



NATÁLIA MICHELE NONATO MOURAD

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E O
EFEITO DE DILUIDORES NO RESFRIAMENTO DO SÊMEN
EM DUAS VARIEDADES DE TILÁPIA DO NILO**

LAVRAS - MG

2018

NATÁLIA MICHELE NONATO MOURAD

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E O EFEITO DE
DILUIDORES NO RESFRIAMENTO DO SÊMEN EM DUAS VARIEDADES DE
TILÁPIA DO NILO**

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

Profa. Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros Leal

Orientadora

Profa. Dra. Priscila Vieira e Rosa

Coorientadora

LAVRAS - MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mourad, Natália Michele Nonato.

Determinação das características seminais e o efeito de diluidores
no resfriamento do sêmen em duas variedades de tilápia do Nilo /
Natália Michele Nonato Mourad. - 2018.

73 p. : il.

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros Leal.

Coorientadora: Priscila Vieira e Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Oreochromis niloticus*. 2. Qualidade seminal. 3. Reprodução.
I. Leal, Ana Tereza de Mendonça Viveiros. II. Vieira e Rosa, Priscila.
III. Título.

NATÁLIA MICHELE NONATO MOURAD

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E O EFEITO DE
DILUIDORES NO RESFRIAMENTO DO SÊMEN EM DUAS VARIEDADES DE
TILÁPIA DO NILO**

**DETERMINATION OF SEMEN CHARACTERISTICS AND EFFECT OF
EXTENDERS ON COOLING STORAGE OF SEMEN ON TWO STRAINS OF NILE
TILAPIA**

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

APROVADA em 28 de Maio de 2018.

Profa. Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA
Profa. Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA
Profa. Profa. Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dr. Jose Fernando Lopez Olmeda	UMU

Profa. Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros Leal
Orientadora

Profa. Dra. Priscila Vieira e Rosa
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

Aos meus queridos pais,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter me sustentado em toda a minha caminhada.

Aos meus pais, Antoine e Leide, pela oportunidade que me proporcionaram de estudar, sempre me incentivando e apoiando, e por todo amor que eles têm por mim.

À minha professora, orientadora e amiga Ana Tereza de Mendonça Viveiros Leal, por acreditar em mim e me estender a mão quando eu mais precisava! Sempre presente, em todos os momentos, me apoiando, orientando, ensinando e aconselhando. Serei eternamente grata!

Ao professor Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, pela oportunidade e apoio.

À minha grande família, irmãos, sobrinhos, tios, primos, amigos e meus animais por me proporcionarem vários momentos de alegria e descontração. E em especial ao meu irmão Henrique, minha prima Fernanda e as amigas Drielle e Ana pela preocupação, apoio e por colaborarem, facilitando meus trabalhos.

Ao meu querido Romeu, por todo amor, cuidado e paciência que me dedica, além da paz que traz para a minha vida.

Ao meu grupo de trabalho, Antônio, Naiara, Romeu, Pedro, Camila, Júnior, pela ajuda, empenho, dedicação e ensinamentos. Sem vocês esse trabalho não seria possível!

Ao meu amigo Eleci, por todos os conselhos, apoio e colaboração durante todos esses anos. E aos meus amigos da piscicultura Tamira, Táfanie, Ariane, Leandro, Renan, Edgar, Kátia e Cristina por tornarem o trabalho mais divertido!

Ao professor Javier Sánches Vazquez pela oportunidade e confiança de trabalhar no seu laboratório de pesquisa na Universidad de Murcia, Espanha. Aos meus amigos do laboratório de fisiologia, em especial a Jose Fernando Lopez Olmeda pela sua amizade, hospitalidade e apoio sempre.

Às amigas Joziane, Janaína, Salete, Nayara e Érica que foram minha família quando estive fora e à minha amiga Karla, que me ensinou a passar pelos obstáculos com positividade! Aprendi muito com vocês!

À banca, por ter aceitado meu convite e por contribuir com este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, pelo seu ensino de excelência, ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e pela oportunidade de doutorado sanduíche.

RESUMO GERAL

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de peixe mais produzidas no mundo e para expandir ainda mais sua produção, a espécie tem sido alvo de programas de melhoramento genético. A variedade GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) foi desenvolvida, através de sucessivas seleções e cruzamentos, para características produtivas; já a variedade UFLA formou-se através de anos de seleção indireta para crescimento. No entanto, poucos estudos são realizados visando caracterizar e determinar o sêmen dessa espécie, para estabelecer protocolos de preservação e possibilitar a reprodução artificial. O objetivo desse estudo foi determinar e caracterizar o sêmen e o plasma seminal das variedades GIFT e UFLA, e testar o efeito de diluidores após a ativação do sêmen e durante 24 h de resfriamento. Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Lavras, utilizando-se machos reprodutores GIFT e UFLA. No primeiro experimento, foi coletado o sêmen de 14 machos (por variedade) e imediatamente analisado para volume seminal, concentração espermática, integridade de membrana, taxa de motilidade espermática subjetiva, vigor, duração da motilidade. Pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) foram avaliados a taxa de motilidade espermática, velocidade curvilínea (VCL) velocidade retilínea (VSL), velocidade média de percurso (VAP) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF). No plasma seminal foram avaliados o pH, osmolaridade e os íons (Na^+ , Ca^{2+} , K^+). No segundo experimento, o sêmen foi dividido nos tratamentos: controle não diluído, NaHCO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , KCl , CaCl_2 e glicose, e avaliado subjetivamente durante 24 h de resfriamento, para a taxa de motilidade espermática e vigor. No terceiro experimento, o sêmen de 5 machos (por variedade) foi coletado, diluído e avaliado pelo sistema CASA, para a taxa de motilidade e VCL, desde a sua ativação até 120 s. As análises estatísticas foram realizadas pelo software R, os dados submetidos a ANOVA, seguido pelo teste Scott-Knott, quando pertinente. No primeiro experimento, não houve diferença significativa entre as variedades para nenhum parâmetro de qualidade, avaliado no sêmen fresco e plasma seminal, sendo as médias para o sêmen de 0,76-0,79 mL de volume, $1,2-1,8 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} , 76% de espermatozoides intactos, 86-88% de motilidade subjetiva, 4,8-5,0 de vigor 1072-1163 s de duração da motilidade; as médias das análises do CASA de 69-77% de motilidade, 57-65 $\mu\text{m s}^{-1}$ de VCL e 18-20 Hz de BCF e as médias para o plasma seminal de 260-273 mOsm kg^{-1} de osmolaridade, 8,0 de pH, 149,6 mmol L^{-1} de Na^+ , 0,7 mmol L^{-1} de Ca^{2+} e 2,5 mmol L^{-1} de K^+ . No segundo experimento, a amostra controle ressecou, sendo possível apenas a análise no tempo 0h. Após uma hora da diluição as amostras em todos os tratamentos apresentaram taxa de motilidade superior à 50% e vigor superior 3,1 para a variedade GIFT e superior à 60% e 3,9 para variedade UFLA. Na sexta hora, as amostras de sêmen diluído em soluções que continham o íon de Na^+ e glicose apresentaram taxa de motilidade e vigor acima de 30% e 1,0 para a variedade GIFT e para a variedade UFLA, 60% e 2,2. No terceiro experimento, após 10 s de ativação não foram observadas diferenças entre os tratamentos para a taxa de motilidade para as variedades. Após 30 s da ativação, taxas de motilidade superior a 50% foram observadas em todos os tratamentos, exceto para NaHCO_3 para a variedade GIFT; para a variedade UFLA somente as amostras controle e sêmen diluído em KCl e glicose apresentaram motilidade superior a 50%. Com relação a VCL, a variedade UFLA manteve por mais tempo as velocidades do que a variedade GIFT. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a seleção de machos GIFT para crescimento rápido não afetou os parâmetros reprodutivos do sêmen *in natura* quando comparados aos machos da variedade UFLA. No entanto, sêmen dos machos da variedade UFLA é mais resistente ao resfriamento. As soluções de NaCl e glicose podem ser utilizadas como diluidores de sêmen de *O. niloticus*.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*. Qualidade seminal. Reprodução. CASA.

GENERAL ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the second most produced fish species in the world and, to further expand its production, the species has been the object of breeding programs. The GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) strain was developed by successive selections and crosses seeking productive characteristics. The UFLA strain was formed after years of indirect selection for growth. However, few studies are conducted aiming to characterize and determine the semen of this species, to establish preservation protocols, and to enable artificial reproduction. The objective of this study was to determine and characterize the sperm and seminal plasma of GIFT and UFLA strains and to test the effect of extenders after sperm activation and during 24 hours of refrigeration. The experiments were conducted at the Federal University of Lavras using GIFT and UFLA broodstock males. For the first experiment, sperm was collected from 14 males (per strain) and immediately analyzed to determine sperm volume, spermatic concentration, membrane integrity, subjective spermatic motility rate, subjective velocity score and motility duration. Using the CASA system (Computer Assisted Sperm Analysis), the spermatic motility rate, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), and beat cross frequency (BCF) were evaluated. The pH, osmolality, and ions (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) concentration were evaluated to determine the seminal plasma. In the second experiment, the semen was divided into the following treatments: undiluted control, and diluted in NaHCO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , KCl , CaCl_2 and glucose solutions, and subjectively evaluated during 24 hours of cooling storage for spermatic motility rate and velocity score. For the third experiment, sperm of 5 males (per strain) was collected, diluted, and evaluated under the CASA system to determine motility rate and VCL during 120 seconds post-activation (SPA). Statistical analyses were carried out using the R software, and the data were submitted to ANOVA, followed by the Scott-Knott test, where relevant. For the first experiment, there was no significant difference between the strains for any of the quality parameters evaluated in fresh sperm and seminal plasma. The means for fresh sperm were of 0.76-0.70 mL of volume, $1.2\text{-}1.8 \times 10^9$ spermatozoa mL^{-1} , 76% of intact sperm, 86-88% of subjective motility, 4.8-5.0 of velocity score, and 1072-1163 s of motility duration. The CASA analyses presented means of 69-77% of motility, 57-65 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VCL and 18-20 Hz of BCF. The means for seminal plasma were of 260-273 mOsm kg^{-1} of osmolality, 8.0 of pH, 149.6 mmol L^{-1} of Na^+ , 0.7 mmol L^{-1} of Ca^{2+} and 2.5 mmol L^{-1} of K^+ . For the second experiment, the undiluted control sample dried, allowing only the analysis at time 0 h. One hour after dilution, samples of all treatments yielded motility rate and subjective velocity higher than 50% and 3.1 for the GIFT strain and higher than 60% and 3.9 for the UFLA strain. Six hours after dilution, sperm samples diluted in solutions containing Na^+ and glucose presented motility rate and subjective velocity score above of 30% and 1.0 for the GIFT strain and for the UFLA strain of 60% and 2.2. For the third experiment, no differences were observed between treatments for the motility rates of both strains, at 10 SPA. After 30 s SPA, motility rates were higher than 50% were observed for all treatments except for those samples diluted in NaHCO_3 for the GIFT strain. For the UFLA strain, only the undiluted control and diluted in KCl and glucose samples presented motility above 50%. Regarding the VCL, the UFLA strain maintained speeds longer than the GIFT strain. In conclusion, the selection of GIFT males for rapid growth did not affect the reproductive parameters of sperm *in natura* when compared to the UFLA strain. Sperm of UFLA males is more resistant to cool storage. Solutions NaCl and glucose can be used as extenders for the semen of *O. niloticus*.

Keywords: *Oreochromis niloticus*. Seminal quality. Reproduction. CASA.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Exemplar de *Oreochromis niloticus*. 13
- Figura 2 - Bacia hidrográfica do rio Nilo, de onde *O. niloticus* é originária..... 14
- Figura 3 - Mapa mundial de ocorrência de *O.niloticus*. 15

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 2

- Figura 1 - Taxa de motilidade subjetiva (%) e vigor espermático (0-5) das amostras de sêmen nos diferentes tratamentos, durante o resfriamento de 24 h. 56
- Figura 2 - Comparação entre as duas variedades, através dos parâmetros taxa de motilidade subjetiva (%) e vigor espermático (0-5) das amostras de sêmen diluído nos diferentes diluidores no tempo de 6 h após a diluição e resfriamento. 60

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1. Body weight, standard length and sperm features (mean \pm standard deviation) of <i>Oreochromis niloticus</i> males from two different strains.	44
Table 2. Sperm motility rate, velocities and beat cross frequency (mean \pm standard deviation) determined using the CASA system, of <i>Oreochromis niloticus</i> males from two different strains.	45
Table 3. Seminal plasma osmolality, pH and ion concentration (mean \pm standard deviation) of <i>Oreochromis niloticus</i> males from two different strains.	45

ARTIGO 2

Tabela 1 - Composição das diferentes soluções diluidoras testadas no presente estudo. Após o preparo, a osmolalidade de cada solução foi ajustada para ~ 300 mOsm kg ⁻¹	52
Tabela 2 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído), por meio da taxa de motilidade subjetiva (%), dentro de cada tempo (h) após a diluição, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=14, média \pm DP).....	57
Tabela 3 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído) por meio do vigor (0-5), dentro de cada tempo (h) após a diluição, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=14, média \pm DP).	58
Tabela 4 - Análise de regressão linear ($Y = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$) indicando a hora máxima que a motilidade se mantém em até 30% para cada tratamento.	59
Tabela 5 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído) por meio da taxa de motilidade (%), dentro de cada tempo (s) após a ativação, utilizando o sistema CASA, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=5, média \pm DP).....	62
Tabela 6 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído), por meio da velocidade curvilínea (μ s ⁻¹), dentro de cada tempo (s) após a ativação, utilizando o sistema CASA, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=5, média \pm DP).....	63

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Caracterização da espécie	13
2.1.1	Variedade GIFT	16
2.1.2	Variedade UFLA	16
2.2	Relevância no estudo do sêmen de peixes	17
2.3	Características do sêmen	17
2.3.1	Volume e concentração	18
2.3.2	Motilidade espermática, vigor e duração da motilidade	19
2.3.3	pH, osmolalidade e íons	20
2.4	Técnica de resfriamento do sêmen.....	21
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS	23
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	28
	ARTIGO 1 - DETERMINATION OF SPERM AND SEMINAL PLASMA FEATURES OF TWO GENETIC STRAINS OF NILE TILAPIA <i>Oreochromis niloticus</i>	28
	ARTIGO 2 - EFEITO DE DILUIDORES NO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DE SÊMEN DE DUAS VARIEDADES DE TILÁPIA DO NILO	46

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda mundial por alimentos tem exigido cada vez mais a otimização da cadeia produtiva. Dentro deste contexto, o setor piscícola, que é o de maior crescimento anual, tem passado por várias modificações, a fim de atender o mercado.

Como forma de se obter alimentos de qualidade, através de uma produção eficiente, com animais de alto desempenho (rápido ganho de peso, melhor conversão, maior rendimento de file) e resistência a patógenos, tem-se utilizado programas de melhoramento genético, com a finalidade de agregar ao animal, o máximo de características de interesse para a produção.

No entanto, apesar do alto potencial de ganho genético da maioria das espécies aquícolas, o melhoramento genético de peixes tem progredido pouco devido a alguns entraves na produção, como a dificuldade de acurácia dos dados de parentesco e dos próprios indivíduos, desuniformidade dos lotes devido ao efeito ambiente e cuidado parental.

Para conseguir tal progressão, é preciso realizar um controle minucioso dos indivíduos e das famílias, possibilitando o cruzamento ideal para a seleção das características pretendidas, e isso pode ser alcançado através da reprodução artificial. Portanto é imprescindível conhecer e compreender a biologia reprodutiva da espécie em questão, para obter uma reprodução eficaz com acurácia dos dados, atendendo assim os aspectos de um manejo sustentável e culminando em viabilidade econômica do cultivo.

Atualmente, no manejo reprodutivo tem-se utilizado biotécnicas e práticas de preservação de gametas que facilitam o controle da reprodução, através da fertilização artificial. A manipulação seminal é de grande importância, uma vez que a disseminação genética através do sêmen apresenta vantagens em relação às fêmeas, como a possibilidade de estocagem sob refrigeração ou congelamento.

Ainda dentro do cenário aquícola, a tilapicultura possui grande importância, visto que é a criação de peixes de maior produção nacional e segunda produção em escala mundial, justamente pela tilápia apresentar características como adaptabilidade e tolerância a uma ampla gama de ambientes, resultando em uma rápida expansão da produção. Além disso, apresenta rápido crescimento, carne de ótima qualidade e boa aceitação no mercado nacional. Para intensificar ainda mais essa produção, programas de melhoramento eficientes serão cruciais no desenvolvimento da atividade.

Entretanto, pelo fato da tilápia se reproduzir naturalmente em cativeiro, pouca importância se dá para realização de estudos mais aprofundados a respeito da sua reprodução, tornando muito difícil a aplicação de biotecnologias e, conseqüentemente, a utilização da reprodução artificial. A reprodução natural dessa espécie aliada a sua maturação sexual precoce é um complicador nos métodos de avaliação genética dos indivíduos ou das famílias e na predição acurada de seus valores genéticos. Sendo assim, faz-se necessário estudos que venham elucidar algumas dessas questões.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Perciformes;

Família: Cichlidae;

Subfamília: Pseudocrenilabrinae;

Gênero: *Oreochromis*;

Espécie: *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758).

Figura 1 - Exemplar de *Oreochromis niloticus*.



Fonte: Da autora (2017).

Popularmente conhecida como tilápia do Nilo ou tilápia nilótica (FIGURA 1), a tilápia é uma espécie de peixe originária da África (FIGURA 2). Aproximadamente 80% das tilápias produzidas no mundo são da espécie *Oreochromis niloticus*, sendo difundidas mundialmente (FIGURA 3) a partir da década de 60 e introduzidas no Brasil na década de 70 (MORO et al., 2013). No Brasil, a produção de tilápia apresentou um crescimento de 118% entre os anos de 2006 e 2010, saindo de 71.253 para 155.450 toneladas, o que representou 39,5% do total do pescado proveniente da piscicultura continental (MPA, 2012). Em 2015, sua produção chegou a aproximadamente 239 mil toneladas (IBGE, 2016).

De coloração acinzentada a tilápia do Nilo possui corpo comprimido lateralmente e com a linha lateral dividida em dois segmentos. É um peixe de grande rusticidade, adaptabilidade a diversos sistemas de produção e tolerância a uma ampla faixa de temperatura (em ambientes de água doce, de 14 a 33°C), a uma baixa concentração de oxigênio dissolvido na água e a alta concentração de amônia. Apresenta tolerância também a variações de salinidade e a altas densidades. De hábito alimentar onívoro, em ambiente natural, alimenta-se principalmente de fitoplâncton, algas bentônicas, insetos aquáticos, pequenos crustáceos, entre outros, aceitando bem ração em sistemas de produção (KUBITZA, 2000; MORO et al., 2013).

Figura 2 - Bacia hidrográfica do rio Nilo, de onde *O. niloticus* é originária.



Fonte: Geografia News (2018).

2.1.1 Variedade GIFT

O objetivo de desenvolver a variedade GIFT foi de estudar e melhorar os parâmetros genéticos de *O. niloticus* de crescimento, sobrevivência, resistência a doenças, cor da pele, conformação corporal e tolerância ao frio de *O. niloticus*, tornando uma variedade muito atraente e promissora, capaz de aumentar a produção e a exportação para mercados nos países em desenvolvimento (EL-SAYED, 2003).

O programa GIFT envolveu quatro variedades silvestres de tilápias capturadas em 1988-1989 no Egito, Gana, Quênia e Senegal, e quatro variedades confinadas, introduzidas nas Filipinas de 1979 a 1984, obtidas de Israel, Singapura, Tailândia e Taiwan (BENTSEN et al., 1998).

Em 2005 trinta famílias de tilápias GIFT foram introduzidas no Brasil sendo o primeiro programa de melhoramento genético de peixes conduzido no país, realizando estudos para a avaliação genética, utilizando métodos quantitativos com controle individual de pedigree e seleção, sob as condições ambientais do país. Este programa teve como ponto de partida uma parceria entre a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e o *World Fish Center* (Malásia), de onde foram importadas (SANTOS et al., 2011).

2.1.2 Variedade UFLA

A variedade UFLA é formada a partir de tilápias nilóticas de diferentes origens, principalmente da variedade Bouaké, originária da Costa do Marfim (África), e introduzida no Brasil em 1971 (FREATO, 2009).

Esta variedade encontra-se na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, onde sofreu décadas de seleção massal (DIAS, et al., 2016), indiretamente para crescimento e foi adaptada a uma região cujo clima é temperado úmido com chuvas de verão e inverno seco (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007; SÁ JUNIOR et al., 2012; ALVARES et al., 2013), onde as temperaturas anuais podem variar de 8 a 34 °C.

A variedade UFLA foi geneticamente caracterizada pela primeira vez por Dias et al. (2016). Os autores afirmam que devido à sua origem única e distinção genética, a variedade UFLA pode vir a ser um importante recurso para o melhoramento genético da tilápia do Nilo e uma das vantagens, seria por sua adaptação local. Além disso, testes de performance realizados com a variedade, demonstraram o grande potencial de crescimento sob condições intensivas de cultivo (FREATO et al., 2012).

2.2 Relevância no estudo do sêmen de peixes

Várias características referentes à biologia seminal de peixes de água doce já foram estudadas, como a imobilidade dos espermatozoides no sêmen *in natura*, a curta duração da sua motilidade após ativação e a necessidade de diluição em meio hiposmótico para a iniciação do movimento espermático (BILLARD e COSSON, 1992).

O conhecimento da biologia seminal de cada espécie é cada vez mais solicitado, principalmente em função da necessidade de selecionar um sêmen de boa qualidade (SHIMODA, 2004) o que auxiliaria na eficiência de programas de melhoramento que são cruciais para o desenvolvimento da tilapicultura, por exemplo, não só para atender à crescente demanda mundial por pescado, mas também para reduzir os custos de produção, melhorar a resistência a doenças, bem como, a conversão alimentar e a qualidade dos produtos (GJEDREM, 2000).

2.3 Características do sêmen

As características seminais possuem ampla variação entre as espécies de peixes e a sua importância está na avaliação da qualidade do sêmen coletado otimizando sua utilização no processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005). Para a descrição de um perfil espermático são analisadas as características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor espermático e concentração) e as características morfológicas dos espermatozoides (ROUTRAY et al., 2007).

O sêmen é composto pelo plasma seminal e pelos espermatozoides. Contudo, a composição bioquímica e a concentração dos componentes do plasma seminal também variam de acordo com as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se às diferentes concentrações de proteínas, lipídios e sais. A função do plasma seminal é promover um ótimo ambiente para o armazenamento dos espermatozoides dentro e fora das gônadas (CIERESZKO et al, 2000; LAHNSTEINER et al., 1996).

Os espermatozoides podem ser, morfológicamente, subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda (COWARD et al., 2002; NAGAHAMA, 1983), sendo que na maioria das espécies de peixes, a cabeça do espermatozoide apresenta ausência do acrossoma. Essa ausência é suprida pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovócito para a penetração do mesmo (GANECO e NAKAGHI, 2003). Isso demonstra que a morfologia dos espermatozoides reflete o seu modo de fertilização (COSSON et al., 1999). A peça

intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice, responsável pela geração de energia necessária à propulsão móbil dos espermatozoides. A cauda, ou flagelo, é responsável pela sua movimentação (HAFEZ, 2004).

Outra particularidade do sêmen de peixes é que, enquanto estiverem em contato com o líquido seminal, ou em qualquer solução de osmolaridade semelhante ao líquido seminal, os espermatozoides de grande parte dos peixes são imóveis. Sua motilidade inicia quando há uma alteração na osmolaridade do meio em que se encontram.

2.3.1 Volume e concentração

Para avaliar a qualidade do sêmen coletado, é importante conhecer os valores do volume e concentração seminal, que apresentam ampla variação nas diferentes espécies de peixes e mesmo dentre indivíduos de uma mesma espécie (VIVEIROS, 2005). Ambos estão intimamente ligados a idade e ao tamanho do reprodutor, à época do ano em que ele foi obtido (se foi coletado no início ou no final do período reprodutivo) ao período de repouso sexual e à metodologia utilizada na sua obtenção (BEDORE, 1999; SHIMODA, 1999; SILVA, 2007).

O volume seminal pode ser afetado por tratamentos hormonais, como extrato de hipófise de carpa e gonadotrofina coriônica humana, sendo observado um aumento no volume da maioria das espécies de peixes que recebem tratamento (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Contudo, este volume está mais associado com uma maior fluidez do sêmen produzido do que com o aumento do número das células (ZANIBONI FILHO e WEINGARTNER, 2007).

A concentração espermática, também pode ser considerada um importante indicador na avaliação da qualidade do sêmen, uma vez que, é uma característica de fácil mensuração e pode ser feita imediatamente após a coleta. No entanto, assim como o volume, possui grande variação entre as espécies, podendo variar de acordo com a época do ano, frequência de coleta e até mesmo com o próprio volume seminal (SILVA et al., 2009), fazendo com que não se torne um método tão sensível e específico (MURGAS et al., 2015).

Expressa a quantidade de espermatozoides por grama de testículo (células/g), por peixe (células/peixe), ou ainda, por volume de sêmen (células/mL). Este é o mais apropriado, podendo ser determinado pela contagem em câmaras volumétricas, mediante diluição do sêmen. O método mais comum para a determinação da concentração espermática (células espermáticas/mL de sêmen) é a contagem por meio de uma câmara hematómica, como a de Neubauer (GEFFEN e EVANS, 2000; VIVEIROS et al., 2014; WILLIOT; KOPEIKA; GONCHARO, 2000).

Apesar da concentração não ser uma medida específica da capacidade de fertilização do sêmen; é essencial observar que é uma característica relativamente importante, quando se fertilizam ovos com um volume seminal constante (RURANGWA et al., 2004), pois como foi citado acima, é um parâmetro bastante variável.

2.3.2 Motilidade espermática, vigor e duração da motilidade

Motilidade espermática é a medida da capacidade de movimentação do espermatozoide. A avaliação da motilidade espermática tem sido considerada um dos principais parâmetros na análise da qualidade de sêmen em peixes. É importante salientar que a motilidade é influenciada por diversos fatores como temperatura, nível nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas, espécie estudada, variações genéticas e ambientais (BILLARD e COSSON, 1992; KOPEIKA e KOPEIKA, 2008; MURGAS et al., 2015).

Existem meios avançados para a avaliação da taxa de motilidade espermática, como o CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), um sistema de análise computadorizado de sêmen. Este é composto por microscópio óptico conectado diretamente a um computador equipado com software analisador de imagens. Embora seja um equipamento de precisão nas análises, não é utilizado comumente em estações de piscicultura no país, devido a seu elevado custo, associado a dificuldade em seu transporte. Por isso, na rotina das estações de piscicultura, a motilidade do sêmen é feita subjetivamente com um microscópio de luz (400x) por um técnico treinado em laboratório. Na mesma lâmina, pode-se avaliar o vigor espermático, que é caracterizado numa escala subjetiva de 0 (espermatozoides estáticos) a 5 (espermatozoides com máxima velocidade) (VIVEIROS et al., 2011; VIVEIROS et al., 2014).

Geralmente, o sêmen fresco de peixes neotropicais apresenta motilidade espermática alta, frequentemente acima de 70%, quando ativado (VIVEIROS e GODINHO, 2009). No entanto, embora não haja nenhum valor mínimo estipulado para os parâmetros de motilidade espermática em peixes, que seja capaz de garantir a eficácia deste sêmen, os valores acima de 70% de peixes são preconizados como um parâmetro de garantia para a qualidade do sêmen. (MURGAS et al., 2015).

Após iniciada a motilidade, o espermatozoide tem pouco tempo (geralmente cerca de 1-2 minutos) para fertilizar um ovócito. Este tempo deve ser o suficiente apenas para que o mesmo alcance a micrópila antes dela se fechar. No entanto, em algumas espécies, os espermatozoides permanecem móveis por mais tempo (VIVEIROS et al., 2011).

A análise da duração da motilidade espermática deve ser realizada ainda na mesma lâmina que a taxa de motilidade e vigor, com o auxílio de um cronômetro acionado no instante da adição da solução ativadora e interrompido quando apenas 10 a 20% dos espermatozoides ainda estão móveis (VIVEIROS et al., 2014).

A redução na duração da motilidade dos espermatozoides pode ser considerada, em partes, pelo declínio do estoque de energia, ocorrido no período de mobilidade (MURGAS et al., 2011). Em peixes de água doce varia entre as espécies e os indivíduos, devido a fatores como o estado nutricional e estado fisiológico. (MURGAS et al., 2015).

2.3.3 pH, osmolalidade e íons

Quando se deseja diluir o sêmen, seja para aumentar o volume ou até mesmo para conservá-lo, é muito importante conhecer bem os componentes plasmáticos do mesmo como pH, osmolaridade e íons por exemplo. Um diluidor de sêmen deverá ter o pH e a osmolaridade semelhantes para evitar a ativação da motilidade espermática (VIVEIROS et al., 2014).

O pH é estudado como um importante fator na ativação do sêmen, para muitas espécies de peixes (ALAVI e COSSON, 2005). Estudos relatam que o pH interno dos espermatozoides varia em paralelo com o pH externo, sendo o primeiro cerca de 1 unidade de pH abaixo do segundo (BILLARD, 1986; GATTI et al., 1990).

A osmolalidade (mOsm kg^{-1}) ou osmolaridade (mOsm L^{-1}) também possui grande importância na ativação espermática. Ela pode ser definida como a concentração total de solutos em solução, com a propriedade de exercer uma pressão denominada de pressão osmótica, que regula a relação de soluto e solvente dos dois lados de uma membrana (MARTÍNEZ; ATENCIO; PARDO, 2011).

A osmolalidade isotônica do plasma seminal suprime a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce (TAKAI e MORISAWA, 1995), sendo a diferença entre o plasma seminal e outra solução a responsável pela ativação parcial ou total dos espermatozoides (SHIMODA, 1999). Assim, os espermatozoides de peixes são ativados em soluções hiposmóticas para as espécies de água doce e em soluções hiperosmóticas para as espécies marinhas (COSSON, 2004). O plasma seminal de peixes apresenta uma osmolalidade de 230 a 346 mOsm/Kg para espécies de água doce e 249 a 400 mOsm/Kg para espécies marinhas (DZYUBA; COSSON, 2014).

Outro fator a ser considerado é a composição iônica do plasma seminal, sendo esta bastante variável tanto inter quanto intra-espécie. De uma maneira geral, os principais íons presentes no plasma seminal são o Na^+ , K^+ e Cl^- . No entanto, a presença dos íons K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , é que está relacionada com a ativação espermiática. Cada espécie apresenta uma susceptibilidade diferente aos efeitos causados pelos íons (ALAVI e COSSON, 2006; COSSON, 2010).

2.4 Técnica de resfriamento do sêmen

O resfriamento de sêmen é uma técnica simples e prática, também conhecida como preservação de sêmen a curto prazo, que consiste em manter a viabilidade dos espermatozoides por um período de tempo em temperaturas de refrigeração, para serem utilizados em seguida na fertilização (VIVEIROS et al., 2014). Pode ser utilizada nas pisciculturas, em programas de preservação de espécies, para facilitar a troca de materiais genéticos e utilização de um maior número de peixes em programas de melhoramento (MARQUES e GODINHO, 2004).

De acordo com Stoss e Donaldson (1982), os principais fatores para o sucesso de um resfriamento são: redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e prevenção da dessecação.

Neste contexto, o processo de resfriamento deve utilizar uma solução diluidora isotônica que permita um aumento da superfície de contato dos espermatozoides com o meio, diminuindo, portanto, a competição por espaço e oxigênio (CAROLSFELD e HARVEY, 1999). Além disso, o sêmen deve ser armazenado em tubos abertos ou em recipientes fechados (desde que tenham recebido oxigênio), permitindo assim uma troca gasosa adequada (VIVEIROS et al., 2014).

Os diluidores são soluções adicionadas ao sêmen, cuja função é manter sua viabilidade durante a redução da temperatura. Um diluidor adequado deve ter: isotonicidade, estabilidade, condutividade térmica elevada, esterilidade e servir de carreador de crioprotetores (LEGENDRE e BILLARD, 1980). A obtenção de tal solução não é sempre uma tarefa simples, devido à complexidade dos diversos componentes plasmáticos do sêmen. Por isso, apesar de tamanha importância os poucos trabalhos existentes na literatura que retratam a reprodução de tilápias, utilizam diluidores já consagrados para outras espécies de peixes.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para uma produção eficaz é necessário conhecer a espécie em questão em todos os seus âmbitos. No entanto, apesar da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ser a espécie de peixe mais cultivada em nosso país, existem algumas questões que de alguma forma, tem sido negligenciadas. Por reproduzir-se naturalmente, várias vezes ao ano e pela baixa quantidade de gametas liberado, em relação às espécies de piracema, existe uma escassez de estudos e dados na literatura envolvendo alguns aspectos da sua reprodução.

Entretanto informações como a caracterização e determinação dos gametas, bem como o estabelecimento de protocolos de manipulação e preservação dos mesmos que possam culminar em um controle de sua reprodução, é suma importância, seja para produção de alevinos, ou para implementação de programas de melhoramento genético e até mesmo no desenvolvimento de uma dieta específica para reprodutores, possibilitando assim, uma intensificação da produção piscícola.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell biology international**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.
- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (I) Effects of temperature and pH. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- BEDORE, A.G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- BENTSEN, H.B.; EKNATH, A.E.; PALADA-DE VERA, M.S.; DANTING, J.C.; BOLIVAR, H.L.; REYES, R.A.; DIONISIO, E.E.; LONGALONG, F.M.; CIRCA, A.V.; TAYAMEN, M.M.; GJERDE, B. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 160, n. 1, p. 145-173, 1998.
- BILLARD, R.; COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-13, 1992.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento brasileiro. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999.
- CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editors. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, p 20-48, 2000.
- COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short- term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, 2010.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Cork, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.
- COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186, 1999.

COWARD, K. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.12, p. 33-58, 2002.

DANTAS, A.A.A., CARVALHO, L. G., FERREIRA, E. Comunicação classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, 2007.

DE GRAAF, G.J.; GALEMONI, F.; HUISMAN, E.A. Reproductive biology of pond-reared Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 25-33, 1999.

DIAS, M.A.D.; FREITAS, R.T.F.; ARRANZ, S.E.; VILLANOVA, G.V.; HILSDORF, A.W.S. Evaluation of the genetic diversity of microsatellite markers among four strains of *Oreochromis niloticus*. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, v. 47, p. 345–353, 2016.

DZYUBA, V.; COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive biology**, Olsztyn, v. 14, n. 3, p. 165-175, 2014.

EL-SAYED, A.F.M. Effects of fermentation methods on the nutritive value of water hyacinth for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture**, v. 218, p. 471-478, 2003.

ENGLE, C.R. **Economics of tilapia aquaculture**. In: COSTAPIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (Eds.). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, v. 1, p. 229-243, 1997.

FREATO, T.A.; FREITAS, R.T.F.; PIMENTA, M.E.S.G.; OLIVEIRA, G.R.; REIS NETO R.V.; MATTOS, B.O. Evaluation of Nile tilapia strains cultivated in cages under different feeding programmes. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 41, p. 1332–1336, 2012.

GANECO, L.N.; NAKAGHI, L.S.O. Morfologia da micrópila e da superfície de ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (*Osteichthyes*, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, p. 227-231, 2003.

GATTI, J.L.; BILLARD, R.; CHRISTEN, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: role in the initiation of motility. **Journal of Cell Physiology**, New York, v. 143, n. 3, p. 546-544, 1990.

GEFFEN, A.J.; EVANS, J.P. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, 2000.

GEOGRAFIA NEWS. Disponível em: <<https://www.geografianews.com/single-post/2017/07/21/Duelo-de-Gigantes-Nilo-x-Amazonas>>; <http://d-maps.com/pays.php?num_pay=327&lang=pt> Data de Acesso em: 09 mar. 2018.

GBIF | Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/4285694>> Acesso em: 09 mar. 2018.

GJEDREM, T. Genetic improvement of cold-water species. **Aquaculture**, v. 31, p. 25-33, 2000.

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

IBGE - **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Pesquisa Pecuária Municipal, 2016. [online] Disponível em:< <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>>. Acesso em: 14 maio 2018.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S.N.H. et al. (Ed). **Fish Spermatology**. Alpha Science International, Oxford, UK, p. 347-397, 2008.

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí, 285-289p. 2000.

LAHNSTEINER, F. et al. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 167-179, 1996.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

MANSOUR, C.R. **Nutritional requirements of Nile tilapia broodstock reared at different water salinities**. Tese (Doutorado), Universidade de Alexandria, Alexandria, Egito. 2001.

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, 2004.

MARTÍNEZ, G.; ATENCIO, V.; PARDO, S. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v. 16, n. 2, p. 2554-2563, 2011.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil, 2012**.

MORO, G.V. et al. Espécies de peixes para a piscicultura. In: RODRIGUES, P.O. et al. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento**. 1ª Edição. Brasília, DF: EMBRAPA Pesca e Aquicultura, p. 50-51, 2013.

MURGAS, L.D.S. et al. Avaliação de Parâmetros Reprodutivos em Peixes Nativos. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. 1ª Edição. São Carlos - SP: Pedro & João Editores, v. 2, p. 448-454, 2015.

MURGAS, L.D.S. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 186-191, 2011.

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

NOAKES, D.G.L.; E.K. BALON. Life histories of tilapias: an evolutionary perspective. In: PULLIN, R.S.V.; LOWE-MCCONNELL, R.H. **International conference on the biology and culture of tilapias**. Proceedings. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, v. 7, p. 61-82, 1982.

POPMA, T.J.; PHELPS, R.P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling production techniques. In: Aquicultura Brasil'98, 1, Recife. **Anais...** Recife: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, p. 127-145, 1998.

POPMA, T.J., GREEN, B.W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds**. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University, Alabama, 15p., 1990.

ROUTRAY, P. et al. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 413-427, 2007.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, 2004.

SÁ JÚNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F.; ALVES, M.C. Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, n. 1, p. 1-7, 2012.

SANTOS, A.I.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; MORA, F.; ALEXANDRE FILHO, L.; FORNARI, D.C.; OLIVEIRA, S.N. de. Bayesian genetic parameters for body weight and survival of Nile tilapia farmed in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p. 33- 43, 2011.

SILVA, J.M.A. et al. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 668-677, 2009.

SILVA, J.M.A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2007.

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae)**. 2004. 121 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R J. 2004.

SHIMODA, E. **Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 1999. 61 p. Dissertação (Mestrado em produção animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 1999.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservation of fish gametes. In: GOOS, H.J.Th., RICHTER, C.J.J. **Proceedings of the International Symposium Reproduction Physiology Fish**. Wageningen, The Netherlands p. 114-122, 1982.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, n. 108, p. 1175-1181, 1995.

VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; LEAL, M.C. Biologia e Conservação de Espermatozoides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. 1ª Edição. EDITORA FUNEP, p.307-327, 2014.

VIVEIROS, A.T.M.; LEAL, M.C.; SALLUM, W.B. **Reprodução das Principais Espécies de Peixes Nativos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 94p., 2011.

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

VIVEIROS, A.T.M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia. **Anais... XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. CD. 2005.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E.F.; GONCHARO, B.F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri Brandt*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, n. 1/2, p. 53-61, 2000.

YASUI G.S. et al. Cultivo monossexual de tilápias: importância e obtenção por sexagem e inversão sexual. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 49, p. 46-69, 2006.

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

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - DETERMINATION OF SPERM AND SEMINAL PLASMA FEATURES
OF TWO GENETIC STRAINS OF NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus***

(VERSÃO PRELIMINAR)

**Artigo preparado de acordo com a norma para submissão do periódico internacional
Aquaculture.**

26 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VCL and 18-20 Hz of BCF. Seminal plasma possessed a mean of 260-273 mOsm
27 kg^{-1} of osmolality, 8.0 of pH, $149.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}^+$, $0.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ and $2.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$
28 concentration. According to the results found in this study, it can be concluded that the
29 selection of GIFT males for fast growth did not affect the reproductive parameters when
30 compared to males of UFLA strain (under natural selection).

31

32 **Keywords:** Fish. Reproduction. Semen. CASA. Sperm motility.

33

34 **1 Introduction**

35 Tilapias are representatives of the Perciformes Order, Cichlidae Family and are originated
36 from Africa, Israel and Jordan. These species have been worldwide distributed since the
37 1960's, and introduced to Brazil in the 1970's (Moro et al., 2013). In Brazil, tilapia
38 production increased 118%, from 71,253 in 2006 to 155,450 tons in 2010 (MPA, 2012).
39 Despite the large number of species in each genus, approximately 80% of the tilapias
40 produced in the world are *Oreochromis niloticus*, known as Nile Tilapia (Moro et al., 2013).
41 Rearing in captivity has allowed a better follow-up of tilapia reproductive efficiency. Under
42 favorable rearing conditions, tilapia reaches sexual maturity with a body weight ranging from
43 150 to 250 g, although sexual maturation has been reported at only 25-32 g (El-Sayed et al.,
44 2003; El-Sayed; Mansour; Ezzat, 2005).

45 Selective breeding programs have been developed for tilapia farming to increment
46 commercial production with the objective of selection, mainly for weight gain and fillet yield
47 (Gjerde et al., 2012; Nguyen et al., 2010). A successful example of selective breeding
48 program is a project conducted by WorldFish the Genetic Improvement of Farmed Tilapia
49 (GIFT), selecting a strain for weight gain for twelve generations and achieving genetic gain of
50 over 100% (WorldFish, 2018; Ponzoni, et al., 2011). The GIFT program involved four wild

51 strains of tilapia, caught in 1988-1989 in Egypt, Ghana, Kenya and Senegal, and four
52 confined strains introduced in the Philippines from 1979 to 1984 from Israel, Singapore,
53 Thailand and Taiwan (WorldFish, 2018).

54 In Brazil, there is a tilapia strain well adapted to the climate of the South of Minas Gerais
55 State, Brazil (21°S 44°W), where summers are rainy and winters are dry with temperatures
56 reaching values such as 8 °C at 34 °C. This strain has been reared under unassisted breeding
57 and indirect selection for growth at Fish Culture Station of Federal University of Lavras
58 (UFLA) since the beginning of the 1970's, when Nile tilapias mainly from the Bouaké strain
59 from the Ivory Coast in Africa were introduced to Brazil. The UFLA strain was genetically
60 characterized for the first time by Dias et al. (2016). As reported previously, UFLA strain
61 individuals show great growth potential and weight gain when reared in floating cages in this
62 region (Freato et al., 2012).

63 Because tilapia naturally spawn in captivity and is unresponsive to most of hormone-inducing
64 spawning treatments, studies regarding controlled artificial reproduction have received little
65 attention. This natural spawning is a complicating factor for genetic evaluation of individuals
66 or families, accurate prediction of genetic values, and for the evaluation of gamete production
67 and gamete quality parameters.

68 In the present study, sperm and seminal plasma features of Nile tilapia males of GIFT strain
69 were determined and compared to that of males kept under indirect selection for growth
70 (UFLA strain). Sperm was evaluated for volume, concentration, membrane integrity,
71 subjective motility rate, subjective velocity score and duration of sperm motility, as well as
72 for motility rate, velocities and beat-cross frequency under the CASA system. Seminal plasma
73 was evaluated for osmolality, pH and ion concentration (Na^+ , Ca^{2+} and K^+).

74 **2 Materials and Methods**

75 All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of Animal Use at the
76 Federal University of Lavras - UFLA (CEUA Protocol N°016/13), Lavras, Minas Gerais,
77 Brazil.

78

79 *2.1 Fish handling and installations*

80 Fourteen *Oreochromis niloticus* males of the GIFT strain and 14 of the UFLA strain, with
81 detectable running sperm under soft abdominal pressure, were selected from concrete ponds at
82 UFLA Fish Culture Station (21°13'52.5"S 44°59'13.2"W). Males were anesthetized with
83 clove oil (WNF Indústria e Comércio, São Paulo, Brazil), identified with subcutaneous
84 microchip and transferred to two indoor 500-L plastic box (one box per strain), in an aerated
85 flow through system, at 28°C, under constant photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark.
86 There were no females present, so the males were in sexual resting. Water temperature and
87 oxygen (Pro20, Yellow Springs, Ohio, USA) were measured twice a day, and pH and
88 ammonia (aquarium kit; Labcon Test, Camboriú, SC, Brazil) were measured weekly. Fish
89 were fed 36% crude protein commercial feed (Aquos TOTAL™, Paulínia, São Paulo, Brazil)
90 *ad libitum* twice a day. The experiments started one month after adaptation of fish to these
91 indoor conditions.

92

93 *2.2 Standard sperm analyses*

94 Sperm was collected after 24 hours of fasting, with no hormone induction. Males were
95 anesthetized in clove oil (WNF Indústria e Comércio, São Paulo, Brazil), the urogenital
96 papilla was carefully dried and sperm was hand-stripped and collected with graduated 1-mL
97 syringes.

98 Immediately after collection, each sample was subjectively evaluated for sperm motility rate,
99 subjective velocity and duration of motility, after activation in NaCl solution prepared at 100
100 mOsm kg⁻¹, using a light microscope (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan) at 400 X
101 magnification. Subjective velocity scores were assigned, ranging from 0 (no movement) to 5
102 (rapidly swimming spermatozoa), as described in Viveiros et al. (2014). Duration of motility
103 was recorded from activation to 10% of motile spermatozoa. Sperm concentration was
104 determined using a Neubauer-type hemacytometer chamber (Boeco, Hamburg, Germany) and
105 membrane integrity was evaluated after eosin-nigrosin staining method (adapted by Blom,
106 1950) using light microscope (Primo Star, Zeiss, Jena, Germany) and a cell counter. These
107 analyses took place at the Microscopy Laboratory of UFLA Fish Culture Station.

108

109 *2.3 Sperm analyses using the CASA system*

110 To evaluate motility rate, velocities (curvilinear = VCL, straight line = VSL, average path =
111 VAP) and beat-cross frequency (BCF) using a Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)
112 system, a second sperm collection was conducted in 10 out of the 28 males. Each sperm
113 sample was activated in 10 µL of NaCl, prepared at 100 mOsm kg⁻¹, directly in a Makler™
114 counting chamber (Sefi-Medical Instruments Ltd, Haifa, Israel) placed under a phase contrast
115 microscope (Eclipse Ci-S, Nikon, Tokyo, Japan) at 100 X magnification, using green filter
116 and phase 1 position. The microscope was connected to a video camera (Basler Vision
117 Technologies™ scA780-54fc, Ahrensburg, Germany) that generated 50 frames per second
118 (50 fps). Video recording started approximately 10 seconds post activation (spa). The images
119 were evaluated using standard settings for fish using the Sperm Class Analyzer™ software
120 (SCA™ 2013, Microptics, S.L., Version 5.3, Barcelona, Spain). These analyses were
121 performed at the Physiology and Pharmacology Laboratory of the Department of Veterinary
122 Medicine, UFLA.

123 *2.4 Seminal plasma analyses*

124 After sperm analyses, the remaining amount of each sperm sample from each of the 28 males
125 was centrifuged at 2,000 g for 30 min (MiniStar, Shanghai, China). The supernatant was
126 transferred to microtubes and stored at -80°C in ultrafreezer for a few weeks. Osmolality
127 (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany), pH (Digimed DM-22-V1.0, São
128 Paulo, Brazil) and concentrations of Na⁺, Ca²⁺ and K⁺ ions (flame photometer, Digimed DM-
129 62, Campo Grande, São Paulo, Brazil) were measured in duplicate at room temperature
130 (~25°C). These analyses took place at the Laboratory of Semen Technology, of the
131 Department of Animal Science, UFLA.

132

133 *2.5 Statistical analyses*

134 The data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were
135 conducted using the R software program, version 3.1.3 (R Core Team, 2015). The data were
136 tested for normal distribution using the Shapiro Wilk test and ANOVA when significant
137 differences occurred. The level of significance for all statistical tests was set to 5% (P<0.05).

138

139 **3 Results**

140 The broodstock males presented a mean of 1.0 kg of body weight and 30.2 cm of standard
141 length in GIFT males, and 0.9 kg of body weight and 29.4 cm of standard length in UFLA
142 males.

143

144 *3.1 Standard sperm analyses*

145 There was no difference on sperm quality between GIFT and UFLA males. Sperm of GIFT
146 males possessed a mean of 0.79 mL of sperm volume, 1.8×10^9 spermatozoa mL⁻¹ of
147 concentration, 76% intact sperm, 86% motile sperm, score 4.8 of velocity and 1072 s of

148 motility duration. Sperm of UFLA males possessed a mean of 0.76 mL of sperm volume, 1.2
149 $\times 10^9$ spermatozoa mL^{-1} of concentration, 76% intact sperm, 88% motile sperm, score 5.0 of
150 velocity and 1163 s of motility duration (Table 1).

151

152 *3.2 Sperm analyses using the CASA system*

153 There was no difference between the GIFT and UFLA strains when sperm was evaluated
154 using the CASA system. Sperm of GIFT males possessed a mean of 77% motile sperm, 57
155 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, 35 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VAP, 26 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VSL and 18 Hz of BCF. Sperm of UFLA
156 males possessed a mean of 69% motile sperm, 65 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, 39 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VAP, 20 $\mu\text{m s}^{-1}$
157 of VSL and 30 Hz of BCF (Table 2).

158

159 *3.3 Seminal plasma analyses*

160 There was no difference on seminal plasma features between GIFT and UFLA males. Seminal
161 plasma of GIFT males possessed a mean of 260 mOsm kg^{-1} of osmolality, 8.0 of pH, 149.6
162 mmol L^{-1} of Na^+ , 0.7 mmol L^{-1} of Ca^{2+} and 2.5 mmol L^{-1} of K^+ concentration. Seminal plasma
163 of UFLA males possessed a mean of 273 mOsm kg^{-1} of osmolality, 8.0 of pH, 141.1 mmol L^{-1}
164 of Na^+ , 1.0 mmol L^{-1} of Ca^{2+} and 2.5 mmol L^{-1} of K^+ concentration (Table 3).

165

166 **4 Discussion**

167 This is the first report on the determination of sperm and seminal plasma features of
168 genetically improved tilapia males (GIFT strain) and its comparison with that of tilapia males
169 kept under unassisted breeding and indirect selection for growth at our University (UFLA
170 strain). It is important to know sperm parameters of a given species as sperm quality is
171 correlated with fertilization rate, in most of the cases. Because tilapia reproduces easily under
172 different conditions, it is uncommon to access and report sperm quality. Thus there is a lack

173 of this information when we compare it with other commercially important species such as
174 carps and salmons. Furthermore, individuals selected for fast growth, as GIFT strain, may
175 have poor sperm quality when compared to males kept under low selection. However, we
176 observed no difference on sperm or seminal plasma features was observed when GIFT males
177 were compared to UFLA males this may be for the UFLA and GIFT strains are similar
178 genetically, for was developed from wild African populations of Nile tilapia (Dias et al.,
179 2016).

180 In this study, sperm presented mean of 0.76-0.79 mL of volume with $1.2-1.8 \times 10^9$
181 spermatozoa mL^{-1} in males of both strains. It has been reported a slightly reduced volume
182 followed by an increased sperm concentration in other studies using tilapia sperm. The
183 individuals used in the present study were 0.9-1.0 kg body weight, while the individuals of
184 other studies were considerably smaller. A sperm volume of 0.4 mL with 2.63×10^9
185 spermatozoa mL^{-1} was observed in 0.3 kg Chitralada males (Mataveli et al. 2007) and 0.19-
186 0.47 mL with $3.08-8.19 \times 10^9$ spermatozoa mL^{-1} in 0.15 kg Tai-chitralada males (Bombardelli
187 et al. 2010). Tilapia males produce low sperm volume when compared to other commercial
188 fish species, such as 7.54 mL of common carp *Cyprinus carpio* sperm (Linhares et al., 2017),
189 23 mL of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* sperm or the enormous volume of 137 mL of
190 Atlantic salmon *Salmo salar* sperm (Gjerde, 1984).

191 Tilapia sperm is immotile in the testis and in the seminal plasma, as observed in most fish
192 species, thus to evaluate motility parameters it is necessary to activate in a hyposmotic
193 solution. We used the standard activating solution of fish sperm at our Laboratory: NaCl
194 solution prepared at $\sim 100 \text{ mOsm kg}^{-1}$. After activation, sperm of tilapia males from both
195 strain possessed a mean of 86-88% of motility when evaluated subjectively and 69-77% when
196 evaluated under CASA; VCL was $57-65 \mu\text{m s}^{-1}$. Similar results were observed previously for
197 motility rate (Oliveira et al., 2015) and velocities (Sarmiento et al., 2017) of tilapia sperm. In

198 the present study, tilapia sperm was motile for 1072-1163 s, much longer than the 108-154 s
199 after activation in distilled water (~ 0 mOsm kg^{-1}) as reported by Navarro et al. (2014). It has
200 been demonstrated that low osmolality activating agents shorten the duration of motility when
201 compared to agents at ~ 100 mOsm kg^{-1} or higher (Alavi, 2009; Cosson, 2010, Viveiros et al.,
202 2016), as used in the present study.

203 Seminal plasma pH determined in the present study was 8.0 in both strains, similar to 7.49
204 reported for Tai-chitralada strain (Bombardelli et al., 2010) and 8.04 for Chitralada strain
205 (Mataveli et al., 2007). Plasma osmolality was 260-271 mOsm kg^{-1} , a reduced value
206 compared to ~ 350 mOsm kg^{-1} reported for *Oreochromis* spp (Shimoda et al., 2007). These
207 values are similar to other commercial fish species such as 7.5-8.5 of pH (Alavi and Cosson,
208 2005) and 215 mOsm kg^{-1} (Judycka et al., 2018) in rainbow trout and 8.6-8.8 of pH (Cejko et
209 al., 2018) and 302 mOsm kg^{-1} (Morisawa et al., 1983) in common carp.

210 The ion concentration in seminal plasma was of 0.5-0.7 mmol L^{-1} calcium, 141-149 mmol L^{-1}
211 sodium, 2.5 mmol L^{-1} potassium, in both strains. To the best of our knowledge, there are no
212 reports regarding ion determination of tilapia seminal plasma. These values are similar to
213 calcium and sodium, but very low for potassium when compared to other commercial fish
214 species such as 1.10 mmol L^{-1} calcium, 122 mmol L^{-1} sodium, 30.4 mmol L^{-1} potassium in
215 rainbow trout (Glogowski et al., 2000) and 2 mmol L^{-1} calcium, 75 mmol L^{-1} sodium, 82.4
216 mmol L^{-1} potassium in common carp (Morisawa et al., 1983).

217 Handling the males during experiments, we observed that GIFT males were always more
218 aggressive and resistant than UFLA males. This may be due to the strong selection for fast
219 growth which is highly correlated to faster food catchers and, thus, aggressiveness.

220 The present study provides elementary information regarding sperm and seminal plasma
221 characteristics in tilapia males. Furthermore, it became clear that the selection of GIFT males

222 for fast growth did not affect the reproductive parameters when compared to males under
223 natural selection (UFLA strain).

224

225 **Conflict of interest**

226 The authors declare no conflict of interest.

227

228 **Acknowledgements**

229 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
230 (CAPES; grant to NMNM). The authors thank Dr. RTF Freitas (UFLA) for financial support,
231 the MSc student IM DiChiacchio and undergraduate students PR Santiago, RL Paula, MM
232 Oliveira, JMP Souza for the assistance during sperm collection and analyses, and the staff E
233 Pereira for maintaining the fish alive during our trials.

234

235 **Authors' contributions**

236 NMNM contributed in executing these trials (data collection, lab analyses, and statistical
237 analyses), supervising undergraduate students and writing this manuscript. NCM collaborated
238 on data collection and statistical analyzes. RNS was responsible for data collection, feeding
239 the fish and cleaning tanks during the trials. MCL conducted the CASA analyses and revised
240 this manuscript before submission. ATMV is the head of the group and was responsible for
241 planning the experiments, supervising all analyses, interpreting the data set and supervising
242 the writing of this manuscript. All authors read and approved the final version of the
243 manuscript.

244

245 **References**

- 246 Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S.,
247 Linhart, O., 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar
248 wave parameters in Northern pike (*Esox Lucius* L.). *Theriogenology* 72, 32-43.
249
- 250 Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH:
251 a review. *Cell Biology International*, 29, 101-110.
252
- 253 Bombardelli, R.A., Hayashi, C., Natali, M.R.M, Sanches, E.A., Piana, P.A, 2010. Níveis de
254 energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de
255 lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de*
256 *Zootecnia*, 39(5), 941-949.
257
- 258 Cejko, B.I, Sarosiek, B., Krejszeff, S., Kowalski, R.K. 2018. Multiple collections of
259 common carp *Cyprinus carpio* L. semen during the reproductive period and its effects
260 on sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 188, 178-188.
261
- 262 Cosson, J., 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility,
263 portending their precocious decadence. *Journal Fish Biology*, 76, 240-279.
264
- 265 Dias, M.A.D., Freitas, R.T.F., Arranz, S.E., Villanova, G.V., Hilsdorf, A.W.S. 2016.
266 Evaluation of the genetic diversity of microsatellite markers among four strains of
267 *Oreochromis niloticus*. *Stichting International Foundation for Animal Genetics*, 47,
268 345–353.
269

- 270 El-Sayed, A.F.M., Mansour, C.R., Ezza, A.A., 2005. Effects of dietary lipid source on
271 spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at
272 different water salinities. *Aquaculture*, 248, 187 - 196.
- 273
- 274 El-Sayed, A.F.M., 2003. Effects of fermentation methods on the nutritive value of water
275 hyacinth for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture*, 218,
276 471-478.
- 277
- 278 Freato, T.A. Freitas, R.T.F., Pimenta, M.E.S.G., Oliveira, G.R., Reis Neto, R.V., Mattos,
279 B.O., 2012. Evaluation of Nile tilapia strains cultivated in cages under different
280 feeding programmes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41, 1332-1336.
- 281
- 282 Gjerde, B., Mengistu, S.B., Ødegård, J., Johansen, H., Altamirano, D.S., 2012. Quantitative
283 genetics of body weight, fillet weight and fillet yield in Nile tilapia (*Oreochromis*
284 *niloticus*). *Aquaculture*, 342, 117-124.
- 285
- 286 Gjerde, B., 1984. Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and rainbow
287 trout. *Aquaculture*, 40(2), 109-114.
- 288
- 289 Glogowski, J., Kwasnik, M., Iros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S.,
290 Kuzminski, H., Ciereszko, A., 2000. Characterization of rainbow trout milt collected
291 with a catheter: semen parameters and cryopreservation successes. *Aquaculture*
292 *Research*, 31, 289-296.
- 293

- 294 Judycka, S., Nynca, J., Liszewska, E. Dobosz, S., Słowińska, M., Różyński, R., Ciereszko,
295 A., 2018. Cryopreserved rainbow trout semen can be used for the fertilization of up to
296 8000 eggs in a single application. *Aquaculture*, 490, 25-28.
297
- 298 Kunita, N.M., Oliveira, C.A.L., Oliveira, S.N., Yoshida, G.M., Rizzato, G.S., Resende,
299 E.K., Ribeiro, R.P., 2013. Avaliação genética de características morfométricas em
300 tilápias do Nilo cultivadas. *Archivos de Zootecnia*, 62, 555-566.
301
- 302 Linhares, F.R.A., Oliveira-Araújo, M.S., Nunes, J.F., Carvalho, M.A.M., Campello, C.C.,
303 Salmito-Vanderley, C.S.B., 2017. Efeito de vitaminas adicionadas ao diluente ACP-
304 104 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de carpa comum (*Cyprinus carpio*).
305 *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(4), 980-988.
306
- 307 Mataveli, M., Moraes, G.V., Streit Jr, D.P., Mendez, L.D.V., Sakaguti, E.S., Toninato, J.C.,
308 Barbosa, R.C., Merlini, L., 2007. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo
309 (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes
310 concentrações de vitamina C. *Boletim do Instituto da Pesca*, 33(1), 1-7.
311
- 312 Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil 2012.
313
- 314 Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983. Effect of
315 osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes.
316 *Journal Experimental Biology*, 107, 95-103.
317

- 318 Moro, G.V., Rezende, F.P., Alves, A.L., Hashimoto, D.T., Varela, E.S., Torati, L.S., 2013.
319 Espécies de peixes para a piscicultura. In: Rodrigues, A.P.O., Lima, A.F., Alves,
320 A.L., Rosa, D.K., Torati, L.S., Santos, V.R.V. Piscicultura de água doce:
321 multiplicando conhecimento. 1ª Edição. Brasília, DF: EMBRAPA Pesca e
322 Aquicultura, 50-51.
- 323 Navarro, R.D., Navarro, F.K.S.P., Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Pereira, M.M., 2014.
324 Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis* spp.) fed diet with
325 different oil sources. Acta Scientiarum. Technology, 36(3), 399-404.
326
- 327 Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Abu-Bakar, K.R., Hamzah, A., Khaw, H.L., Yee, H.Y.,
328 2010. Correlated response in fillet weight and yield to selection for increased harvest
329 weight in genetically improved farmed tilapia (GIFT strain), *Oreochromis niloticus*.
330 Aquaculture, 305, 1-5.
331
- 332 Oliveira, M.M., Ferreira, M.R., Goulart, M.B., Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Andrade,
333 E.S., Allaman, I.B., Veras, G.C., Costa, D.V., Rosa, P.V., 2015. Effect crude protein
334 levels on the broodstock spermatid quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
335 American Journal of Experimental Agriculture, 5(3), 192-199.
336
- 337 Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Khaw, H.L., Hamzah, A., Bakar, K.R.A, Yee, H.Y., 2011.
338 Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special reference to
339 the work conducted by the World Fish Center with the GIFT strain. Reviews
340 in Aquaculture, 3, 27-41.
341

- 342 Sarmiento, N.L.A.F., Martins, E.F.F., Costa, D.C., Silva, W.S., Mattioli, C.C., Luz, M.R.,
343 Luz, R.K., 2017. Effects of supplemental dietary vitamin C on quality of semen from
344 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeders. *Reproduction Domestic Animal*, 52,
345 144-152.
- 346
- 347 Shimoda, E., Andrade, D.R., Vidal Junior, M.V., Yasui, G.S., Silva, J.F.S., Godinho, H.P.,
348 Souza, G., 2007. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha
349 *Brycon insignis*. *Ceres*, 54, 430-433.
- 350
- 351 Viveiros, A.T.M., Leal, M.C., França, T.S., Almeida, I.L.G., Isaú, Z.A., 2016. Osmolality
352 and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen
353 *Prochilodus lineatus* sperm differently. *Animal Reproduction Science*, 173, 73-79.
- 354
- 355 Viveiros, A.T.M.; Orfão, L.H.; Leal, M.C., 2014. Biologia e Conservação de
356 Espermatozoides. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C. *Biologia e*
357 *Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. 1ª Edição. EDITORA FUNEP,
358 p.307-327.
- 359
- 360 World Fish.<<http://www.worldfishcenter.org>>(2018). Accessed 26 March 2018.
- 361

362 Table 1. Body weight, standard length and sperm features (mean \pm standard deviation) of
 363 *Oreochromis niloticus* males from two different strains.

Features	GIFT strain	UFLA strain
Number of males	14	14
Body weight (kg)	1.0 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2
Standard length (cm)	30.2 \pm 2.7	29.4 \pm 1.8
Sperm volume (mL)	0.79 \pm 0.52	0.76 \pm 0.57
Sperm concentration (spermatozoa x 10 ⁹ mL ⁻¹)	1.8 \pm 2.6	1.2 \pm 1.8
Membrane integrity (% intact sperm)	76 \pm 13	76 \pm 17
Subjective motility rate (% motile sperm)	86 \pm 5	88 \pm 5
Subjective velocity score (0-5)*	4.8 \pm 0.4	5.0 \pm 0.0
Duration of sperm motility (s)	1072 \pm 473	1163 \pm 336

364 * Score 0 = no movement; 5 = rapidly swimming spermatozoa.

365 There was no significant difference on sperm features between strains (ANOVA P>0.05).

366

367 Table 2. Sperm motility rate, velocities and beat cross frequency (mean \pm standard deviation)
 368 determined using the CASA system, of *Oreochromis niloticus* males from two different
 369 strains.

Features	GIFT strain	UFLA strain
Number of males	5	5
Sperm motility rate (% motile sperm)	77 \pm 10	69 \pm 14
Curvilinear velocity (VCL; $\mu\text{m s}^{-1}$)	57 \pm 6	65 \pm 13
Average path velocity (VAP; $\mu\text{m s}^{-1}$)	35 \pm 8	39 \pm 7
Straight line velocity (VSL; $\mu\text{m s}^{-1}$)	26 \pm 9	30 \pm 8
Beat cross frequency (BCF; Hz)	18 \pm 2	20 \pm 1

370 There was no significant difference on sperm features between strains (ANOVA $P > 0.05$).

371

372

373 Table 3. Seminal plasma osmolality, pH and ion concentration (mean \pm standard deviation) of
 374 *Oreochromis niloticus* males from two different strains.

Features	GIFT strain	UFLA strain
Number of males	14	14
Osmolality (mOsm kg^{-1})	260 \pm 46	273 \pm 11
pH	8.0 \pm 0.3	8.0 \pm 0.2
Sodium (mmol L^{-1})	149.4 \pm 24.9	141.1 \pm 30.1
Calcium (mmol L^{-1})	0.7 \pm 0.5	1.0 \pm 0.7
Potassium (mmol L^{-1})	2.5 \pm 0.7	2.5 \pm 1.1

375 There was no significant difference on seminal plasma features between strains (ANOVA
 376 $P > 0.05$).

**ARTIGO 2 - EFEITO DE DILUIDORES NO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO
DE SÊMEN DE DUAS VARIEDADES DE TILÁPIA DO NILO**

Ana TM Viveiros^{**}

Natália MN Mourad

Naiara C Motta

Pedro S Reis

Marcelo C Leal

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

* Autor correspondente. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, P.O. Box 3037, Lavras, MG, 37200-000, Brasil. Tel. +553538291223; Fax: +553538291231. anatmviveiros@outlook.com (A.T.M. Viveiros).

RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixes mais produzidas no mundo e por isso tem sido alvo de programas de melhoramento genético. Para facilitar a troca de material genético entre pisciculturas, pode-se diluir e resfriar o sêmen pois é um método prático e simples de preservá-lo por horas ou dias. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar diferentes diluidores de sêmen durante o resfriamento por até 24 h, de machos da variedade GIFT e comparar com machos de tilápia mantidos sob seleção natural em nossa Universidade (variedade UFLA). O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, e dividido em duas etapas. No experimento 1, o sêmen de 14 machos de cada variedade foi coletado, uma amostra foi mantida sem diluição (controle não diluído) enquanto que as demais foram diluídas em NaHCO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , KCl , CaCl_2 e glicose e mantidas na geladeira por 24 h. O sêmen diluído foi avaliado subjetivamente quanto à taxa de motilidade, duração da motilidade e vigor espermático às 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 e 24 h após a diluição. No experimento 2, o sêmen de 5 machos de cada variedade foi coletado, diluído nos mesmos tratamentos do experimento 1 e avaliado quanto à sua capacidade de se manter móvel após a ativação. A taxa de motilidade espermática e a velocidade curvilínea (VCL) foram determinadas através do sistema CASA, durante 120 s após a ativação. As análises estatísticas foram realizadas no software R, e os dados foram submetidos à ANOVA, seguido do teste Scott-Knott. Como esperado a qualidade do sêmen foi decrescendo para ambas as variedades ao longo do tempo. No experimento 1, por apresentar uma diminuta alíquota a amostra controle ressecou, sendo possível apenas a análise no tempo 0 h. Após uma hora da diluição as amostras em todos os tratamentos apresentaram taxa de motilidade superior à 50% e vigor superior 3,1 para a variedade GIFT e superior à 60% e 3,9 para variedade UFLA. Na sexta hora, as amostras de sêmen diluído em soluções que continham o íon de Na^+ (iônico) e glicose (não iônico) apresentaram taxa de motilidade e vigor acima de 30% e 1,0 para a variedade GIFT e para a variedade UFLA, 60% e 2,2. No experimento 2, após 10 s de ativação não foram observadas diferenças entre os tratamentos para a taxa de motilidade para as variedades. Após 30 s da ativação, taxas de motilidade superior a 50% foram observadas em todos os tratamentos, exceto para NaHCO_3 para a variedade GIFT, para a variedade UFLA somente as amostras controle e sêmen diluído em KCl e glicose apresentaram motilidade superior a 50%. Com relação a VCL, a variedade UFLA manteve por mais tempo as velocidades do que a variedade GIFT. O sêmen dos machos da variedade UFLA é mais resistente ao resfriamento em relação ao da variedade GIFT. As soluções de NaCl e glicose podem ser utilizadas como diluidores de sêmen de *O. niloticus*.

Palavras-chave: Peixe. Reprodução. Sêmen. Resfriamento.

ABSTRACT

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the fish species most produced in the world, thus, it has been the object of breeding programs. To facilitate the trade of the genetic material between fish farms, the sperm can be diluted and stored under refrigeration, since it can be preserved for hours or days by using an easy and simple method. Therefore, the aim of this study was to test different semen extenders on the semen of GIFT males during up to 24 hours in the cool storage phase and compare them with the semen of naturally selected tilapia males of the UFLA variety. The experiment was conducted at the Federal University of Lavras and was divided into two phases. In experiment one, the sperm of fourteen males was collected. One sample was kept without dilution (undiluted control), while the others were diluted in NaHCO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaCl , KCl , CaCl_2 , and glucose and kept in under refrigeration for 24 hours. The diluted sperm was subjectively evaluated for spermatic motility rate, motility duration, and vigor at 0, 0.5, 1, 3, 6, 12, and 24 hours after dilution. In experiment two, semen of five males of each variety was collected, diluted with the same treatments as in experiment one, and evaluated for its ability to remain mobile after activation. The spermatic motility rate and curvilinear velocity (VCL) were determined by the CASA system, during 120 seconds after activation. Statistical analyzes were performed using R software and the data were submitted to ANOVA, followed by the Scott-Knott test. As expected, the sperm quality was decreasing over time for both strains. In experiment one, the control sample dried out because of the small aliquot, therefore, the analysis was only possible for time 0 hour. After one hour of diluting the samples in all treatments, the evaluations showed motility rate and subjective velocity score superior to 50% and 3.1, respectively, for the GIFT strain, and superior to 60% and 3.9, respectively, for the UFLA strain. At the sixth hour, the sperm samples diluted in Na^+ (ionic) solution and glucose (nonionic) presented a mobility rate and subjective velocity score above of 30% and 1.0, respectively, for the GIFT strain, and of 60% and 2.2, respectively, for the UFLA strain. In experiment two, no differences were observed between treatments for the motility rates of both strains after 10 s of activation. After 30 s of activation, motility rates superior to 50% were observed for all treatments apart from NaHCO_3 for the GIFT strain. For the UFLA strain, only the undiluted control and dilution in KCl and glucose samples presented motility superior to 50%. Concerning the VCL, the UFLA strain maintained speed for a longer period than the GIFT strain. The male sperm of the UFLA strain is more resistant to cool storage when compared to the GIFT variety. NaCl and glucose solutions can be used as sperm extender for *O. niloticus*.

Key-Words: Fish. Reproduction. Semen. Cool storage.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os produtos gerados pela aquicultura tornaram-se uma importante fonte de alimento no mundo. O aumento do consumo per capita de peixe apresentou um salto de 9,9 kg na década de 1960 para 20 kg em 2014 e 2015 (FAO 2016), fazendo-se necessário uma otimização da produção, para atender à crescente demanda mundial.

A tilápia é o segundo maior grupo de peixes produzidos em piscicultura no mundo, ficando atrás apenas das carpas (FAO 2014). No Brasil, é a principal espécie cultivada, sendo sua produção no ano de 2016, aproximadamente 239 mil toneladas (IBGE, 2016). Sua alta produtividade está relacionada às características exclusivas da espécie, como a capacidade de adaptação às diferentes condições de criação, tolerância a variações nos parâmetros físico-químicos e limnológicos da água e principalmente pela rápida taxa de crescimento, (RIGHETTI et al., 2011) além de ciclos reprodutivos curtos e resistência a doenças (COWARD; BROMAGE, 2000).

Existem algumas variedades genéticas de tilápia do Nilo que foram melhoradas para fins produtivos, como é o caso da tilápia GIFT (Genetic Improvement of Farmed Tilapia) (WORLD FISH, 2018). Outra variedade genética de tilápia é a variedade UFLA, caracterizada geneticamente pela primeira vez por Dias et al. (2016). Proveniente da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras - Minas Gerais (21°13'52,5"S e 44°59'13,2"W), onde sofreu décadas de seleção massal (DIAS, et al., 2016). Indiretamente selecionadas para crescimento, é adaptada a esta região, cujo clima é temperado úmido com chuvas de verão e inverno seco (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007; SÁ JUNIOR et al., 2012; ALVARES et al., 2013), com temperaturas anuais que podem variar de 8 a 34 °C.

Apesar de ser uma espécie de grande interesse comercial, existem poucos estudos na literatura sobre a reprodução de tilápias, principalmente estudos sobre o sêmen e técnicas de preservação aplicadas a ele (GODINHO et al., 2003; NAVARRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015), isso quando comparados a espécies nativas (ORFÃO et al., 2011; VIVEIROS et al., 2011; LÓPEZ; LEAL; VIVEIROS, 2015). Uma técnica simples e prática de preservação é por meio do resfriamento do sêmen, que consiste em manter a viabilidade dos espermatozoides por um curto período de tempo em temperaturas de refrigeração, para utilizar posteriormente na fertilização (VIVEIROS et al., 2014).

Contudo, deve-se utilizar uma solução diluidora na preservação do sêmen para a prevenção de injúrias das células espermáticas (FOROUZANFAR et al., 2010), pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço, estabiliza as

condições físico-químicas do sêmen durante a estocagem, (CAROLSFELD; HARVEY, 1999), além de nutrir os espermatozoides (MUCHLISIN, 2005), prolongando assim a viabilidade do sêmen. As características necessárias para um diluidor ser considerado adequado para a diluição do sêmen são isotonicidade, estabilidade, esterilidade (LEGENDRE; BILLARD, 1980).

Não foram reportados na literatura, estudos sobre a comparação das diferentes soluções diluidoras mais utilizadas na reprodução de peixes, para *O. niloticus*. Essas informações são de extrema importância, pois o detalhamento das mesmas, fornecerá dados mais assertivos para futuros ensaios. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar diferentes diluidores no sêmen de duas variedades de tilápia do Nilo durante o resfriamento por até 24 h, e avaliar quanto à sua capacidade de manter os espermatozoides móveis após a ativação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras - UFLA (Protocolo CEUA nº 016/13), cidade de Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil.

2.1 Instalações e manipulação dos peixes

Quatorze machos de *Oreochromis niloticus* da variedade GIFT ($1,0 \pm 0,3$ kg peso corporal e $30,2 \pm 2,7$ cm comprimento padrão) e 14 da variedade UFLA ($0,9 \pm 0,2$ kg peso corporal e $29,4 \pm 1,8$ cm comprimento padrão) foram selecionados dos tanques de concreto da Estação de Cultura de Peixes da UFLA (21°S 44°W), por apresentarem ventre abaulado, papila urogenital hiperêmica e por liberarem sêmen sob leve pressão abdominal.

Os machos foram anestesiados com óleo de cravo (WNF Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil), identificados com microchip, e transferidos para duas caixas plásticas de 500 L (uma caixa por variedade), em sistema de fluxo de aeração contínuo, a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. A temperatura da água e o oxigênio (Pro20, Yellow Springs, Ohio, EUA) foram aferidos duas vezes ao dia e o pH e a amônia (kit de aquário; Labcon Test, Camboriú, SC, Brasil) foram aferidos semanalmente. Todos estes parâmetros da água foram mantidos na faixa ideal para criação de peixes.

Os peixes foram alimentados com ração comercial de proteína bruta a 36% (Aquos TOTAL™, Paulínia, São Paulo, Brasil) *ad libitum* duas vezes ao dia. Os experimentos começaram um mês após a adaptação dos peixes as condições laboratoriais.

2.2 Composição das soluções diluidoras

Seis soluções diluidoras foram preparadas com água de osmose reversa (RO) e uma das seguintes substâncias químicas: NaHCO₃ (bicarbonato de sódio), Na₃C₆H₅O₇ (citrato de sódio), NaCl (cloreto de sódio), KCl (cloreto de potássio), CaCl₂ (cloreto de cálcio) e glicose (TABELA 1). Todos os produtos químicos eram provenientes da Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil. A osmolalidade de cada solução foi fixada em 300 ± 10 mOsm kg⁻¹. Cada solução foi mantida em frascos de vidro âmbar de 100 mL, armazenada em um refrigerador a 6-8 °C e utilizada após de 48 h.

Tabela 1 - Composição das diferentes soluções diluidoras testadas no presente estudo. Após o preparo, a osmolalidade de cada solução foi ajustada para $\sim 300 \text{ mOsm kg}^{-1}$

Reagentes	Fórmula química	g/100 mL	pH da solução
Bicarbonato de sódio	NaHCO_3	1,4	8,6
Citrato de sódio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	3,2	8,4
Cloreto de sódio	NaCl	0,9	7,0
Cloreto de potássio	KCl	1,6	6,1
Cloreto de cálcio	CaCl_2	2,0	6,5
Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	4,9	8,3

Fonte: Da autora (2018).

2.3 Experimento 1 - Avaliação subjetiva do sêmen diluído e refrigerado durante 24 horas

O sêmen foi coletado após 24 horas de jejum, sem indução hormonal. Os machos foram anestesiados com óleo de cravo (WNF Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil), a papila urogenital foi cuidadosamente seca e o sêmen foi retirado através da massagem abdominal diretamente em seringas graduadas de 1 mL. O sêmen de cada macho (n = 14 machos GIFT + 14 machos UFLA) foi diluído na proporção de 1:10 (sêmen:diluidor) em cada um dos 6 diluidores descritos acima e armazenados em tubos Eppendorf por 24 h em um refrigerador com temperatura aproximada de 4 °C. Uma alíquota de sêmen foi mantida não diluída, para controle.

A taxa de motilidade espermática subjetiva e o vigor espermático (0 = nenhum movimento, 5 = espermatozoides nadando rapidamente) metodologia descrita por Viveiros et al. (2014), foram avaliados subjetivamente em 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 e 24 h após a diluição. Para isso, 3 μL de sêmen diluído em cada um dos diluidores foi colocado em uma lâmina de vidro e ativados em 20 μL do agente ativador (solução de $\text{NaCl} \sim 100 \text{ mOsm kg}^{-1}$) em um microscópio de luz (Eclipse E200, Nikon, Tóquio, Japão) com amplitude de 400 X.

2.4 Experimento 2 - Avaliação do sêmen diluído em diferentes diluidores durante 120 s após a ativação

Uma segunda coleta de sêmen foi realizada em 10 dos 28 machos utilizados no experimento 1. O sêmen foi novamente diluído 1:10 (sêmen:diluidor) em cada uma das seis soluções diluidoras descritas acima, e imediatamente ativado em 10 μL do agente ativador (solução de $\text{NaCl} \sim 100 \text{ mOsm kg}^{-1}$) diretamente numa câmara de contagem Makler™ (Sefi-Medical Instruments Ltda, Haifa, Israel) colocada sob um microscópio de contraste de fase

(Eclipse Ci-S, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 100 X, utilizando filtro verde e posição de fase 1.

O microscópio foi conectado a uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies TM scA780-54fc, Ahrensburg, Alemanha) que gerou 50 frames/segundo e o vídeo foi gravado de 10 a 120 segundos após a ativação (spa). As imagens foram avaliadas usando configurações de padrões para peixes no software Sperm Class Analyzer TM (SCA TM 2013, Microptics, S.L., Versão 5.3, Barcelona, Espanha). Foram avaliadas a taxa de motilidade espermática e a velocidade curvilínea (VCL). As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

2.5 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas com o programa de software R, versão 3.1.3 (R Core Team, 2015). Os dados foram testados diferenças significativas usando ANOVA, seguido pelo teste Scott-Knott, quando aplicável. O nível de significância para todos os testes estatísticos foi estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

Devido à pouca quantidade de sêmen produzido pelas tilápias, o volume coletado foi pequeno (~ 0,8 mL por macho) e, conseqüentemente, pela diminuta alíquota utilizada na partição dos diferentes tratamentos (~ 0,0075 mL), a amostra controle não diluído ressecou durante o armazenamento refrigerado de 24 h. Assim, apenas a análise do tempo 0 h foi realizada para esse tratamento controle no experimento 1.

3.1 Experimento 1 - Avaliação subjetiva do sêmen diluído e refrigerado durante 24 horas

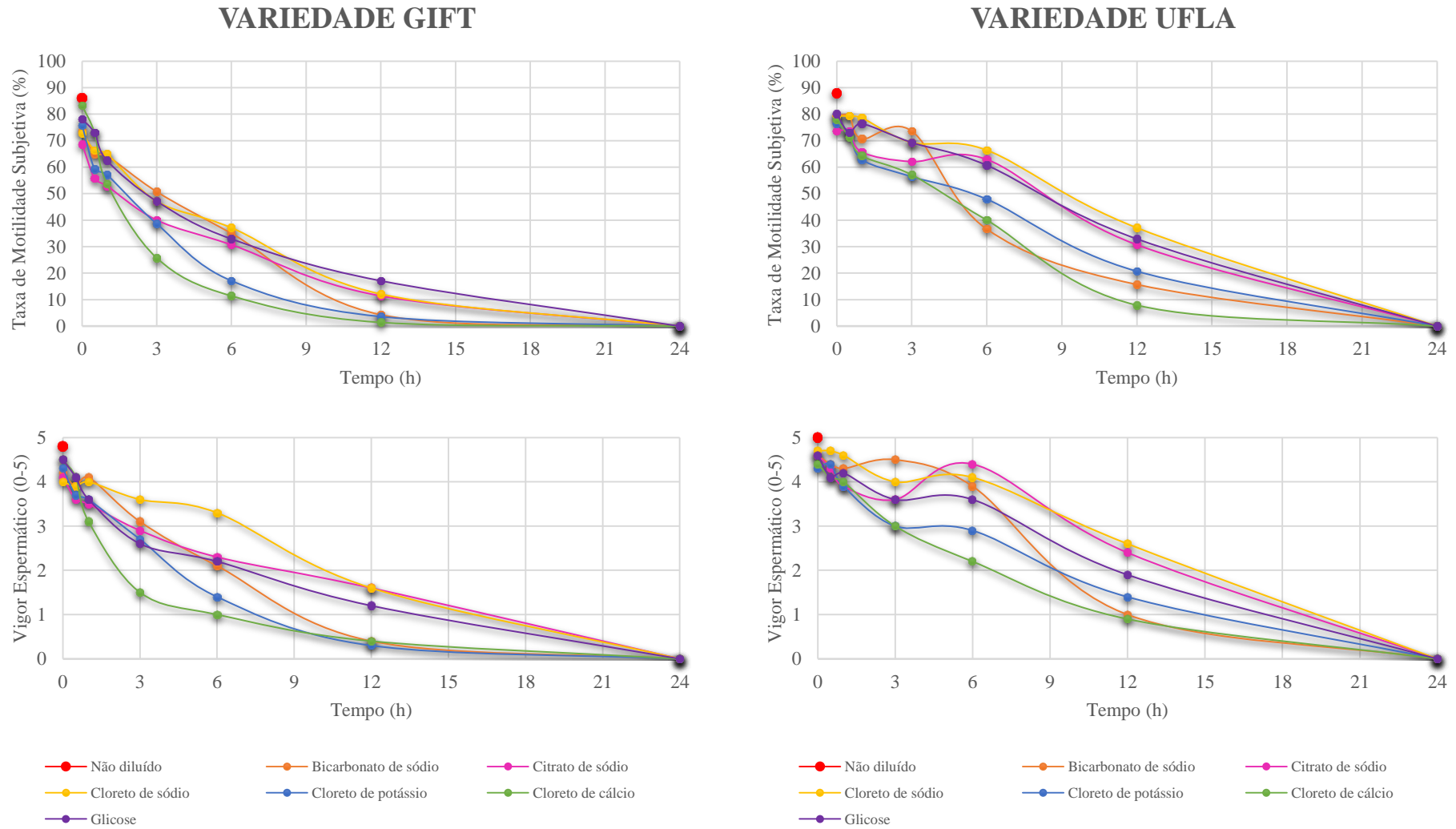
Como esperado, a qualidade das amostras de sêmen decresceram ao longo do tempo (FIGURA 1). Os resultados apresentados para a taxa de motilidade subjetiva e vigor do sêmen das variedades GIFT e UFLA, estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Para a variedade GIFT, no tempo 0 após a diluição, maiores taxas de motilidade foram encontrados para as amostras controle não diluído (86%), sêmen diluído em cloreto de cálcio (83%), glicose (78%) e o maior vigor para controle não diluído (4,8) e cloreto de cálcio (4,5). Na meia hora seguinte, as maiores taxas de motilidade foram encontradas para as amostras de bicarbonato de sódio (65%), cloreto de sódio (66%), cloreto de potássio (59%), cloreto de cálcio (73%) e glicose (73%), enquanto que não houve diferenças entre as amostras para o vigor neste horário (4,1). Na primeira hora não houve diferenças entre as amostras para taxa de motilidade (65%) e vigor (4,1). Após três horas da diluição, as amostras não diferiram entre si (51% e 3,6), exceto para cloreto de cálcio (26% e 1,5). Na sexta hora, as menores taxas de motilidade e vigor foram encontradas em amostras de sêmen diluído em cloreto de cálcio (11% e 1,0) e cloreto de potássio (17% e 1,4), enquanto que as demais possuíam aproximadamente 37% de taxa de motilidade e 3,3 de vigor. Doze horas após a diluição, maiores taxas de motilidade e vigor foram encontradas apenas as amostras de sêmen diluído em citrato de sódio (11% e 1,6), cloreto de sódio (12% e 1,6) e glicose (17% e 1,2). Em 24 h todas as amostras apresentavam 0% de taxa de motilidade e vigor 0.

Já para a variedade UFLA, não houve diferenças entre as amostras para a taxa de motilidade e vigor até uma hora após a diluição. Na terceira hora, somente houve diferença entre as amostras para o parâmetro de vigor, sendo os maiores valores encontrados nas amostras de sêmen diluído em bicarbonato de sódio (4,5) e cloreto de sódio (4,0). Seis horas após a diluição somente as amostras sêmen diluído em cloreto de potássio (48% e 2,9) e

cloreto de cálcio (40% e 2,2) apresentaram valores mais baixos tanto para taxa de motilidade, quanto para vigor. Doze horas após a diluição somente as amostras de sêmen diluído em citrato de sódio (31%), cloreto de sódio (37%) e glicose (33%) tiveram maiores taxas de motilidade, enquanto que não houve diferenças entre as amostras para o vigor. Em 24 h todas as amostras apresentavam 0% de taxa de motilidade e vigor 0.

Figura 1 - Taxa de motilidade subjetiva (%) e vigor espermático (0-5) das amostras de sêmen nos diferentes tratamentos, durante o resfriamento de 24 h.



Fonte: Da autora (2018).

Tabela 2 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído), por meio da taxa de motilidade subjetiva (%), dentro de cada tempo (h) após a diluição, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=14, média \pm DP).

VARIEDADE GIFT							
Tratamentos	0 h	0,5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle não diluído	86 \pm 5 ^a	-	-	-	-	-	-
Bicarbonato de sódio	74 \pm 12 ^b	65 \pm 21 ^a	64 \pm 20 ^a	51 \pm 29 ^a	35 \pm 31 ^a	4 \pm 13 ^b	0
Citrato de sódio	69 \pm 21 ^b	56 \pm 26 ^b	53 \pm 25 ^a	40 \pm 26 ^a	31 \pm 30 ^a	11 \pm 18 ^a	0
Cloreto de sódio	73 \pm 16 ^b	66 \pm 17 ^a	65 \pm 18 ^a	47 \pm 26 ^a	37 \pm 26 ^a	12 \pm 19 ^a	0
Cloreto de potássio	76 \pm 15 ^b	59 \pm 24 ^b	57 \pm 19 ^a	39 \pm 24 ^a	17 \pm 25 ^b	4 \pm 11 ^b	0
Cloreto de cálcio	83 \pm 11 ^a	73 \pm 15 ^a	54 \pm 28 ^a	26 \pm 30 ^b	11 \pm 18 ^b	1 \pm 4 ^b	0
Glicose	78 \pm 7 ^b	73 \pm 12 ^a	63 \pm 23 ^a	47 \pm 27 ^a	33 \pm 28 ^a	17 \pm 23 ^a	0
VARIEDADE UFLA							
Tratamentos	0 h	0,5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle não diluído	88 \pm 5 ^a	-	-	-	-	-	-
Bicarbonato de sódio	79 \pm 7 ^a	79 \pm 8 ^a	71 \pm 17 ^a	74 \pm 10 ^a	64 \pm 22 ^a	16 \pm 24 ^b	0
Citrato de sódio	74 \pm 19 ^a	74 \pm 21 ^a	66 \pm 26 ^a	62 \pm 29 ^a	63 \pm 21 ^a	31 \pm 21 ^a	0
Cloreto de sódio	79 \pm 18 ^a	79 \pm 11 ^a	79 \pm 10 ^a	69 \pm 13 ^a	66 \pm 17 ^a	37 \pm 23 ^a	0
Cloreto de potássio	76 \pm 21 ^a	73 \pm 24 ^a	63 \pm 27 ^a	56 \pm 30 ^a	48 \pm 28 ^b	21 \pm 23 ^b	0
Cloreto de cálcio	78 \pm 25 ^a	71 \pm 31 ^a	64 \pm 33 ^a	57 \pm 30 ^a	40 \pm 28 ^b	8 \pm 12 ^b	0
Glicose	80 \pm 10 ^a	73 \pm 24 ^a	76 \pm 15 ^a	69 \pm 23 ^a	61 \pm 31 ^a	33 \pm 32 ^a	0

Fonte: Da autora (2018).

Tabela 3 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído) por meio do vigor (0-5), dentro de cada tempo (h) após a diluição, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=14, média \pm DP).

VARIEDADE GIFT							
Tratamentos	0 h	0,5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle não diluído	4,8 \pm 0,4 ^a	-	-	-	-	-	-
Bicarbonato de sódio	4,2 \pm 0,7 ^b	3,9 \pm 1,0 ^a	4,1 \pm 1,1 ^a	3,1 \pm 1,5 ^a	2,1 \pm 1,9 ^a	0,4 \pm 1,2 ^b	0
Citrato de sódio	4,1 \pm 0,9 ^b	3,6 \pm 1,3 ^a	3,5 \pm 1,5 ^a	2,9 \pm 1,6 ^a	2,3 \pm 2,1 ^a	1,6 \pm 1,7 ^a	0
Cloreto de sódio	4,0 \pm 0,8 ^b	3,9 \pm 0,9 ^a	4,0 \pm 0,8 ^a	3,6 \pm 1,5 ^a	3,3 \pm 1,7 ^a	1,6 \pm 1,7 ^a	0
Cloreto de potássio	4,3 \pm 0,6 ^b	3,7 \pm 1,2 ^a	3,6 \pm 1,0 ^a	2,7 \pm 1,3 ^a	1,4 \pm 1,7 ^b	0,3 \pm 0,8 ^b	0
Cloreto de cálcio	4,5 \pm 0,9 ^a	4,1 \pm 0,9 ^a	3,1 \pm 1,0 ^a	1,5 \pm 1,7 ^b	1,0 \pm 1,3 ^b	0,4 \pm 0,9 ^b	0
Glicose	4,5 \pm 0,5 ^a	4,1 \pm 0,8 ^a	3,6 \pm 1,5 ^a	2,6 \pm 1,5 ^a	2,2 \pm 1,9 ^a	1,2 \pm 1,4 ^a	0
VARIEDADE UFLA							
Tratamentos	0 h	0,5 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Controle não diluído	5,0 \pm 0 ^a	-	-	-	-	-	-
Bicarbonato de sódio	4,6 \pm 0,6 ^a	4,4 \pm 0,6 ^a	4,3 \pm 1,0 ^a	4,5 \pm 0,7 ^a	3,9 \pm 1,1 ^a	1,0 \pm 1,2 ^a	0
Citrato de sódio	4,6 \pm 0,9 ^a	4,3 \pm 1,3 ^a	3,9 \pm 1,5 ^a	3,6 \pm 1,8 ^b	4,4 \pm 1,3 ^a	2,4 \pm 1,5 ^a	0
Cloreto de sódio	4,7 \pm 0,6 ^a	4,7 \pm 0,5 ^a	4,6 \pm 0,9 ^a	4,0 \pm 1,0 ^a	4,1 \pm 1,0 ^a	2,6 \pm 1,3 ^a	0
Cloreto de potássio	4,3 \pm 1,0 ^a	4,4 \pm 1,4 ^a	3,9 \pm 1,4 ^a	3,0 \pm 1,6 ^b	2,9 \pm 1,7 ^b	1,4 \pm 1,5 ^a	0
Cloreto de cálcio	4,4 \pm 1,5 ^a	4,1 \pm 1,7 ^a	4,0 \pm 1,6 ^a	3,0 \pm 1,6 ^b	2,2 \pm 1,4 ^b	0,9 \pm 1,1 ^a	0
Glicose	4,6 \pm 0,6 ^a	4,1 \pm 1,3 ^a	4,2 \pm 1,1 ^a	3,6 \pm 1,3 ^b	3,6 \pm 1,8 ^a	1,9 \pm 1,7 ^a	0

Fonte: Da autora (2018).

Na Tabela 4 estão expressos os resultados de uma regressão linear realizada para estimar qual a hora máxima em que se pode obter uma taxa de motilidade acima de 30%. Os valores obtidos demonstraram que para a variedade GIFT os diluidores que preservam melhor o sêmen por maior tempo de resfriamento foram a glicose (11,3 h) seguido pelo cloreto de sódio (10,9 h), enquanto que para a UFLA primeiramente foram o cloreto de sódio (15,0 h), seguido pela glicose (14,5 h).

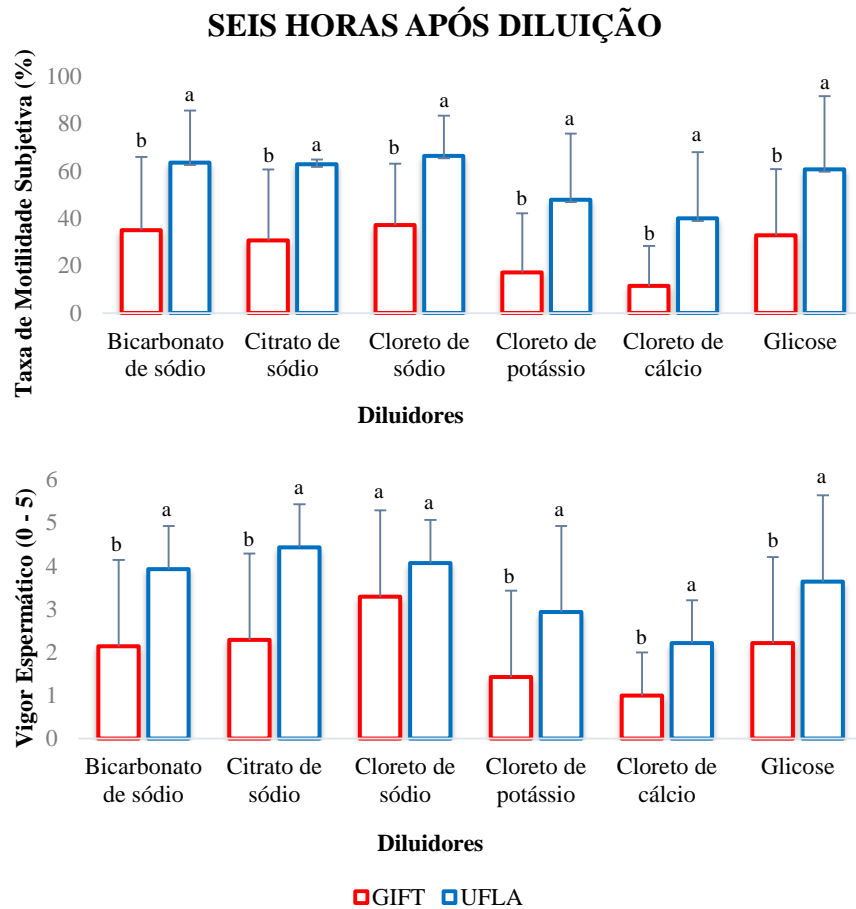
Tabela 4 - Análise de regressão linear ($Y = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$) indicando a hora máxima que a motilidade se mantém em até 30% para cada tratamento.

GIFT				
Diluidores	β_0	β_1	R^2	Tempo (h)
Bicarbonato de sódio	63,68	3,14	84,42%	10,7
Citrato de sódio	54,47	2,62	85,83%	9,3
Cloreto de sódio	63,14	3,04	88,35%	10,9
Cloreto de potássio	55,12	2,89	72,42%	8,7
Cloreto de cálcio	55,73	3,05	60,05%	8,4
Glicose	65,02	3,11	85,94%	11,3
UFLA				
Diluidores	β_0	β_1	R^2	Tempo (h)
Bicarbonato de sódio	78,37	3,58	91,43%	13,5
Citrato de sódio	73,19	3,09	97,24%	14,0
Cloreto de sódio	81,13	3,4	99,07%	15,0
Cloreto de potássio	69,01	3,14	94,51%	12,4
Cloreto de cálcio	67,45	3,3	87,14%	11,3
Glicose	78,18	3,33	98,86%	14,5

Fonte: Da autora (2018).

As taxas de motilidade e vigor espermático entre as variedades, foram comparadas 6 h após a diluição (FIGURA 2). Os resultados demonstraram que a variedade UFLA foi superior a variedade GIFT para a grande maioria dos diluidores testados, diferindo somente para as amostras de sêmen diluído em cloreto de sódio para o parâmetro de vigor.

Figura 2 - Comparação entre as duas variedades, através dos parâmetros taxa de motilidade subjetiva (%) e vigor espermático (0-5) das amostras de sêmen diluído nos diferentes diluidores no tempo de 6 h após a diluição e resfriamento.



Fonte: Da autora (2018).

3.2 Experimento 2 - Avaliação do sêmen diluído imediatamente após a ativação por 120 s, através do sistema CASA

As amostras controle não diluído e de sêmen diluído de ambas variedades, foram avaliadas pelo sistema CASA (TABELAS 5 e 6). Ao longo do tempo, como esperado todas as amostras decresceram tanto para a taxa de motilidade, quanto para VCL nos 120 s que correram após a ativação.

No tempo de 10 s as amostras não diferiram entre si para nenhuma das variedades, para os parâmetros de taxa de motilidade e VCL (77% e $57 \mu\text{m s}^{-1}$ para a variedade GIFT; 69% e $65 \mu\text{m s}^{-1}$ para a variedade UFLA). Já nos tempos seguintes, as amostras de sêmen diluído apresentaram ampla variação entre os diluidores e entre as variedades, enquanto que a amostra controle não diluído se manteve sempre entre os maiores resultados.

Para a variedade GIFT, no tempo 30 s após a ativação, maiores taxas de motilidade foram encontradas para as amostras controle não diluído (74%) e sêmen diluído em citrato de sódio (59%), cloreto de sódio (65%) e cloreto de potássio (65%). Já para VCL, maiores valores foram encontrados para controle não diluído ($53 \mu\text{m s}^{-1}$) e sêmen diluído em cloreto de sódio ($55 \mu\text{m s}^{-1}$), cloreto de potássio ($47 \mu\text{m s}^{-1}$) e glicose ($45 \mu\text{m s}^{-1}$). Sessenta segundos após a ativação, as maiores taxas de motilidade foram encontradas para as amostras controle não diluído (57%) e sêmen diluído em cloreto de sódio (50%), cloreto de potássio (51%), enquanto que não houve diferenças entre as amostras para VCL neste tempo ($38 \mu\text{m s}^{-1}$). Nos tempos de 90 s e 120 s não houve diferenças para taxa de motilidade e para VCL (42% e $27 \mu\text{m s}^{-1}$; 34% e $23 \mu\text{m s}^{-1}$ respectivamente).

Para a variedade UFLA, no tempo 30 s após a ativação, maiores taxas de motilidade foram encontradas para as amostras controle não diluído (67%) e sêmen diluído em cloreto de potássio (59%) e glicose (60%). Já para VCL, maiores valores foram encontrados para controle não diluído ($72 \mu\text{m s}^{-1}$) e sêmen diluído em citrato de sódio ($66 \mu\text{m s}^{-1}$), cloreto de sódio ($63 \mu\text{m s}^{-1}$) e glicose ($67 \mu\text{m s}^{-1}$). Nos tempos de 60 e 90 s após a ativação, as maiores taxas de motilidade foram encontradas para as amostras controle não diluído (43% e 25%) e sêmen diluído em cloreto de sódio (38% e 24%), cloreto de potássio (45% e 23%) e glicose (35% e 26%), enquanto que não houve diferenças entre as amostras para VCL neste tempo ($52 \mu\text{m s}^{-1}$ e $44 \mu\text{m s}^{-1}$), respectivamente. Cento e vinte segundo após a ativação, as maiores taxas de motilidade foram encontradas para as amostras controle não diluído (18%) e sêmen diluído em bicarbonato de sódio (16%), cloreto de sódio (20%) e glicose (18%), enquanto que para VCL somente a amostra de sêmen diluído em cloreto de cálcio obteve o menor valor ($15 \mu\text{m s}^{-1}$).

Pode-se observar um resultado em comum entre as variedades para a taxa de motilidade: no tempo de 10 s após a ativação, todas as amostras foram iguais para ambas as variedades, no entanto, nos tempos de 30 e 60 s, a amostra de sêmen diluído em bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio obtiveram os menores valores, enquanto que a amostra controle não diluído obteve as maiores taxas para ambas variedades. No tempo de 90 s as maiores taxas encontradas para as ambas variedades foram para a amostra controle não diluído e as amostras de sêmen diluído em cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose. No tempo de 120 s as maiores taxas foram encontradas nas amostras controle não diluído e amostras de sêmen diluído em bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e glicose.

Para VCL pode-se observar que não houve diferença entre os tratamentos nos tempos 10 s, 60 s e 90 s para ambas variedades. No tempo de 30 s as maiores velocidades foram encontradas para a amostra controle não diluído e amostra de sêmen diluído em cloreto de sódio e glicose, sendo as piores velocidades encontradas nas amostras de sêmen diluído em bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio. Já no tempo de 120 s as maiores velocidades foram das amostras controle não diluído, amostra de sêmen diluído em bicarbonato de sódio, citrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose.

Tabela 5 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído) por meio da taxa de motilidade (%), dentro de cada tempo (s) após a ativação, utilizando o sistema CASA, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=5, média \pm DP).

VARIEDADE GIFT					
Tratamentos	10 s	30 s	60 s	90 s	120 s
Controle não diluído	77 \pm 10 ^a	74 \pm 9 ^a	57 \pm 12 ^a	42 \pm 8 ^a	32 \pm 6 ^a
Bicarbonato de sódio	62 \pm 8 ^a	38 \pm 6 ^c	34 \pm 8 ^b	39 \pm 20 ^a	34 \pm 7 ^a
Citrato de sódio	56 \pm 11 ^a	59 \pm 11 ^a	45 \pm 12 ^b	33 \pm 13 ^a	29 \pm 5 ^a
Cloreto de sódio	64 \pm 13 ^a	65 \pm 9 ^a	50 \pm 6 ^a	41 \pm 7 ^a	31 \pm 5 ^a
Cloreto de potássio	64 \pm 17 ^a	65 \pm 17 ^a	51 \pm 13 ^a	30 \pm 3 ^a	26 \pm 6 ^a
Cloreto de cálcio	60 \pm 9 ^a	53 \pm 10 ^b	39 \pm 10 ^b	30 \pm 6 ^a	26 \pm 9 ^a
Glicose	64 \pm 11 ^a	53 \pm 11 ^b	45 \pm 9 ^b	33 \pm 6 ^a	27 \pm 4 ^a
VARIEDADE UFLA					
Tratamentos	10 s	30 s	60 s	90 s	120 s
Controle não diluído	69 \pm 14 ^a	67 \pm 15 ^a	43 \pm 15 ^a	25 \pm 14 ^a	18 \pm 15 ^a
Bicarbonato de sódio	44 \pm 26 ^a	19 \pm 10 ^c	16 \pm 14 ^b	17 \pm 19 ^b	16 \pm 18 ^a
Citrato de sódio	47 \pm 26 ^a	40 \pm 33 ^b	27 \pm 26 ^b	15 \pm 13 ^b	14 \pm 15 ^b
Cloreto de sódio	50 \pm 34 ^a	49 \pm 20 ^b	38 \pm 20 ^a	24 \pm 13 ^a	20 \pm 14 ^a
Cloreto de potássio	44 \pm 20 ^a	59 \pm 23 ^a	45 \pm 27 ^a	23 \pm 22 ^a	15 \pm 15 ^b
Cloreto de cálcio	59 \pm 19 ^a	49 \pm 24 ^b	21 \pm 18 ^b	12 \pm 14 ^b	11 \pm 14 ^b
Glicose	55 \pm 27 ^a	60 \pm 28 ^a	35 \pm 19 ^a	26 \pm 14 ^a	18 \pm 12 ^a

Fonte: Da autora (2018).

Tabela 6 - Comparação entre os tratamentos (sêmen diluído e não diluído), por meio da velocidade curvilinear (μs^{-1}), dentro de cada tempo (s) após a ativação, utilizando o sistema CASA, para as duas variedades de tilápia do Nilo (n=5, média \pm DP).

VARIEDADE GIFT					
Tratamentos	10 s	30 s	60 s	90 s	120 s
Controle não diluído	57 \pm 6 ^a	53 \pm 2 ^a	38 \pm 5 ^a	26 \pm 4 ^a	21 \pm 2 ^a
Bicarbonato de sódio	40 \pm 10 ^a	30 \pm 5 ^c	27 \pm 12 ^a	25 \pm 4 ^a	23 \pm 4 ^a
Citrato de sódio	41 \pm 10 ^a	41 \pm 8 ^b	32 \pm 7 ^a	27 \pm 8 ^a	21 \pm 5 ^a
Cloreto de sódio	51 \pm 6 ^a	55 \pm 6 ^a	35 \pm 7 ^a	25 \pm 5 ^a	23 \pm 7 ^a
Cloreto de potássio	48 \pm 12 ^a	47 \pm 7 ^a	29 \pm 5 ^a	25 \pm 6 ^a	19 \pm 3 ^a
Cloreto de cálcio	48 \pm 8 ^a	39 \pm 8 ^b	29 \pm 7 ^a	23 \pm 8 ^a	22 \pm 5 ^a
Glicose	50 \pm 13 ^a	45 \pm 14 ^a	29 \pm 7 ^a	23 \pm 4 ^a	19 \pm 3 ^a
VARIEDADE UFLA					
Tratamentos	10 s	30 s	60 s	90 s	120 s
Controle não diluído	65 \pm 13 ^a	72 \pm 8 ^a	50 \pm 12 ^a	36 \pm 9 ^a	34 \pm 9 ^a
Bicarbonato de sódio	56 \pm 17 ^a	50 \pm 33 ^b	47 \pm 27 ^a	44 \pm 22 ^a	36 \pm 14 ^a
Citrato de sódio	61 \pm 22 ^a	66 \pm 20 ^a	46 \pm 13 ^a	41 \pm 15 ^a	28 \pm 18 ^a
Cloreto de sódio	65 \pm 12 ^a	63 \pm 9 ^a	47 \pm 11 ^a	40 \pm 12 ^a	33 \pm 11 ^a
Cloreto de potássio	58 \pm 17 ^a	58 \pm 5 ^b	41 \pm 2 ^a	30 \pm 10 ^a	28 \pm 8 ^a
Cloreto de cálcio	61 \pm 13 ^a	50 \pm 6 ^b	36 \pm 16 ^a	29 \pm 28 ^a	15 \pm 17 ^b
Glicose	63 \pm 9 ^a	67 \pm 5 ^a	52 \pm 13 ^a	44 \pm 14 ^a	39 \pm 16 ^a

Fonte: Da autora (2018).

4 DISCUSSÃO

De uma maneira geral, este estudo é de suma importância, pois através das informações obtidas pode-se iniciar o estabelecimento de um protocolo de reprodução artificial para tilápias. Com isso, abrirá várias possibilidades dentro da cadeia de produtiva, como a obtenção eficiente de alevinos, possibilitando a identificação individual dos animais, informações de pedigree completo, aumento da acurácia das estimativas dos valores genéticos e, conseqüentemente, atingir uma melhor resposta de seleção de programas de melhoramento genético.

No presente estudo, avaliou-se o efeito de seis diluidores no sêmen de duas variedades genéticas de tilápia do Nilo. Os diluidores foram testados quanto a sua capacidade de armazenar o sêmen por 24 h à 4 °C e quanto a sua eficácia em manter uma boa qualidade do sêmen após a ativação. Não foi reportado na literatura, estudos sobre a resposta espermática de *O. niloticus* a uma comparação entre os diluidores mais utilizados em reprodução de peixes. A escolha de um diluidor adequado é um dos primeiros passos para realizar tecnologias reprodutivas mais complexas como a criopreservação por exemplo.

Neste estudo foi utilizado a diluição de 1:10 (sêmen:diluidor), devido à alta viscosidade do sêmen. Este valor se encontra dentro da faixa recomendada por um estudo com tilápias, para que a taxa de fertilização não seja prejudicada (RANA; MCANDREW, 1989).

A osmolalidade do plasma seminal está altamente relacionada com mecanismos que regulam a motilidade dos espermatozoides, e a diferença entre a osmolalidade do sêmen e da solução diluidora pode ativar a motilidade espermática (ALAVI; COSSON, 2006; BONDARENKO et al., 2013). Pelo fato de *O. niloticus* apresentar aproximadamente 267 mOsm kg⁻¹ (resultados ainda não publicados, descritos no artigo 1), os diluidores na osmolalidade de 300 mOsm não afetaram o início da motilidade espermática da espécie em questão.

4.1 Experimento 1 - Avaliação subjetiva do sêmen diluído e refrigerado durante 24 horas

As diferentes composições dos diluidores, afetaram a motilidade espermática da variedade GIFT nos tempos 0 e 0,5 h onde houve uma grande variação nos valores, demonstrando uma demora para o sêmen se estabilizar com diluidor. O mesmo não ocorreu com a variedade UFLA nos mesmos tempos, onde todos os diluidores se mantiveram

equivalentes ao controle não diluído. Outros trabalhos obtiveram resultados similares aos encontrados para variedade UFLA, quando estudaram diluidores iônicos (cloreto de sódio) e não iônicos (glicose) em *Danio rerio* (WILSON-LEEDY et al., 2009), *Exos lucius* L. (ALAVI et al., 2009), *Vimba vimba* (ALAVI et al., 2010).

Nos tempos de 1 h e 3 h praticamente não houve diferenças entre os tratamentos para nenhuma das variedades, salvo no tempo de 3 h cujo a amostra diluída em cloreto de cálcio foi inferior as demais para a variedade GIFT.

O tempo de 6 h após a diluição e resfriamento, pode ser considerado um tempo adequado para que as práticas do manejo reprodutivo artificial sejam sincronizadas, ou ainda, tempo suficiente para transportar esse sêmen para outras pisciculturas, por isso esse tempo foi o escolhido para comparações entre as duas variedades. Neste tempo, todas as amostras de sêmen diluído se mantiveram acima de 30% de motilidade para a variedade UFLA, enquanto que para a variedade GIFT apenas para o bicarbonato de sódio, citrato de sódio, cloreto de sódio e glicose se mantiveram acima de 30% de motilidade, demonstrando assim uma resistência maior do sêmen da variedade UFLA ao resfriamento. De uma maneira geral, na aplicação prática, amostras de sêmen mantidas resfriadas e com motilidade de, pelo menos 30%, poderiam ser utilizadas sem prejuízos em procedimentos de desova induzida em laboratório (MARQUES; GODINHO, 2004). Ainda nesse tempo, pode-se observar o pior desempenho tanto para taxa de motilidade, quanto para vigor, das amostras de sêmen diluído em cloreto de potássio e cloreto de cálcio, para ambas variedades.

Vale salientar ainda, que as taxas de motilidade subjetiva e vigor espermático das amostras da variedade UFLA, foram maiores do que as encontradas para a variedade GIFT. Isso pode ser explicado pelo fato da variedade UFLA ter sofrido seleção indireta para crescimento e acasalamento ao acaso no local do experimento durante muitos anos, o que sugere um melhor desempenho reprodutivo da mesma, pois esses fatores tem como efeito ao longo das gerações estabelecer uma população adaptada à atual condição ambiental.

Tilápias melhoradas como a GIFT por exemplo, tem o foco de seleção para a características produtivas como crescimento, o ganho em peso e peso corporal à despesca (YOSHIDA et al., 2013, REIS NETO et al., 2014) e rendimento de filé (GJERDE et al., 2012; NGUYEN et al., 2010). Essa seleção tende negligenciar características como as reprodutivas (baixa herdabilidade) por exemplo, que não são de interesse para o programa a curto prazo. Quando a herdabilidade é baixa, os efeitos ambientais contribuem mais para a variação fenotípica do que os efeitos genéticos aditivos (GJEDREM; THODESEN, 2005), o que dificulta muito a seleção desses animais para as características reprodutivas.

A hipótese de um possível melhor desempenho reprodutivo da UFLA em relação à GIFT, pode ser comprovada pelo fato de após doze horas de resfriamento, a variedade GIFT não possuir nenhuma amostra acima de 30% de motilidade, além de apresentar os valores mais baixos para taxa de motilidade subjetiva. E por sua vez, a variedade UFLA apresentou três amostras de sêmen diluído com motilidade acima de 30%, sendo as amostras de sêmen diluído em citrato de sódio, cloreto de sódio e glicose.

Outro fator importante é o fato das soluções diluidoras que continham o íon Na^+ presente, estar sempre entre os melhores resultados para as ambas variedades. Isso pode ser devido a afinidade com a grande quantidade do íon Na^+ presente no plasma seminal de *O. niloticus*, que possui $145,35 \text{ mmol}^{-1}$ de Na^+ e também $0,85 \text{ mmol}^{-1}$ de Ca^{2+} e $2,5 \text{ mmol}^{-1}$ de K^+ (resultados ainda não publicados, descritos no artigo 1). Essas informações são muito importantes, porque apesar da possibilidade de se utilizar diluentes desenvolvidos para uma espécie em outra (LEGENDRE e BILLARD, 1980), cada espécie possui sua peculiaridade e composição iônica do plasma seminal diferentes, e por isso requer seu próprio diluente (OTT e HORTON, 1971) para um melhor aproveitamento desse sêmen.

Existem vários estudos com a utilização do íon Na^+ compondo soluções diluidoras, como um estudo conduzido com bagre africano (*Clarias macrocephalus*) que encontrou taxas de motilidade de 51% do sêmen diluído em cloreto de sódio, após dois dias de estocagem (VUTHIPHANDCHAI; THADSRI; NIMRAT, 2009); ou mesmo outro estudo que utilizando um diluidor comercial enriquecido com citrato de sódio para diluir o sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), obteve resultados de 80% de taxa de motilidade logo após a diluição (MARIA et al., 2004).

As amostras de sêmen diluído em glicose apresentaram resultados satisfatórios nesse estudo. A glicose vem sendo amplamente utilizada como diluidor de sêmen, tanto na forma mais simples (glicose 5%), como de forma mais complexa em conjunto com outras substâncias (VIVEIROS; GODINHO, 2009) e isso porque possui efeitos de estabilização na membrana dos espermatozoides, agindo também como substrato de energia (QUINN, 1985; HOLT, 2000). Os açúcares, de uma maneira geral têm sido utilizados por sua capacidade de melhorar a motilidade dos espermatozoides de várias espécies de peixes como truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (CIERESZKO et al., 2014; NYNCA et al., 2017; JUDYCKA et al., 2018), bagre africano (*Clarias gariepinus*) (URBÁNYI et al., 1999), esturjão siberiano (*Acipenser baeri*) (GLOGOWSKI et al., 2002) e dourado (*Salminus brasiliensis*) (CAROLSFELD et al., 2003).

Os efeitos positivos do íon sódio e da glicose podem ser comprovados pelo fato de os dois manterem o sêmen com capacidade fertilizante por mais horas para ambas variedades. Para a variedade GIFT os diluidores que preservam melhor o sêmen por maior tempo de resfriamento foi a glicose (11,3 h) seguido pelo cloreto de sódio (10,9 h), enquanto que para a UFLA primeiramente foi o cloreto de sódio (15,0 h), seguido pela glicose (14,5 h).

4.2 Experimento 2 - Avaliação do sêmen diluído imediatamente após a ativação por 120 s, através do sistema CASA

Como esperado, a taxa de motilidade e a velocidade curvilínea foi decrescendo após a ativação à medida que os segundos foram passando. No entanto, os valores da taxa de motilidade avaliada pelo CASA da variedade GIFT foram maiores que da variedade UFLA, isso se deve a uma maior resistência a manipulação para o manejo da primeira variedade em relação a segunda, uma vez que a variedade UFLA pareceu não ter recuperado da primeira coleta de sêmen, no período de tempo estipulado. Isso pode ser um indicativo de algum ganho indireto da variedade GIFT devido a seleção para características de produção.

Num primeiro momento, as amostras de sêmen de ambas as variedades não apresentaram diferenças. Após os 10 s iniciais a taxa de motilidade apresentou ampla variação para ambas variedades. Um fator comum para as duas variedades, foi que o sêmen diluído em bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio, apresentaram a menor taxa de motilidade até o tempo de 60 s.

Após esse tempo, as amostras voltaram a divergir entre si, entretanto alguns estudos com peixes de água doce demonstraram a formação do cone de fertilização que impede que ocorra a poliespermia, ocorre logo nos segundos iniciais, não ultrapassando os 60 s (NEUMANN et al., 2007; MARIA et al., 2008; GANECO et al., 2009; ORFÃO et al., 2011; ISAUÍ et al., 2013), sugerindo assim que não é necessário mais do que esse tempo para que um espermatozoide possa fecundar um ovócito. Algumas observações de microscopia eletrônica de varredura realizadas com tilápias, mostraram que alguns eventos do processo de fertilização, envolvendo a chegada do espermatozoide ao canal micropilar, até a sua penetração no citoplasma do ovócito, ocorrem muito rapidamente (frações de segundo). No entanto, a cauda do espermatozoide permanece fora por cerca de 1-2 min (BERN; AVTALION, 1990)

Quanto a análise da VCL, a variedade UFLA apresentou valores maiores do que a variedade GIFT, demonstrando que os machos da variedade UFLA são tão velozes quantos os da variedade GIFT em termos de qualidade de sêmen, quando criados na região de Lavras.

5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a variedade UFLA pode ser uma boa opção para a possíveis ensaios de reprodução artificial, em regiões cujas condições climáticas são semelhantes às condições da região sul de Minas Gerais. A variedade GIFT apresentou alguns dos resultados reprodutivos inferiores ao da UFLA devido aos muitos anos de melhoramento genético, com seleção e cruzamentos voltados para características produtivas negligenciando as características reprodutivas.

Por isso, pode-se resfriar o sêmen da variedade GIFT em qualquer diluidor por apenas uma hora, enquanto que o sêmen da variedade UFLA resiste ao resfriamento por seis horas em qualquer um dos diluidores testados. As amostras de sêmen diluído variaram muito nos dois experimentos, somente as soluções de cloreto de sódio e glicose obtiveram bons resultados em ambos experimentos, assim podem ser utilizadas para a diluição de sêmen em ambas as variedades de *O. niloticus*.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S.M.H.; KOZAK, P.; HATEF, A.; HAMACKOVA, J.; LINHART, O. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, v. 74, p. 317-325, 2010.
- ALAVI, S.M.H.; RODINA, M.; VIVEIROS, A.T.M.; 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**, v. 72, p. 32-43, 2009.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- BERN, O.; AVTALION, R.R. Some morphological aspects of fertilization in tilapias. **Journal Fish Biology**, n. 36, p. 375-381, 1990.
- BONDARENKO O, DZYUBA B, COSSON J, YAMANER G, PROKOPCHUK G, PSENICKA M, LINHART O. 2013. Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: interspecies differences. **Theriogenology**, 79:872-881.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.
- CIERESZKO, A.; DIETRICH, G.J.; NYNCA, J.; DOBOSZ, S.; ZALEWSKI, T. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. **Aquaculture**, v. 420, p. 275-281, 2014.
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R. Reproductive physiology of female tilapia brood stock. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 1-12, 2000.
- DANTAS, A.A.A.; CARVALHO, L. G.; FERREIRA, E. Comunicação classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, 2007.
- DIAS, M.A.D.; FREITAS, R.T.F.; ARRANZ, S.E.; VILLANOVA, G.V.; HILSDORF, A.W.S. Evaluation of the genetic diversity of microsatellite markers among four strains of *Oreochromis niloticus*. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, v. 47, p. 345–353, 2016.
- FAO (**Food and Agriculture Organization of the United Nations**). The States of the the state of world fisheries and aquaculture, 2016.
- FAO (**Food and Agriculture Organization of the United Nations**). The States of the the state of world fisheries and aquaculture, 2014.

- FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin - based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480-487, 2010.
- GJEDREM, T., THODESEN J. Selection. In: Gjedrem, T. **Selection and Breeding Programs in Aquaculture**. Published by Springer, p. 89-110, 2005.
- GJERDE, B.; MENGISTU, S.B.; ØDEGÅRD, J.; JOHANSEN, H.; ALTAMIRANO, D.S. Quantitative genetics of body weight, fillet weight and fillet yield in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 342, p. 117- 124, 2012.
- GLOGOWSKI, J.; KOLMAN, R.; SZCZEPKOWSKI, M.; KOLMAN, R.; SZCZEPKOWSKI, M.; HORVÁTH, Á.; URBÁNYI, B.; SIECZYŃSKI, P.; RZEMIENIECKI, A.; DOMAGAŁA, J.; DEMIANOWICZ, W.; KOWALSKI, R.; CIERESZKO, A. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. **Aquaculture**, v. 211, n. 1-4, p. 367-373, 2002.
- GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.351-360, 2007.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- IBGE - **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Pesquisa Pecuária Municipal, 2016. [online] Disponível em:< <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>>. Acesso em: 14 mai. 2018.
- ISAÚ, Z.A; RIZZO, E.; AMARAL, T.B., MOURAD, N.M.N; VIVEIROS, A.T.M. Structural analysis of oocytes, post-fertilization events and embryonic development of the Brazilian endangered teleost *Brycon insignis* (Characiformes). **Zygote**, v. 21, p. 85-94, 2013. doi:10.1017/S0967199411000396.
- JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; LISZEWSKA, E.; DOBOSZ, S.; SŁOWIŃSKA, M.; RÓŻYŃSKI, R.; CIERESZKO, A. Cryopreserved rainbow trout semen can be used for the fertilization of up to 8000 eggs in a single application. **Aquaculture**, v, 490, p. 25-28, 2018.
- LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, v. 20, p. 1859-1868, 1980.
- LÓPEZ, D.I.; LEAL, M.C.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition and osmolality affects post-thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes) sperm. **Journal Applied Ichthyology**, v. 31, p. 114-118, 2015. DOI: 10.1111/jai.12743.
- MARIA, A.N. (2008). Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther,1864). PhD Thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil. 2008.

- MARIA, A.N.; MURGAS, L.D.S.; SILVA, M.O.B.; MILIORINI, A.B.; FRANCISCATTO, R.T.; LOGATO, P.V.R. The effects of potassium iodide and sodium citrate on semen quality of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p.191-194, 2004.
- NAVARRO, R.D., NAVARRO, F.K.S.P., FELIZARDO, V.O., MURGAS, L.D.S., PEREIRA, M.M. Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis* spp.) fed diet with different oil sources. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 36, n. 3, p. 399-404, 2014.
- NEUMANN, E., MENDES, J.M.R. & NAKAGHI, L.S.O. Momentos da fertilização induzida em jatuarana *Brycon* sp. (Teleostei, Characidae) em microscopia eletrônica de varredura. In: Congresso brasileiro de produção de peixes nativos de água doce, 1, Dourados. Anais ISSN 1809 9718; 87 Dourados: Painel Proceedings. 4 pp, 2007.
- NGUYEN, N.H., PONZONI, R.W., ABU-BAKAR, K.R., HAMZAH, A., KHAW, H.L., YEE, H.Y. Correlated response in fillet weight and yield to selection for increased harvest weight in genetically improved farmed tilapia (GIFT strain), *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 305, p. 1- 5, 2010.
- NYNCA, J.; JUDYCKA, S.; LISZEWSKA, E.; DOBOSZ, S.; CIERESZKO A. Standardization of spermatozoa concentration for cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose methanol extender. **Aquaculture**, v. 477, p. 23-27, 2017.
- OLIVEIRA, M.M., FERREIRA, M.R., GOULART, M.B., FELIZARDO, V.O., MURGAS, L.D.S., ANDRADE, E.S., ALLAMAN, I.B., VERAS, G.C., COSTA, D.V., ROSA, P.V. Effect crude protein levels on the broodstock spermatid quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 192-199, 2015.
- ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, v. 311, p. 241-247, 2011. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.041
- OTT, A. G.; HORTON, H. F. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. **Journal Fish Research**, v. 28, p. 745-748, 1971.
- RANA, K.; MCANDREW, J. The viability of cryopreserved tilapia sperm. **Aquaculture**, v. 76, p. 333-345, 1989.
- REIS NETO, R.V.; OLIVEIRA, C.A.L.; RIBEIRO, R.P.; FREITAS, R.T.F.; ALLAMAN, I.B.; OLIVEIRA, S.N. Genetic parameters and trends of morphometric traits of GIFT tilapia under selection for weight gain. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 259- 265, 2014.
- RIGHETTI, J.S.; FURUYA, W.M.; CONEJERO, C.I.; GRACIANO, T.S.; VIDAL, L.V.O.; MICHELLATO, M. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-Nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 469-476, 2011.
- SÁ JÚNIOR, A.; CARVALHO, L.G.; SILVA, F.F.; ALVES, M.C. Application of the Köppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 108, n. 1, p. 1-7, 2012.

- URBÁNYI, B.; HORVÁTH, Á.; VARGA, Z.; HORVÁTH, L.; MAGYARY, I.; RADICS, F. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariiepinus* (Burchell). **Aquaculture Research**, v.30, n. 2, p.145-151, 1999.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; THADSRI, I.; NIMRAT, S. Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. **Aquaculture**, v. 296, p. 58-64, 2009.
- VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; LEAL, M.C. Biologia e Conservação de Espermatozoides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. 1ª Edição. EDITORA FUNEP, p.307-327, 2014.
- VIVEIROS, A.T.M.; AMARAL, T.B.; ORFÃO, L.H.; ISAU, Z.A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M.C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 858-865, 2011. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x
- VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.
- WILSON-LEEDY, J.G.; KANUGA, M.K.; INGERMANN, R.L. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. **Theriogenology**, v. 71, p. 1054-1062, 2009.
- WORLD FISH 2018. [online] Disponível em:< <https://www.worldfishcenter.org/content/gift-improved-farmed-tilapia> >. Acesso em: 14 mai.
- YOSHIDA, G.M.; OLIVEIRA, C.A.L.; OLIVEIRA, S.N.; KUNITA, N.M.; RESENDE, E.K.; ALEXANDRE FILHO, L.; RIBEIRO, R.P. Associação entre características de desempenho de tilápia- do- nilo ao longo do período de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 816- 824, 2013.