×10^9 spermatozoa/mL in *Piaractus mesopotamicus* (Viveiros and Godinho, 2009).

A strong negative correlation was observed between semen volume and sperm concentration. After hormone treatment to induce spermiation, the first observed event is the testicular hydration which leads to an increased volume of extracted semen and a dilution of spermatozoa (Viveiros et al., 2002). This is the reason why reduced semen volume and increased sperm concentration is frequently reported in fish stripped without hormone treatment, compared to fish of the same species stripped after hormone treatment (Viveiros and Godinho,

2009). On the other hand, a strong positive correlation between semen volume and total number of spermatozoa was observed. Increasing semen volume, even at a low sperm concentration, leads to an increase in the total number of spermatozoa of the extracted semen in this fish species.

B. opalinus fresh sperm possessed 94% motile sperm and 99 s duration of motility. In other species of the genus *Brycon*, fresh sperm possesses 56 to 100% motile sperm and 33 to 56 s duration of motility (Viveiros and Godinho, 2009). A better knowledge of the characteristics of fresh sperm motility before manipulation is necessary to evaluate sperm quality in commercial hatcheries before artificial reproduction and in laboratories before experiments. Preliminary examination of fresh sperm is often carried out in order to discard contaminated samples exhibiting premature initiation of sperm motility due to contamination with water or urine (Viveiros and Godinho, 2009). In some studies with carp sperm, it was shown that distilled water or urine contamination lead to decrease of sperm motility parameters (percentage, velocity and beat frequency), a decrease in ATP content of spermatozoa (Perchee-Poupard et al., 1998) and changes in spermatozoa morphology (Perchee-Poupard et al., 1996).

4.2. Initiation of sperm motility after dilution in different extender-CPA combinations

Environmental factors such as ions and osmolality stimulate the initiation of sperm motility by changing the properties of the plasma membrane (Morisawa, 1985; Morisawa et al., 1999 and Krasznai et al., 2000). In the present study, however, extender composition (ionic NaCl and non-ionic glucose) did not affect the initiation of sperm motility in *B. opalinus*, as observed in barbel *Barbus barbus* (Alavi et al., 2009b). Osmolality, as expected, had a pronounced effect. Both glucose and NaCl media at 245 and 285

mOsm/kg induced motility. These osmolalities are hyposmotic compared to seminal plasma (318 mOsm/kg). Thus, as observed for *C. carpio* (Cosson et al., 1991) and perch *Perca fluviatilis* (Alavi et al., 2007; Lahnsteiner et al., 1995), initiation of sperm motility of *B. opalinus* occurs when osmolality of the surrounding medium is lowered, while hyperosmotic medium prevents the initiation of motility. Therefore, in order to store sperm of *B. opalinus*, we recommend the use of a medium at an osmolality of 325 mOsm/kg or higher.

When CPAs were added to extenders at low osmolalities (245 and 285 mOsm/kg), the global osmolality of the surrounding medium was increased. Although we could not measure this increase because our osmometer measures osmolality by freezing point depression of the solution and this is not possible when CPAs are added to the solution, we calculated the global osmolality. Osmolality increased from 245 to 1525 and to 1559 mOsm/kg, and from 285 to 1565 and to 1599 mOsm/kg, after the addition of DMSO and MG, respectively. The initiation of sperm motility, however, was not suppressed by such increase of global osmolality. It has been shown that the addition of DMSO activates striped bass *Morone saxatilis* sperm kept quiescent in extenders (He and Woods, 2003). In *C. carpio* sperm, a swelling following the addition of DMSO at 1 to 20% (approximately 400 to 3200 mOsm/kg) has been observed possibly caused by an influx of water (Perchec-Poupard et al., 1997). In the present study, DMSO was used at 1.4 M (1280 mOsm/kg), which represents approximately 10% in weight/volume of the total solution. This value is within the range of 1 to 20% observed for carp sperm. It is possible that a similar water influx after DMSO addition has occurred and triggered sperm motility, despite the increase of the global osmolality. No similar study has been carried out using MG as CPA; however, due to such similarity of the results, it is possible that the same mechanism of water influx occurred.

4.3. Motility of diluted sperm upon activation

There was no effect of extender composition (ionic NaCl and non-ionic glucose) on the percentage of motile sperm upon activation after 0- and 30-min equilibration time at 4 °C. Sperm diluted in a non-ionic (glucose-control) or in an ionic (NaCl-control) media yielded similar motility which ranged from 82 to 100%. These results are consistent with those observed in zebrafish *Danio rerio* (Wilson-Leedy et al., 2009) and in Northern pike *Exos lucius* L. (Alavi et al., 2009a), for which no difference on sperm motility was observed after dilution in NaCl or sucrose solution.

When CPAs were added, the percentage of motile sperm upon activation was significantly affected by the combination of low osmolality glucose media and DMSO. At both 0- and 30-min equilibration time, the lowest percentage of motile sperm (21 to 38%) was achieved when sperm was diluted in glucose 245-DMSO medium. At the same low osmolality (245 mOsm/kg), sperm diluted in glucose-MG, NaCl-MG or NaCl-DMSO yielded motility above 70%. After 30-min equilibration time at higher osmolalities (325 and 365 mOsm/kg), motility of sperm diluted in glucose-DMSO increased to ~77%, but these values were still lower than that observed for sperm diluted in glucose-control (85 and 93%) and in glucose-MG (91 to 93%). It is interesting to note that glucose is added to an aqueous solution not only to increase the osmolality of the surrounding medium, but also because of its stabilizing effects on the spermatozoa liposomal membrane during storage (Quinn, 1985). Glucose is commonly used at the concentration of 5% (which is ~ 277 mOsm/kg) and in combination with DMSO, as freezing medium for sperm of many neotropical fish species (Viveiros and Godinho, 2009). According to our results, motility triggered 30 min after dilution (which means just before freezing) would be 40 to 50%; after thawing, even lower percentage of motile sperm would be expected. Our

research group compared the use of glucose 277 mOsm/kg combined with DMSO or MG as freezing medium of *B. nattereri* (Oliveira et al., 2007), streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al., 2009) and pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Nascimento et al., 2010). In all studies, post-thaw sperm quality was significantly higher when glucose was combined with MG compared to DMSO. It is possible, however, that DMSO combined with glucose at higher osmolalities (such as those tested in the present study) would provide better results.

Another point that merits attention is the fact that, although all extenders at 245 mOsm/kg induced motility in some spermatozoa (Fig. 1), motility could still be triggered upon activation 30 min later. It would be expected that motile sperm (10 to 61%) would run out of energy (ATP) within few minutes and sperm would be permanently immotile. But, in the contrary, motility (39 to 95%) could still be triggered in all samples 30 min after the first induction. It is possible that *B. opalinus* spermatozoa have the ability of reactivation as it has been reported for *C. carpio* (Perchee et al., 1995) and trout *Oncorhynchus mykiss* sperm (Christen et al., 1987). A transient lack of energy and its recovery is one possible explanation, but osmotic reequilibration could occur in *B. opalinus* sperm during this 30-min equilibration period. This could reestablish an internal ionic concentration compatible with a correct motility activation rate. A similar situation was observed for *C. carpio* sperm (Redondo et al., 1991). More experiments specially designed for studies on reactivation of *B. opalinus* sperm are however necessary.

4.4. Duration of sperm motility upon activation

There was no effect of extender components (ionic NaCl and non-ionic glucose) on the duration of sperm motility after 0- and 30- min equilibration

time at 4 °C. Duration of motility ranged from 44 to 69 s in glucose-control medium, and from 61 to 74 s in NaCl-control medium.

When CPAs were added, duration of sperm motility was affected by DMSO mainly in combination with glucose at low osmolality. The shortest duration of motility was observed when glucose 245-DMSO (18 and 20 s) was obtained as medium, compared to glucose-DMSO at other osmolalities and glucose-MG at all osmolalities, after both 0- and 30-min equilibration times. When NaCl was tested, the shortest duration of sperm motility was also obtained when the combination of low osmolality and DMSO (42 s) was used, but only after 30-min equilibration. In *B. orthotaenia*, fresh sperm was diluted in NaCl 200 mM (~ 368 mOsm/kg) combined with DMSO; the duration of motility was shorter when DMSO was used at 5 and 10% (41 and 48 s) compared to 15% (59 s; Melo and Godinho, 2006). Comparison of duration of sperm motility among different studies is difficult because there is a lack of standardization regarding when the endpoint of motility duration is. In some cases, duration of motility is scored until 20% of spermatozoa are still moving (Melo and Godinho, 2006), others until 10% are still moving (the present study), and yet when all spermatozoa stopped moving (Groison et al., 2010). Nevertheless, after 30-min equilibration, sperm diluted in glucose or NaCl at high osmolalities, combined with either DMSO or MG, was motile for longer than 40 s. When studying the fertilization events of another Bryconinae, *B. nattereri*, we observed several spermatozoa on the opening of the micropyle and more than one inside the canal micropylar 20 s after the addition of water (Maria, 2008). Based on this finding, we can hypothesize that in *B. opalinus*, 40 s is long enough for spermatozoa to find and enter the micropyle and fertilize an oocyte.

Based on these findings, we can conclude that the initiation of sperm motility is triggered by low osmolality rather than the ionic composition of the surrounding medium in *B. opalinus*. Glucose or NaCl solutions at high

osmolalities combined with either DMSO or MG prevent the initiation of sperm motility during storage. Sperm diluted in these media yields motility upon activation above 77% and that should last long enough to fertilize oocytes. These media are recommended as freezing media for future essays in cryopreservation of *B. opalinus* sperm..

5 ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by FAPEMIG (APQ 2578-5.04/07 and APQ 5828-5.04/07), CNPq (300994/2008-7), CESP/ANEEL (0061-017/2006) and CAPES (L.H. Orfão-DSc grant). The authors warmly thank Danilo Caneppele, Lucia H.C. Oliveira and the other technicians of the Hydrobiology and Aquaculture Station of CESP for assistance with experiments and Júlio S. S. Bueno Filho for assistance during the statistical analyses.

6 REFERENCES

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell. Biol. Int.* 30, 1-14.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 400-405.
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., Linhart, O., 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology* 68, 276-283.
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2009a. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology* 72, 32-43.

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Linhart, O., 2009b. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comp. Biochem. Physiol. A* 153, 430-437.

Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Stejskal, V., Linhart, O., 2009. Dynamics of ATP and movement in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) sperm in conditions of decreasing osmolality. *Theriogenology* 72, 851-859.

Cosson, J., Billard, R., Redondo-Muller, C., Cosson, M.P., 1991. In vitro incubation and maturation of common carp, *C. carpio*, spermatozoa. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sinica Monogr.* 16, 249-261.

Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac. Int.* 12, 69-85.

Christen, R., Gatti, J.L., Billard, R., 1987. Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur. J. Biochem.* 166, 667-671.

Fausch, K.D., Lyons, J., Karr, J.R., Angermeir, P. L., 1990. Fish communities as indicators of environmental degradation, in: Marshall Adams, S. (Eds), *Biological indicators of stress in fish*, American Fisheries Society, New York, pp. 123-144.

Glamuzina, B., Skaramuca, B., Glavic, N., Kozul, V., Tutman, P., 2000. Status of grouper (genus *Epinephelus*) investigations in Croatia, in: Basurco, B. (Ed.), *Cahiers Options Méditerranéennes. Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification*, 47, 235-239. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c47/00600623.pdf>

Groison, A.L., Suquet, M., Cosson, J., Mayer, I., Severe, A., Bouquet, J.M., Geffen, A.J., Utne-Palm, A.C., Kjesbu, O.S., 2010. Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit, osmolality and pH. *Aquaculture* 301, 31-36.

He, S., Woods, L.C., 2003. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass (*Morone saxatilis*) sperm motility. *J. World Aquac. Soc.* 34, 255-265.

Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Tron, L., Morisawa, M., 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels leading to Ca²⁺ influx and initiation of sperm motility in the common carp. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 2052-2067.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A., 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. J. Fish Biol. 47, 492-508.

Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Oliveira, A.V., Moraes, G.F., 2006a. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). Anim. Reprod. 3, 55-60.

Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F., Oliveira, A.V., 2006b. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture 260, 298-306.

Maria, A.N., 2008. Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864). PhD Thesis, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil (in Portuguese, with abstract in English). 115 pp.

Melo, F.C.S.A., Godinho, H.P., 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. Anim. Reprod. 33, 380-385.

Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science 210, 114-115.

Morisawa, M., 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. Zool. Sci. 2, 605-615.

Morisawa, M., Oda, S., Yoshida, M., Takai, H., 1999. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians, in: Gagnon, C. (Ed.), The male gamete: from basic to clinical applications. Cache River Press, Vienna, IL, pp. 149-160.

Narahara, M.Y., Andrade-Talmelli E.F., Kavamoto, E.T., Godinho, H.M., 2002, Reprodução induzida da pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. In Portuguese, with abstract in English. R. Bras. Zootec. 31, 1070-1075.

Nascimento, A.F., Maria, A.N., Pessoa, N.O., Carvalho, M.A.M., Viveiros, A.T.M., 2010. The success of out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachyomus*). Anim. Reprod. Sci. 118, 324-329.

Oliveira, A.V., Viveiros, A.T.M., Maria, A.N., Freitas, R.T.F., Izaú, Z.A., 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*). In Portuguese, with abstract in English. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 1509-1515.

Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., Billard, R., 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. J. Cell Sci. 108, 747-753.

Perchec-Poupard, G., Cosson, M.P., Cosson, J., Jeulin, C., Billard, R., 1996. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. Cell Motil. Cytoskeleton 35, 113-120.

Perchec-Poupard, G., Gatti, J.L., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 110, 315-327.

Perchec-Poupard, G., 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.

Quinn, P.J., 1985. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. Cryobiology 22, 128-146.

R Development Core Team, 2007. R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing.

Redondo, C., Cosson, M-P., Cosson, J., Billard, R., 1991. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. Mol. Reprod. and Dev. 29, 259-270.

Rosa, R.S., Lima, F.C.T., 2008. Os peixes ameaçados de extinção, in: Machado, A.B.M., Drummond G.M., Paglia A.P. (Eds), Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, Brazil, pp. 9-285.

Shimoda, E., Andrade, D.R., Vidal Junior, M.V., Yasui, G.S., Silva, J.F.S., Godinho, H.P., Souza G., 2007. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. In Portuguese with abstract in English. Rev. Ceres 54, 430-433.

Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V., Beynen, A.C., 1993. Principles of laboratory animal science. Revised edition. Elsevier B.V.

Viveiros, A.T.M., Fessehayé, Y., ter Veld, M., Schulz, R.W., Komen, J., 2002. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. Aquaculture 213, 373-386.

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

Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Maria, A.N., Allaman, I.B., 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Anim. Reprod. Sci. 112, 293-300.

Viveiros, A.T.M., Nascimento, A.F., Orfão, L.H., Isaú, Z.A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. Theriogenology 74, 551-556.

Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S., Nimrat, S., 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 72, 129-138.

Wilson-Leedy, J.G., Kanuga, M.K., Ingermann, R.L., 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. Theriogenology 71, 1054-1062.

Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M., 2006. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. In Spanish with abstract in English. Rev. Col. Cien. Pec. 19, 233-240.

**ARTIGO 3 AN EFFECTIVE METHOD FOR SPERM
CRYOPRESERVATION OF THE THREATENED
BRAZILIAN FISH BRYCON OPALINUS (CUVIER,
1819)**

Preparado de acordo com as normas da revista Theriogenology

ABSTRACT

ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; CANEPPELE, D.; VIVEIROS, A.T.M. An effective method for sperm cryopreservation of the threatened Brazilian fish *Brycon opalinus*.(Cuvier, 1819) In: __. **Variabilidade genética e criopreservação de sêmen objetivando a formação de um banco de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 120p., p. 88-117. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Sperm preservation is an important tool for conservation of threatened fish species, such as the pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). Our previous study showed that DMSO or MG as CPA in combination with glucose or NaCl as extender maintains high sperm quality after 30 min at 4 °C as long as extender osmolality is at least 325 mOsm/kg. The objective of this study was to further evaluate these freezing media during the cryopreservation process of *B. opalinus* sperm. Furthermore, two equilibration times (period of time between CPA addition and freezing; 15 and 30 min), two straw volumes (0.5 and 4.0 mL) and two thawing temperatures (30 and 60 °C) were also tested. Post-thaw sperm quality was evaluated in terms of progressive sperm motility, duration of motility and percentage of live spermatozoa, fertilization and hatching rates. Sperm was better cryopreserved in the freezing medium composed of glucose at 365 mOsm/kg and methyl glycol, after an equilibration time of 30 min. Sperm thawed at 60 °C yielded higher sperm motility, duration of motility and percentage of live spermatozoa. Sperm motility, duration of motility and percentage of live spermatozoa of fresh and pre-freezing sperm was higher compared to post-thaw sperm. Fertilization rate of oocytes fertilized with fresh sperm (78%) and with sperm cryopreserved in 0.5-mL straw (69%) were higher

* Comitê Orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora); Dr Rilke Tadeu Fonseca de Freitas– UFLA (Co-Orientador);

($P < 0.05$) compared to oocytes fertilized with sperm cryopreserved in 4.0 mL straw (42%). Hatching rates, however, were higher for fresh sperm (57%) compared to sperm cryopreserved in 0.5 (43%) and 4.0 mL straws (33%). The method developed in this study for cryopreservation of *B. opalinus* sperm is efficient.

RESUMO

ORFÃO, L.H; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; CANEPPELE, D.; VIVEIROS, A.T.M. An effective method for sperm cryopreservation of the threatened Brazilian fish *Brycon opalinus*.(Cuvier, 1819) In: ____. **Variabilidade genética e criopreservação de sêmen objetivando a formação de um banco de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 120p., p. 88-117. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

A preservação do sêmen é uma importante ferramenta para a conservação das espécies de peixes ameaçadas, como a pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). Nosso estudo anterior mostrou que os crioprotetores DMSO ou MG, em combinação com a glicose ou NaCl em osmolalidades de 325 ou 365 mOsm/kg como diluidores mantêm a qualidade do sêmen após 30 min a 4 °C. O objetivo deste estudo foi o de avaliar esses meios de congelamento durante o processo de criopreservação de sêmen *B. opalinus*. Além disso, dois tempos de equilíbrio (período entre a adição dos crioprotetores e o congelamento; 15 e 30 min), dois volumes de palhetas (0,5 e 4,0 mL) e duas temperaturas de descongelamento (30 e 60 °C) também foram testados. A qualidade do sêmen pós-descongelamento foi avaliada em termos de motilidade espermática progressiva, duração da motilidade e porcentagem de espermatozóides vivos, além das taxas de fertilização e eclosão. O sêmen foi melhor criopreservado em meio composto de glicose 365 mOsm/kg e metilglicol, após tempo de equilíbrio de 30 min. Sêmen descongelado a 60 °C produziu maior motilidade espermática, duração da motilidade e porcentagem de espermatozóides vivos. A motilidade espermática, duração da motilidade e a porcentagem de espermatozóides vivos de sêmen fresco e pré-congelamento foram maiores em relação ao sêmen pós-descongelamento.

* Comitê Orientador: Dr^a Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora); Dr Rilke Tadeu Fonseca de Freitas– UFLA (Co-Orientador);

A taxa de fertilização de ovócitos fecundados com sêmen fresco (78%) e com sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 ml (69%) foram maiores ($P < 0,05$) em comparação com ovócitos fertilizados com sêmen criopreservado em palhetas de 4,0 mL (42%). As taxas de eclosão, no entanto, foram maiores para o sêmen fresco (57%) em relação ao sêmen criopreservado palhetas de 0,5 (43%) e 4,0 mL (33%). O método desenvolvido neste estudo para a criopreservação de sêmen de *B. opalinus* é eficiente

1 INTRODUCTION

The *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), known as pirapitinga-do-sul in Brazil, belongs to the Characiformes order, Characidae family and Bryconinae sub-family. This specie is native to the Paraíba do Sul and Doce rivers basins in Southeast of Brazil (Rosa and Lima, 2008) and its meat is very appreciated by riverside population (Narahara et al 2002).

Natural populations of this fish species is decreasing in recent years as a result of environmental modifications caused by human actions, such as construction of hydroelectric power plant and overfishing, caused by and climatic changes, thus *B. opalinus* is actually set as threatened (Rosa and Lima, 2008).

The cryopreservation of fish sperm provides a tool by which reproduction is optimized thereby larval production is increased. The availability of frozen sperm allows conservation programs to make a genetic bank of many males and increases the potential breeding population size to ensure that proper genetic combinations are produced in breeding of endangered species (Tiersch, 2008).

The first step when developing a cryopreservation protocol for one species is to choose the correct freezing medium composed of an extender, commonly a saline or a glucose solution with an appropriate osmolality, and a cryoprotectant agent (CPA). In one hand, CPA protects cells against the freezing damages due to intracellular ice crystals formation and excessive dehydration, but on the other hand, CPA may cause detrimental effects on spermatozoa physiology due to osmotic shock or to direct biochemical injury if spermatozoa are exposed to CPA for too long (Kopeika and Kopeika, 2008). Thus, post-thaw sperm quality depends greatly on CPA concentration and on the period of time between the addition of a CPA to sperm and freezing (equilibration time). Regarding Brazilian fish species of the order Characiformes, dimethyl

sulphoxide (DMSO; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) has been the CPA most widely used for the sperm cryopreservation mainly in combination with glucose and egg yolk (Viveiros and Godinho, 2009). However, during the past few years, this research group has shown that methylglycol (MG; $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$; also known as 2-methoxyethanol or ethylene glycol monomethyl ether) is a better CPA than DMSO during the sperm cryopreservation of some Characiformes in combination with glucose or Beltsville Thawing Solution (BTSTM; MinitubTM, Tiefenbach/Landshut, Germany)(Maria et al., 2006 a and b; Oliveira et al., 2007; Viveiros et al., 2009; Nascimento et al., 2010;).

In our previous study, fresh *B. opalinus* sperm was diluted in extenders (glucose and NaCl) at different osmolalities (245, 285, 325 and 365 mOsm/kg), combined with DMSO or MG as CPA. Sperm was evaluated in terms of motility rate and duration of motility after a 30-min equilibration time at 4 °C (Orfão et al., 2010). The results showed that any combination of DMSO or MG as CPA and glucose or NaCl as extender maintain high sperm quality after 30 min at 4 °C as long as extender osmolality is at least 325 mOsm/kg.

The objective of this study was to further evaluate these freezing media during the cryopreservation process of *B. opalinus* sperm. Furthermore, two equilibration times (period of time between CPA addition and freezing; 15 and 30 min), two straw volumes (0.5 and 4.0 mL) and two thawing temperatures (30 and 60 °C) were also tested. Post-thaw sperm quality was evaluated in terms of progressive sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa. Finally, we showed that sperm cryopreserved in the best combination mentioned above produced acceptable fertilization and hatching rat

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fish handling and sperm collection

All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation (Van Zutphen et al., 1993). *Brycon opalinus* males of approximately 7 years of age (body weight: 321 ± 13 g; total length: 30 ± 0.6 cm) were selected from circular tanks at the Hydrobiology and Aquaculture Station of the Hydroelectric Company of São Paulo (CESP) in Paraibuna ($23^{\circ}23'10''\text{S}$; $45^{\circ}39'44''\text{W}$), São Paulo State, Brazil, during the spawning season (October and November). Males with detectable running sperm in response to soft abdominal pressure were given a single dose of carp pituitary extract (Argent Chemical Laboratory, Redmond, WA, USA) at 5 mg/kg body weight, IM, and maintained at ~ 22 °C. Eight hours after, the urogenital papilla was carefully dried, and sperm was hand-stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (20 to 23 °C), and soon after collection, tubes containing sperm were placed in crushed ice (4 ± 2 °C). An aliquot of 5 μL of each sperm sample was placed on a slide and observed using a light microscope (Model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at $400 \times$ magnification. Any spontaneous sperm motility observed was attributed to urine or water contamination and the sample discarded, as fish sperm in the seminal plasma is immotile. In immotile samples ($n = 19$ males), progressive sperm motility was subjectively estimated (in increments of 10%) immediately after the addition of 25 μL of 92 mOsm/kg NaCl (0.29% NaCl) as an activation medium, following the methodology used as routine in our laboratory (Maria et al. 2006a and b; Oliveira et al. 2007; Viveiros et al., 2009; Nascimento et al., 2010; Viveiros et al., 2010). All samples presented at least 80% motility and were used in the subsequent analysis. Duration of sperm motility was assessed under the same conditions: a stopwatch was triggered at the time of activation medium

addition and stopped when 10% of the spermatozoa were still moving. Sperm volume and concentration (hemacytometer/Neubauer™ chamber) were also determined.

2.2 Experiment 1. Extenders (composition and osmolality), cryoprotectants, and equilibration times

All chemicals were obtained from Vetec Química Fina Ltda™ (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Eight freezing media, comprising the combination of four extender and two CPAs (dimethyl sulfoxide= DMSO and methylglycol= MG) at 1.4 M, were prepared and maintained in crushed ice (4 ± 2 °C) for 30 min. The extenders were prepared as a factorial of two compositions (NaCl and glucose) and two osmolalities (325 and 365 mOsm/kg), and referred to as follows: NaCl-325, NaCl-365, glucose-325 and glucose-365. Sperm samples ($n = 8$ males) were diluted in each freezing medium at a final proportion of 10% sperm, 80% extender and 10% CPA and maintained in crushed ice (4 ± 2 °C) for an equilibration time of 15 or 30 min. After the equilibration time, sperm samples were aspirated into 0.5 mL straws ($n = 3$ replicate straws x 8 media x 8 male), and frozen in a nitrogen vapor vessel (Cryoporter™ LN₂ *dry vapor shipper*, Cryoport Systems, Brea, CA, USA) at approximately -170 °C, which gives a freezing rate of approximately -35.6 °C/min between + 21 °C and -170 °C (Maria et al 2006a). Thereafter, straws were transferred to liquid nitrogen (M.V.E. Millenium™, XC 20, Chart, Minnesota, USA) at -196 °C within 20-24 h for storage. Straws were thawed in a water bath at 60 °C for 8 sec (Maria et al., 2006a) and post-thaw sperm motility rate and duration of motility were immediately estimated as described for fresh sperm. To determine whether the subjective motility test would be accurate and represent the actual living spermatozoa in a sperm sample, motility rate was compared with an objective test in which the percentage of live spermatozoa was determined following

eosin-nigrosin staining (5% B eosin, 10% nigrosin, Sigma-AldrichTM, Steinheim, Germany; pH = 6.9). A total of three hundred cells per slide (1 slide = 1 replicate straw) were counted on a light microscope, at 1000 × magnification. The percentage of live (unstained or light pink) and dead spermatozoa (red stained) was calculated. Sperm parameters were evaluated in all samples by the same technician.

2.3 Experiment 2. Extender compositions, cryoprotectants, straw volumes and thawing temperatures

Sperm ($n = 7$ males) was diluted in four freezing media, comprising combinations of two extenders (NaCl-365 and glucose-365) and two CPAs (DMSO and MG) at 1.4 M. After an equilibration time of 30 min, diluted sperm was then aspirated into 0.5 mL and 4.0 mL straws ($n = 6$ replicate straws x 4 media x 7 males) and frozen as described above. Three 0.5-mL replicate straws were thawed in a water bath at 60 °C for 8 sec and the other three straws at 30 °C for 16 sec. Three 4.0-mL replicate straws were thawed in a water bath at 60 °C for 24 sec and the other three straws at 30 °C for 48 sec. Post-thaw sperm motility rate, duration of motility and live spermatozoa were evaluated as described.

2.4 Experiment 3. Fertilization trial

Sperm samples ($n = 4$ males) were diluted in a freezing medium comprising the combination of glucose-365 and MG. After an equilibration time of 30 min, diluted sperm was aspirated into 0.5 and 4.0 mL straws ($n = 3$ replicate straws x 4 males), frozen in nitrogen vapor and then stored in liquid nitrogen as described above.

To harvest oocytes, females ($n = 4$; 400 ± 20 g body weight) received two doses of carp pituitary extract (1 and 4.5 mg/kg body weight; Argent

Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at 12 h interval. Together with the second dose, females received a dose of human chorionic gonadotropin (1.45 IU hCG /g body weight; Pregnyl™ Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA), and were hand-stripped 5 h later. All females responded positively to the hormonal treatment, and were all used for the fertilization trial. Oocytes remained at room temperature (20-23 °C) for a maximum of 30 min.

All straws were thawed at 60 °C for 8 sec (0.5 mL straws) or 48 sec (4.0 mL straws). Sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa were determined as described previously.

Post-thawed sperm was re-diluted in glucose-365 in order to produce an approximate ratio of 410,000 spermatozoa:oocyte when 100 µL of post-thawed sperm was used to fertilize 0.4 g oocytes (~ 100 oocytes). Fertilization was initiated by addition of 5 mL tank water, and mixed for 1 min. Subsequently, 10 mL tank water was added, and samples mixed for another 2 min. Finally, eggs were transferred to a PVC basket, 10 cm in diameter, with a 0.5 mm mesh bottom (Viveiros et al., 2000), and incubated in a flow-through system at 22 °C. In total, 48 batches of eggs were fertilized with cryopreserved sperm ($n = 3$ replicate straws x 4 males x 4 females) for each straw volume. To control oocytes quality, 100 µL of freshly collected sperm of another male, diluted in glucose-365 to the same spermatozoa:oocyte ratio, was used to fertilize oocytes from the same females, performing four batches of eggs fertilized with fresh-control sperm.

The number of fertilized eggs, as percentage of total oocytes was determined 16 h after fertilization at 22 °C, during gastrula stage using a stereomicroscope (Carl Zeiss, Germany). The number of hatched larvae, as the percentage of the initial number of oocytes, was determined 44 h after fertilization.

2.5 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed by the R computational program (version 2.9.0; R Development Core Team, 2007). ANOVA was conducted to determine the effects of extender composition, extender osmolality, cryoprotectant, equilibration time, straw volume and thawing temperature on sperm motility rate, duration of motility and live spermatozoa (Experiment 1 and 2). Tukey test was used to evaluate fertilization rate and hatching rate (Experiment 3). Differences between means were considered significant at $P < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Fresh sperm

Fresh sperm of the 19 males used in this study possessed $97 \pm 1\%$ of progressive motility rate with 97 ± 2 sec of duration, volume of 8.0 ± 0.1 mL and $41 \pm 12.9 \times 10^9$ spermatozoa/mL.

3.2 Experiment 1. Extenders (composition and osmolality), cryoprotectants, and equilibration times

According to ANOVA (Table 1), motility rate was significantly higher when extender osmolality was 365 mOsm/kg compared to 325 mOsm/kg. Extender compositions, cryoprotectants and equilibration times did not significantly affect motility rate. The two factors, three factors or four factors interactions affected motility rate, excepted for extender osmolality x equilibration time and extender composition x extender osmolality x cryoprotectant. Highest post-thaw motility rates were observed when sperm was cryopreserved in NaCl-365-DMSO (77 to 78%) and in glucose-365-MG (86 to 88%), regardless equilibration time (Table 2).

According to ANOVA (Table 1), duration of motility was higher when extender osmolality was 365 mOsm/kg compared to 325 mOsm/kg. Extender compositions, cryoprotectants and equilibration times did not significantly affect motility rate. The two factors and three factors interactions affected duration of motility, excepted for extender composition x equilibration time and extender osmolality x equilibration time. Highest post-thaw duration of motility (51 to 52 sec) was observed when sperm was cryopreserved in glucose-365-MG, regardless equilibration time (Table 2).

According to ANOVA (Table 1), percentage of live spermatozoa was significantly higher when extender osmolality was 365 mOsm/kg compared to 325 mOsm/kg and when equilibration time was 30 min compared to 15 min. Extender compositions and cryoprotectants did not significantly affect motility rate. All interactions affected percentage of live spermatozoa, excepted for extender composition x equilibration time, extender osmolality x cryoprotectant and cryoprotectant x equilibration time. Highest post-thaw percentage of live spermatozoa was observed when sperm was cryopreserved in NaCl-365-DMSO (79 to 83%) and in glucose-365-MG (72 to 74%), regardless equilibration time (Table 2).

Table 1

Statistical results for the effects of extender (composition and osmolality), cryoprotectant and equilibration time (Experiment 1)

Effect	Variable analyzed					
	Sperm motility		Duration of motility		Live spermatozoa	
	DF ¹	<i>P</i> -value	DF	<i>P</i> -value	DF	<i>P</i> -value
Extender composition (a)	1	0.0532	1	0.0678	1	0.8127
Extender osmolality (b)	1	<0.0001	1	<0.0001	1	<0.0001
Cryoprotectant (c)	1	0.0659	1	0.0594	1	0.1456
Equilibration time (d)	1	0.0734	1	0.0528	1	<0.0001
a x b	1	<0.0001	1	<0.0001	1	0.0017
a x c	1	<0.0001	1	<0.0001	1	<0.0001
a x d	1	<0.0001	1	0.1272	1	0.4614
b x c	1	0.0177	1	0.0828	1	0.9922
b x d	1	0.3337	1	0.0140	1	0.2315
c x d	1	<0.0001	1	0.0026	1	0.0011
a x b x c	1	0.1388	1	0.0126	1	<0.0001
a x b x d	1	0.0005	1	0.0002	1	0.0077
a x c x d	1	0.0010	1	0.0002	1	0.030
b x c x d	1	0.0011	1	0.0140	1	0.3723
a x b x c x d	1	<0.0001	1	0.0549	1	<0.0001
Error	240		240		36	
					9	

¹ degrees of freedom

Table 2

Extender (composition and osmolality), cryoprotectant (DMSO and MG) and equilibration time on post-thaw sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa (mean \pm SEM; $n = 8$ males) of *Brycon opalinus* (Experiment 1)

Extender		Equilibration time ²			
Composition ¹	mOsm/kg	15 min		30 min	
		DMSO	MG	DMSO	MG
Sperm motility rate (%)					
NaCl	325	49 \pm 5 *	33 \pm 4	45 \pm 3 *	25 \pm 3
NaCl	365	78 \pm 3 #	68 \pm 6 #	77 \pm 3 #	70 \pm 3 #
Glucose	325	8 \pm 2	10 \pm 3	2 \pm 1	42 \pm 5 *
Glucose	365	61 \pm 4 #	86 \pm 2 *#	64 \pm 3 #	88 \pm 1 *#
Duration of motility (sec)					
NaCl	325	36 \pm 4	30 \pm 4	36 \pm 3	30 \pm 5
NaCl	365	40 \pm 2	46 \pm 5 #	46 \pm 4	49 \pm 4 #
Glucose	325	0	0	0	28 \pm 4 *
Glucose	365	42 \pm 4 #	51 \pm 3 #	37 \pm 3 #	52 \pm 4 *#
Live spermatozoa (%)					
NaCl	325	29 \pm 4	23 \pm 1	38 \pm 5	28 \pm 6
NaCl	365	83 \pm 1 *#	25 \pm 7	79 \pm 2 #	68 \pm 9 #
Glucose	325	30 \pm 6	24 \pm 3	34 \pm 3	47 \pm 6
Glucose	365	34 \pm 4	74 \pm 5 *#	52 \pm 10 #	72 \pm 3 *#

Differences between cryoprotectants for equal equilibration time are marked with * when significant (F; $P < 0.05$).

Differences between extender osmolalities for equal extender composition are marked with # when significant (F; $P < 0.05$).

¹ Extender composition did not affect sperm motility rate, duration of motility and live spermatozoa (F; $P > 0.05$)

² Equilibration time did not affect sperm motility rate or duration of motility (F; $P < 0.05$) but the percentage of live spermatozoa was higher when equilibration time was 30 min compared to 15 min (F; $P < 0.05$).

DMSO= dimethyl sulphoxide; MG= methylglycol

3.3 Experiment 2. Extender compositions, cryoprotectants, straw volumes and thawing temperatures

According to ANOVA (Table 3), motility rate was significantly higher when sperm was cryopreserved in glucose compared to NaCl and thawed at 60 °C compared to 30 °C. Cryoprotectants and straw volumes did not significantly affect motility rate. The following two factors interactions affected motility rate: extender composition x cryoprotectant, extender composition x straw volume and extender composition x thawing temperature. The other interactions did not affect motility rate. Data on post-thaw sperm quality are presented in Table 4. DMSO was a better CPA than MG when combined with NaCl, and MG was a better CPA than DMSO when combined with glucose (Table 4). Highest post-thaw motilities (80 to 82%) were observed when sperm was cryopreserved in glucose-365-MG and thawed at 60 °C, regardless straw volume.

According to ANOVA (Table 3), duration of motility was higher when sperm was cryopreserved in glucose compared to NaCl and thawed at 60 °C compared to 30 °C. Cryoprotectants and straw volumes did not significantly affect motility rate. The following two factors interactions affected duration of

motility: extender composition x cryoprotectant, extender composition x straw volume and cryoprotectant x straw volume. The three factors interactions extender composition x cryoprotectant x thawing temperature affected motility duration. The other interactions did not affect motility rate. The longest duration of sperm motility (48 to 53 sec) was observed in sperm samples cryopreserved in glucose-365-MG and thawed at 60 °C (Table 4).

According to ANOVA (Table 3), percentage of live spermatozoa was higher when sperm was cryopreserved in glucose compared to NaCl and thawed at 60 °C compared to 30 °C. Cryoprotectants and straw volumes did not significantly affect motility rate. All the two factors interactions affected percentage of live spermatozoa, excepted for cryoprotectant x thawing temperature and straw volume x thawing temperature. The three factors interactions and the four factor interaction did not affect percentage of live spermatozoa. DMSO was a better CPA than MG when combined with NaCl, and MG was a better CPA than DMSO when combined with glucose (Table 4). Highest post-thaw percentage of live spermatozoa (80 to 82%) was observed when sperm was cryopreserved in glucose-365-MG and thawed at 60 °C, regardless straw volume.

Table 3

Statistical results for the effects of extender composition, cryoprotectant, straw volume and thawing temperature (Experiment 2)

Effect	Variable analyzed					
	Sperm motility		Duration of motility		Live spermatozoa	
	DF	<i>P</i> -value	DF	<i>P</i> -value	DF	<i>P</i> -value
Extender composition (a)	1	<0.0001	1	0.0010	1	<0.0001
Cryoprotectant (c)	1	0.0740	1	0.3610	1	0.4260
Straw volume (e)	1	0.1466	1	0.4551	1	0.7512
Thawing temperature (f)	1	<0.0001	1	<0.0001	1	<0.0001
a x c	1	<0.0001	1	<0.0001	1	<0.0001
a x e	1	0.0029	1	<0.0001	1	<0.0001
a x f	1	0.0074	1	0.3951	1	<0.0001
c x e	1	0.4060	1	0.0134	1	0.0249
c x f	1	0.2535	1	0.5133	1	0.5314
e x f	1	0.4671	1	0.9503	1	0.3098
a x c x e	1	0.7552	1	0.2951	1	<0.0001
a x c x f	1	0.4060	1	0.0232	1	<0.0001
a x e x f	1	0.2535	1	0.8163	1	0.0330
c x e x f	1	0.4277	1	0.7873	1	<0.0001
a x c x e x f	1	0.8353	1	0.0841	1	<0.0001
Error	209		209		321	

¹ degrees of freedom

Table 4

Extender composition, cryoprotectant (CPA; DMSO and MG), straw volume and thawing temperature on post-thaw sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa (mean \pm SEM; $n = 7$ males) of *Brycon opalinus* (Experiment 2)

Extender composition (mOsm/kg)	CPA	Thawing temperature ($^{\circ}$ C) ¹			
		30		60	
		0.5 straw	4.0 straw	0.5 straw	4.0 straw
Sperm motility rate (%) ¹					
NaCl-365	DMSO	52 \pm 8 [#]	64 \pm 4 ^{*#}	72 \pm 4 [#]	72 \pm 3 [#]
NaCl-365	MG	26 \pm 5	46 \pm 6 [*]	51 \pm 4	51 \pm 3
Glucose-365	DMSO	69 \pm 5 [*]	58 \pm 9	67 \pm 3	64 \pm 3
Glucose-365	MG	75 \pm 2 [#]	69 \pm 3	82 \pm 2 [#]	80 \pm 3 [#]
Duration of motility (sec) ¹					
NaCl-365	DMSO	35 \pm 6 [#]	37 \pm 5	41 \pm 5	41 \pm 3
NaCl-365	MG	17 \pm 5	38 \pm 6 [*]	40 \pm 4	45 \pm 5
Glucose-365	DMSO	36 \pm 4	26 \pm 6	45 \pm 3	41 \pm 4
Glucose-365	MG	50 \pm 6 [#]	41 \pm 6 [#]	48 \pm 3	53 \pm 2 [#]
Live spermatozoa (%) ¹					
NaCl-365	DMSO	47 \pm 11 [#]	44 \pm 9	68 \pm 9 [#]	71 \pm 4 [#]
NaCl-365	MG	24 \pm 3	43 \pm 2 [*]	47 \pm 6	48 \pm 5
Glucose-365	DMSO	68 \pm 1 [*]	57 \pm 4	65 \pm 2	65 \pm 2
Glucose-365	MG	71 \pm 2 [*]	60 \pm 9	82 \pm 1 [#]	80 \pm 1 [#]

Differences between straw volumes for equal thawing temperature are marked with * when significant (F; $P < 0.05$).

Differences between cryoprotectants for equal extender composition are marked with # when significant (F; $P < 0.05$).

¹ Sperm motility rate, duration of motility and live spermatozoa was higher when straws were thawed in a water bath at 60 °C compared to 30 °C. (F; $P < 0.05$)

3.3 Experiment 3. Fertilization trial

Sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa were significantly higher in fresh (control) and pre-freezing sperm (95 to 100% motility, 117 to 120 sec and 92 to 95% live spermatozoa) compared to post-thaw sperm (73 to 81% motility, 47 sec and 68 to 70% live spermatozoa). Straw volume, however, did not affect these parameters (Table 5). When the fertilizing ability was evaluated (Table 6), fertilization rate of oocytes fertilized with fresh sperm (78%) and with sperm cryopreserved in 0.5-mL straw (69%) were higher ($P < 0.05$) compared to oocytes fertilized with sperm cryopreserved in 4.0 mL straw (42%). Hatching rates, however, were higher for fresh sperm (57%) compared to sperm cryopreserved in 0.5 (43%) and 4.0 mL straws (33%).

Egg quality was different among females. Taking fresh sperm as a reference, fertilization and hatching rates were significantly higher for female #1 (89% fertility and 76% hatching) compared to female #2 (65% fertility and 44% hatching).

Table 5

Pre- freezing and post-thaw sperm motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa (mean \pm SEM; n = 4 males) of *Brycon opalinus* sperm cryopreserved in glucose 365 mOsm/kg, methylglycol and 0.5- or 4.0-mL straws. As control, fresh sperm of another male diluted in glucose 365 mOsm/kg was used (Experiment 3)

Sperm	Motility rate (%)	Duration of motility (sec)	Live spermatozoa (%)
Fresh control	100 ^a	120 ^a	95 ^a
Pre-freezing	95 \pm 6 ^a	117 \pm 9 ^a	92 \pm 5 ^a
Cryopreserved 0.5 straw	81 \pm 5 ^b	47 \pm 3 ^b	70 \pm 3 ^b
Cryopreserved 4.0 straw	73 \pm 5 ^b	47 \pm 3 ^b	68 \pm 3 ^b

^{a,b} Means within the same column followed by different superscript are different (Tukey; $P < 0.05$)

Table 6

Fertilization and hatching rate (expressed as percentage of total eggs; mean \pm SEM; $n = 4$ males) of *Brycon opalinus* sperm, cryopreserved in glucose 365 mOsm/kg, methylglycol and 0.5- or 4.0-mL straws. As control, fresh sperm of another male diluted in glucose 365 mOsm/kg was used (Experiment 3)

Female ID	Fertilization rate (%)			Hatching rate (%)		
	Fresh sperm	0.5 straw	4.0 straw	Fresh sperm	0.5 straw	4.0 straw
1	89 ^A	86 \pm 1 ^A	75 \pm 2 ^A	76 ^A	66 \pm 3 ^A	44 \pm 3 ^A
2	65 ^B	53 \pm 5 ^C	41 \pm 1 ^B	44 ^C	25 \pm 4 ^C	35 \pm 2 ^A
3	86 ^A	71 \pm 4 ^B	31 \pm 7 ^B	57 ^B	38 \pm 5 ^B	28 \pm 5 ^{AB}
4	71 ^A	68 \pm 5 ^B	32 \pm 8 ^B	52 ^B	44 \pm 8 ^B	23 \pm 8 ^B
Mean	78 \pm 6 ^a	69 \pm 4 ^a	42 \pm 7 ^b	57 \pm 7 ^a	43 \pm 4 ^b	33 \pm 8 ^b

^{A,B} Means within the same column followed by different superscript are different (Tukey; $P < 0.05$)

^{a,b} Means within the same row followed by different superscript are different, within of each rate (Tukey; $P < 0.05$)

4 DISCUSSION

In the present study, the effects of extender (composition and osmolality), CPA, equilibration time, straw volume and thawing temperature on post-thaw sperm quality of *B. opalinus* were evaluated. Post-thaw sperm quality is mostly evaluated as the percentage of motility observed in a light microscope. Although, this method of evaluation is fast and practical, sometimes it may not be enough to show the sperm quality. For instance, in African catfish *Clarias gariepinus* samples with low or none motility yielded high hatching rate (Viveiros, 2005). Thus, to have a better overview of sperm quality we evaluated subjectively the percentage of motile spermatozoa (motility rate), the duration of motility to assure that spermatozoa have motility long enough to achieve micropyle of oocyte (20 sec, Maria, 2009) and the percentage of live spermatozoa by staining. Fertilization and hatching rate were carried out to evaluate the proposed protocol, in comparison with fresh sperm. This is the first study to describe cryopreservation experiments of *B. opalinus* sperm.

4.1 Freezing media

In most studies carried out with Characiformes sperm, glucose (5%; 277 mOsm/kg) and NaCl (0.9%; 285 mOsm/kg) are commonly used as extender. In this study, when extender osmolality was evaluated, almost all samples cryopreserved in extender at 365 mOsm/kg yielded higher sperm motility rate, duration of motility and live spermatozoa compared to extender at 325 mOsm/kg. Studies regarding the effects of extender osmolality mostly designed to evaluate extender before cryopreservation or activation medium (Morisawa and Suzuki, 1980; He et al., 2003; Cosson, 2004; Alavi and Cosson, 2006; Melo and Godinho, 2006; Shimoda et al., 2007; Alavi et al., 2009; Groisson et al.,

2010, among others). Descriptions of whether extender osmolality affects post-thaw sperm quality are scarce in fish sperm cryopreservation.

Although, extender composition did not affect motility rate, duration of motility and live spermatozoa when equilibration time was tested (experiment 1), it did when straw volume and thawing temperature were tested (experiment 2). In this experiment, sperm cryopreserved in glucose produced higher motility rate and percentage of live spermatozoa than in NaCl. In another Characiformes species, streaked prochilod *Prochilodus lineatus*, sperm cryopreserved in glucose and MG yielded higher motility rates compared to NaCl and MG (Viveiros et al., 2009).

An efficient interaction of extender (composition and osmolality) and CPA is necessary to define the best freezing medium. In this study, DMSO was a better CPA than MG when combined with NaCl, and MG was a better CPA than DMSO when combined with glucose. DMSO and MG have similar molecular weight (approximately 78 g/mol and 76 g/mol, respectively), thus this extender- CPA interaction is probably not related to cellular permeation, and yet whether to be protective, these CPA have to permeate a cell, is still unclear (Viveiros et al, 2005). More experiments specially designed to address extender-CPA interactions are needed.

4.2 Equilibration time

In the present study, equilibration time did not affect sperm motility rate or duration of motility, but the percentage of live spermatozoa was higher when equilibration time was 30 min compared to 15 min at 4 °C. Although some studies suggest that equilibration time is not necessary (Aral et al., 2009), we have observed that fish sperm cryopreserved immediately after dilution (without equilibration time) yields very low post-thaw motility rate (data not shown). On the other hand, an excessive contact of spermatozoa with CPA before

cryopreservation can lead to higher toxicity effects of these CPA. Equilibration times between 10 and 20 min are the most commonly used for fish sperm (Billard and Zhang, 2001). The effect of equilibration time can be dependent on CPA and its concentration, and also of temperature of equilibration. Silver barb *Puntius gonionotus* sperm was diluted in DMSO at 1.4 M and allowed to equilibrate at 4 °C for 30 min yielded fertilization rate of approximately 80%. However, when diluted sperm was equilibrated at 30 °C, fertilization rate decreased to 40% (Routray et al., 2008).

4.3 Thawing temperature and straw volume

To obtain post-thaw sperm of good quality, thawing process is so important as freezing, and both protocols must be perfectly established (Lahnsteiner et al., 1995, 1996). In this study, sperm thawed at 60 °C yielded higher motility rate, duration of motility and percentage of live spermatozoa compared to sperm thawed at 30 °C. In Brazilian freshwater fish species, sperm frozen at fast cooling rates, as in *dry-shippers*, are thawed fast in a warm water-bath from 30 to 60 °C for 8 to 60 s (Viveiros and Godinho, 2009).

When straw volume was evaluated, post-thaw sperm quality was similar when sperm was cryopreserved in 0.5 or 4.0-mL and thawed at 60 °C. Similarly, no difference in sperm motility was reported for sperm cryopreserved in 0.5 and 4.0-mL straws of yamú *B. amazonicus* (Velasco-Santamaría et al., 2006), pirapitinga *B. nattereri* (Viveiros et al., 2010), and streaked prochilod *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009). Hatching rates was also not affected by straw volume, as observed for matrinxã *B. cephalus* (Ninhaus-Silveira et al., 2006). The 0.5-ml straws are extensively used in fish sperm cryopreservation experiments because of the low cost as many replicates are needed, and sometimes because sperm volume is low (Viveiros et al., 2009). In practice, to fertilize oocytes of only one female, many 0.5 mL straws are needed. Thus, large straws with a volume of 4.0

mL could enable fertilization of a greater amount of oocytes with manipulation of smaller number of straws.

When fertilization or hatching rate are used to assess sperm quality, it is important to keep in mind that, another source of variation is added: egg quality (Viveiros and Godinho, 2009), which is variable and affects the success of fertilization.

5 CONCLUSION

The protocol developed in this study for cryopreservation of *B. opalinus* sperm is efficient. Acceptable hatching rates were obtained when sperm was cryopreserved in glucose 365 mOsm/kg and MG, 0.5 or 4.0 mL straws, after an equilibration time of 30 min and thawed in a water bath at 60 °C. This protocol can be used in conservational programs, since *B. opalinus* is set as a threatened species.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPEMIG (APQ 2578-5.04/07 and APQ 5828-5.04/07), CESP/ANEEL (0061-017/2006) and CAPES (L.H. Orfão-DSc grant). The authors warmly thank technicians of the Hydrobiology and Aquaculture Station of CESP for assistance with experiments, and Júlio S. S. Bueno Filho for assistance during the statistical analyses.

7 REFERENCES

Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biol Int* 2006;30: 1-14.

Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology* 2009;72: 32-43.

Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac Int* 2004;12: 69-85.

Groison AL, Suquet M, Cosson J, Mayer I, Severe A, Bouquet JM, Geffen AJ, Utne-Palm AC, Kjesbu OS. Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit, osmolality and pH. *Aquaculture* 2010; 301: 31-36.

He S, Woods LC. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass (*Morone saxatilis*) sperm motility. *J World Aquac Soc* 2003;34: 255-65.

Kopeika E, Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: *Fish spermatology*, Alavi SMH, Cosson JJ, Coward R, Rafiee G (Ed.), Oxford: Alpha Science Ltd., 2008. pp 347-96.

Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta f fario* L., *Salmo trutta f lacustris* L., *Coregonus* sp.). *Aquac Res* 1995;26: 801-07.

Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 1996;144: 265-74.

Maria AN, Viveiros ATM, Orfão LH, Oliveira AV, Moraes GF. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Anim Reprod* 2006a;3: 55-60.

Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 2006b;260: 298-06.

Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MAM, Viveiros ATM. The success of out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.002

Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Silveira RV. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Braz Arch Biol Technol* 2006; 49: 651-59.

Melo FCSA, Godinho HP. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim Reprod* 2006;33: 380-85.

Oliveira AV, Viveiros ATM, Maria AN, Freitas RTF, Izau ZA. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*). In Portuguese, with abstract in English. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007;59: 1509-515.

Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Cosson J, Viveiros ATM. Extender component, osmolality and cryoprotectant effects on spontaneous motility, motility rate and duration of motility of fresh sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes) “ in press“ *Aquaculture*.

R Development Core Team, R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing. 2007.

Rosa RS, Lima FCT. Os peixes ameaçados de extinção. In: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (Eds), Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, Brazil, 2008, pp. 9-285.

Routray P, Dash SN, Dash C, Swain P, Sarkar SK, Sarangi N. Cryopreservation of silver barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) spermatozoa: effect of extender composition, cryoprotective agents and freezing rate on their postthawing fertilization ability. *Aquac Res* 2008;39: 1597- 605

Shimoda E, Andrade DR, Vidal Junior MV, Yasui GS, Silva JFS, Godinho HP, Souza G. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. In Portuguese with abstract in English. Rev. Ceres 2007;54: 430-33.

Tiersch TR. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. Rev Braz Zootec 2008; 37:15-19.

Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, Principles of laboratory animal science. Revised Edition. Elsevier B.V., 1993.

Velasco-Santamaría YM, Medina-Robles VM, Cruz-Casallas EP. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture 2006;256: 267-71.

Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiol Biochem 2009;35: 137-50.

Viveiros ATM, So N, Komen J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. Theriogenology 2000;54: 1305-308.

Viveiros ATM, Fessehaye Y, ter Veld M, Schulz RW, Komen. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. Aquaculture 2002;213: 373-86.

Viveiros ATM. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. Anim Breed Abst 2005;73:1-10

Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Allaman IB. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Anim Reprod Sci 2009;112: 293-300.