



ULISSES NASCIMENTO DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DE APLICAÇÃO E
DA VARIEDADE GENÉTICA EM TILÁPIAS
Oreochromis niloticus SUBMETIDAS À INDUÇÃO
HORMONAL COM HCG**

LAVRAS-MG

2013

ULISSES NASCIMENTO DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DE APLICAÇÃO E DA VARIEDADE
GENÉTICA EM TILÁPIAS *Oreochromis niloticus* SUBMETIDAS À
INDUÇÃO HORMONAL COM HCG**

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

Orientador

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas

LAVRAS-MG

2013

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

Souza, Ulisses Nascimento de.

Influência do horário de aplicação e da variedade genética em
tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com
HCG / Ulisses Nascimento de Souza. – Lavras : UFLA, 2013.

71 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Rilke Tadeu Fonseca de Freitas.

Bibliografia.

1. Peixes. 2. Fotoperíodo. 3. GIFT. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 639.37580416

ULISSES NASCIMENTO DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DO HORÁRIO DE APLICAÇÃO E DA VARIEDADE
GENÉTICA EM TILÁPIAS *Oreochromis niloticus* SUBMETIDAS À
INDUÇÃO HORMONAL COM HCG**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2013.

Dr. João Vicente Neto	IFMT
Dr. Luis David Solis Murgas	UFLA
Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA
Dra. Viviane de Oliveira Felizardo	UFLA

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Orientador

LAVRAS - MG

2013

DEDICO

Aos meus pais, Profa. Lúcia e Prof. Chiquinho, ambos, “in memoriam”, pela amorosa dedicação com que me fizeram trilhar o melhor caminho. Coração amplo, eles atenderam com o melhor dos seus esforços a todos os seus filhos e, multiplicados, iluminaram, enquanto educadores, o despertar de todos os jovens a quem ensinou, com prazer, os primeiros passos de uma caminhada positiva;

Aos meus filhos, Anderson, Ulisses Júnior e Andréia, e a netinha Ana Beatriz, vocês irradiam força e garra que me fazem vencer;

Aos meus irmãos, Marcos e Mara Lúcia, aos sobrinhos (as), afilhados(as), pelos momentos de oração e apoio fundamental que debruçaram sobre mim;

À Thaline, pela dedicação e apoio em tudo que realizei, pela compreensão e tolerância nos momentos difíceis, por entender que a união faz a força e facilita alcançar os sonhos almejados. Você foi e será muito importante em todos os passos a seguir, e estará sempre presente em meu coração.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Os resultados positivos deste trabalho foram viabilizados pela contribuição insubstituível de inúmeras pessoas e instituições que, não medindo esforços, contribuíram decisivamente para coroá-lo de êxito. A elas devo gratidão;

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela infraestrutura, suporte técnico e apoio durante os estudos e a pesquisa;

A CAPES/PIQDTEC, pela bolsa de estudo concedida durante o Doutorado;

A Direção e colegas do IFMT-Campus São Vicente, pelo apoio durante a minha ausência;

A Loja Agropecuária, Casa da Vaca em Lavras e Perdões - MG, pela doação de parte do hormônio utilizado na pesquisa;

Pela dedicação, complacência, ensinamentos e confiança, agradeço especialmente ao meu Orientador, Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas;

Aos Professores Coorientadores, Dr. Raimundo Vicente de Sousa, Dra. Viviane de Oliveira Felizardo e Dr. João Vicente Neto, pela amizade, ensinamentos e pela disponibilidade em ajudar ao longo desta caminhada;

Aos Doutores Daniel Okamura, Galileu Crovatto Veras, Mônica Rodrigues Ferreira Machado, Priscila Vieira e Rosa, Viviane de Oliveira Felizardo, pela amizade, ensinamentos e contribuição durante o processo de qualificação;

Aos Doutores João Vicente Neto, Luis David Solis Murgas, Priscila Vieira e Rosa e Viviane de Oliveira Felizardo, por se disponibilizarem em fazer parte da banca de defesa de Tese;

Aos Professores que tiveram a oportunidade de transmitir seus conhecimentos e possibilitaram sermos pesquisadores;

Aos Doutores (as) Rafael Vilhena, Viviane Felizardo e Mônica Rodrigues, pela valiosa contribuição durante a execução da Pesquisa e Tese;

Aos colegas Mestrandos (as) e Doutorandos (as) que durante estes quatro anos convivemos juntos, pela colaboração e companheirismo nesta árdua caminhada;

Citar nomes é difícil, pois várias pessoas contribuíram e dedicaram parte de seu tempo a favor de nosso trabalho, mas em nome de Luis Felipe, Matheus Hernandez, Carlos Cicinatto, Lucas, Antonio, Maira, Edgar, Túlio, Hortência, agradeço a todos pelo esforço e dedicação durante todas as etapas de desenvolvimento da pesquisa;

Durante os quatro anos, obtivemos a colaboração de Aline, Adriano, Bruno Mattos, Bruno Fabrini, César Garbosa, Daniella, Diego, Estefânia, Gláucia, Juliana Lima, Leandro, Marinez e Renan, Athalita, a todos vocês meu reconhecimento;

Aos colegas da Disciplina de Estatística, Carlão, Jovane e Renato, pelas noites de sono perdidas e os arrochos no decorrer das aulas e avaliações;

Aos Servidores da piscicultura Eleci Pereira e José Roberto dos Santos, e ao Servidor do PPGCV, José Reinaldo, pela amizade, presteza e dedicação sempre que precisamos;

Aos Bolsistas PIBIC, pela contribuição e apoio na execução das tarefas;

Ao Maurício e família e ao Jair a quem agradeço a todos os meus familiares “Nascimento”, pelo apoio e carinho no dia a dia e nas horas difíceis que enfrentamos;

Aos companheiros de origem, Afrânio Baião, Ademir Conte, Anderson Barbieri, Andrea, Antonio (Tota), Iara, Idelton, Ivanildo, José Babilônia, José Masson, Juanilso, Lourenço, Magda, Moacir Marconatto, Moisés, Ricardo,

Rodrigo Busatto, Rosa Lourenço, Silvana Pedroso, pela força e o apoio durante esta jornada;

Aos Lavrenses, em nome de Juliana Silva, Graziane, ao casal Sérgio e Antonia Salgado, por terem me recebido de braços abertos e pelo acolhimento durante o período de estudo;

Não podia faltar o Restaurante do André, Bar e Restaurante do Toninho, Bar da Lu e Bar do Márcio, locais de refúgio e confraternização por onde várias vezes estivemos presentes para vencer e superar as angustias diárias;

A Deus, por fortalecer-me e por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida;

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto que acima de tudo foi um grande desafio para minha pessoa.

Agradeço e muito obrigado!!!!

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará”

Salmo 23

“Nossa maior fraqueza é a desistência. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas uma vez mais”.

Thomas Alva Edison

“A virtude é difícil de se manifestar, precisa de alguém para orientá-la e dirigi-la. Mas os vícios são aprendidos sem mestre”.

Sêneca

“Os bons pensamentos produzem bons frutos, os maus pensamentos produzem maus frutos.. e o homem é seu próprio jardineiro”.

James Allen

RESUMO GERAL

Com este trabalho objetivou-se avaliar a influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas e machos de tilápias do nilo submetidas a indução hormonal com HCG. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, para fêmeas utilizou-se um esquema fatorial 2x4x2 (duas variedades, quatro horários de aplicação, com e sem HCG), sendo quatro repetições para os tratamentos controle e seis para induzidos com HCG; para os machos um fatorial 2x4 (duas variedades e quatro horários de aplicação do HCG) com cinco repetições. Nos dois casos, a unidade experimental foi o indivíduo. Foram utilizados 20 machos e 40 fêmeas das variedades GIFT e 20 machos e 40 fêmeas da variedade UFLA, microchipados, alojados em um sistema de recirculação de água. Para os machos os quatro horários de aplicação hormonal avaliados foram 6; 12; 18 e, 24 horas em dose única para cada animal e as fêmeas os horários de indução do HCG e soro fisiológico foram distribuídos em 04 sistemas de aplicação, sendo: Sistema 1: 6/24 h (1ª dose/2ª dose); Sistema 2: 12/6 h; Sistema 3: 18/12 h e Sistema 4: 24/18 horas. A dosagem de HCG foi de 5 UI/grama de peso de peixe. A espermiacão e a extrusão dos ovócitos foram realizadas 24 horas após a última aplicação, mediante massagem celomática. Foi observado o número de animais que apresentaram liberação de gametas e nas fêmeas avaliados o índice de desova, fecundidade absoluta e absoluta relativa ao peso e comprimento, diâmetro e posição periférica da vesícula germinativa; nos machos foram avaliadas a concentração, volume, motilidade e duração espermática e quantidade de células normais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5% de significância. Para fêmeas a indução hormonal com HCG foi influenciada pela variedade e pelo horário de aplicação. A variedade UFLA respondeu melhor a indução hormonal quando realizada nos horários de 6 e 12 horas. Nos machos das variedades genéticas UFLA e GIFT o horário de aplicação hormonal com HCG afetou a resposta à indução e responderam de formas diferentes.

Palavras - chave: Fotoperíodo. GIFT. HCG. Peixe.

GENERAL ABSTRACT

This work aimed at evaluating the influence of the time of application and of genetic variability in female and male Nile tilapias submitted to hormonal induction with HCG. The experiments were conducted in a completely randomized design. A 2x4x2 (2 varieties, 4 application times, with and without HCG) factorial scheme was used for the females, with 4 replicates for the control treatments and 6 for those with HCG induction. For the males, we used a 2x4 (2 varieties and 4 HCG application times) factorial scheme with 5 replicates. In both cases, the individual was considered the experimental unit. Twenty males and forty females of the GIFT variety, and twenty males and forty females of the UFLA variety, with microchips, were housed in a water recirculation system. The four hormonal application time evaluated for the males were 6; 12; 18 and 24 hours, in a single dose for each animal. For the females, the time of HCG and physiological serum induction were distributed in four application systems: System 1 – 6/24 h (1st dose/ 2nd dose); System 2 – 12/6 h; System 3 – 18/12 h and; System 4 – 24/18 hours. The HCG dosage was of 5 UI/gram of fish. The spermiation and oocyte extrusion were performed 24 hours after the last application with choelomic massage. We observed the number of animals which released gametes and, for the females we evaluated spawning index, absolute fecundity and absolute fecundity relative to weight and length, the diameter and the peripheral position of the germinal vesicle. For the males, we evaluated the sperm concentration, volume, motility and duration, and the amount of normal cells. The obtained data were submitted to variance analysis and the means were compared by the SNK test at 5% of significance. For the females, the hormonal induction with HCG was influenced by the variety and application time. The UFLA variety responded better to hormonal induction when performed at the times of 6 and 12 hours. For the males of UFLA and GIFT genetic varieties, the time of hormonal application of HCG affected the response to the induction and they responded differently.

Keywords: Photoperiod. GIFT. HCG. Fish.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- FIGURA 1 - Relação do número de ovócitos por grama de desova nas variedades UFLA e GIFT sem (sh) e com (ch) aplicação do hormônio HCG..... 39

ARTIGO 2

- FIGURA 1 - Porcentagem de espermatozoides anormais por variedades e tempo de indução em machos de tilápias das variedades UFLA e GIFT..... 64
- FIGURA 2 - Porcentagem de anormalidades espermáticas por variedade e tempo de indução em machos de tilápias 65

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- TABELA 1 - Tilápias das variedades GIFT e UFLA que desovaram com e sem indução hormonal..... 38
- TABELA 2 - Médias e desvios padrão dos parâmetros reprodutivos nas tilápias variedade UFLA nos diferentes horários de indução 41
- TABELA 3 - Médias e desvios padrão dos parâmetros reprodutivos nas tilápias variedade GIFT nos diferentes horários de indução..... 41
- TABELA 4 - Médias e desvios padrão de parâmetros reprodutivos de diferentes variedades de tilápia nilótica..... 44

ARTIGO 2

- TABELA 1 - Tilápias induzidas que espermiaram em diferentes horários de indução com HCG..... 60
- TABELA 2 - Médias e desvios padrão de variáveis relacionadas à qualidade espermática nas diferentes variedades de tilápias e diferentes horários de indução 62

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO..... 14
2	REFERENCIAL TEÓRICO..... 16
2.1	Tilápia..... 16
2.1.1	Variedade GIFT 16
2.1.2	Variedade UFLA 17
2.2	Ritmo circadiano dos hormônios envolvidos da reprodução 18
2.3	Reprodução de peixes..... 19
2.4	Reprodução induzida 20
3	CONCLUSÃO..... 22
	REFERÊNCIAS 23
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 26	
	ARTIGO 1 Influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias <i>Oreochromis niloticus</i> submetidas à indução hormonal com HCG 26
	ARTIGO 2 Influência do horário de aplicação e da variedade genética em machos de tilápias <i>Oreochromis niloticus</i> submetidas à indução hormonal com HCG 51

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A tilapicultura já é uma atividade de produção bem definida e que tem novos cultivos; como alvo o melhoramento genético. A região Sudeste possui um grande potencial para o cultivo desta espécie devido seu grande manancial aquático, a disponibilidade de parques aquícolas continentais e por fazer parte das espécies autorizadas pela Portaria do IBAMA nº 145/98 (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 1998).

Uma das maiores vantagens para o cultivo da tilápia é o fato dela reproduzir naturalmente e de forma parcelada em cativeiro, o que reduz os custos de produção e proporciona maior oferta de alevinos para os diferentes sistemas de criação. Entretanto, o fato da tilápia reproduzir naturalmente em cativeiro é um complicador no controle do momento de reprodução sendo este importante nos métodos de avaliação genética dos indivíduos ou das famílias e na predição acurada de seus valores genéticos.

Programas de melhoramento eficientes serão cruciais para o desenvolvimento da tilapicultura, não só para atender a crescente demanda mundial por pescado, mas também para reduzir os custos de produção, melhorar a resistência a doenças, melhorar o aproveitamento alimentar e a qualidade dos produtos.

Mesmo considerando que as tilápias do gênero *Oreochromis* incubam seus ovos na boca, o controle da reprodução, ou seja, dos acasalamentos e das progênes produzidas, requerem infraestruturas e manejos específicos que permitam o isolamento das famílias, até que seus membros possam ser marcados e misturados com os demais em um mesmo ambiente.

De maneira geral, o processo de avaliação genética envolve a produção e teste de famílias de irmãos completos e de meio-irmãos. Para isso, o mais indicado é a utilização de um sistema de acasalamentos hierárquicos, sendo um macho para duas fêmeas, onde cada matriz é mantida em hapas individuais. A fêmea com sinais de eminente desova receberá o macho em seu hapa, depois de observada a desova, o macho é retirado e colocado no hapa da outra fêmea. Desta forma, podemos esperar que as progênies presentes no mesmo local sejam irmãos completos e de ambientes diferentes meios-irmãos. Entretanto, estas progênies seriam produzidas em momentos distintos.

A utilização de técnicas de reprodução induzida permite a identificação mais confiável das famílias e a produção simultânea de progênies de irmãos completos e de meios-irmãos, pela manipulação direta dos gametas masculinos e femininos *in vitro*. Além disso, possibilita a aplicação de biotecnologias reprodutivas, como congelamento de sêmen e ovócito, que intensificaria a difusão e conservação de material genético e a velocidade dos programas de melhoramento genético de tilápia. Os poucos trabalhos realizados com reprodução induzida em tilápia, demonstram que ela é possível e que, dentre os hormônios indutores testados, o HCG tem sido o mais eficiente.

A determinação do horário ideal de aplicação dos agentes indutores da reprodução é de fundamental importância para se estabelecer um protocolo, visto que os diferentes hormônios que atuam no processo reprodutivo do peixe têm seu pico de liberação em determinado período do dia, e estes podem atuar de maneira sinérgica ou antagônica com o hormônio indutor aplicado. No experimento foram utilizados 04 momentos de aplicação, sendo: 6-24 h (1ª aplicação - 2ª aplicação); 12-6 h; 18-12 h e às 24-18 horas.

Diante disto, com este trabalho objetivou-se avaliar a influência do horário de aplicação e da variedade genética em tilápias do nilo, *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com HCG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tilápia

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 representa 39,5% do total do pescado proveniente da piscicultura continental (BRASIL, 2012).

Entre as espécies de peixes mais cultivadas, a tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* é a que melhor resiste a altas temperaturas, baixa concentração de oxigênio dissolvido, alta concentração de amônia na água, altas densidades e rápido crescimento (POPMA; PHELPS, 1998). De acordo com Lahav e Ra'nam (1997), a tilápia apresenta como principal vantagem o baixo custo relativo, principalmente no que se refere à produção de alevinos, alimentação e qualidade da sua carne.

A maturidade sexual nas tilápias está relacionada principalmente em função da idade e do tamanho (IGARASHI, 2012). A criação em cativeiro permite melhor acompanhamento de sua eficiência reprodutiva. Em condições de cultivo favorável, a tilápia pode atingir a maturidade sexual com peso em torno de 150 a 250 g, mas alguns trabalhos mostram tilápias com peso médio de 30 g aptas a reprodução (DE-GRAAF; GALEMONI; HUISMAN, 1999; EL-SAYED, 2003; HILSDORF, 1995).

2.1.1 Variedade GIFT

Nas últimas duas décadas vários programas de melhoramento genético foram desenvolvidos para a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), como o

programa GIFT - *Genetic Improvement of Farmed Tilapia*, desenvolvido através da seleção entre e dentro de famílias, e para ganho de peso (GUPTA; ACOSTA, 2004).

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, de Israel, Singapura, Tailândia e Taiwan (BENTSEN et al., 1998).

Trinta famílias de tilápias GIFT foram introduzidas no Brasil a partir do ano de 2005, sendo o primeiro programa de melhoramento genético de peixes conduzido no país, considerando informações individuais e usando métodos estatísticos para análise genética. 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.

O projeto GIFT foi criado com o objetivo de se estudar os parâmetros genéticos sobre crescimento, tamanho de primeira maturação, sobrevivência, resistência a doenças, cor da pele, conformação corporal e tolerância ao frio (EL-SAYED, 2006).

A taxa de crescimento, sobrevivência, rendimento e qualidade dos filés fazem da GIFT uma variedade muito atraente e promissora capaz de aumentar a produção e a exportação para mercados nos países em desenvolvimento (EL-SAYED, 2006).

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 na África, e introduzida no Brasil em 1971 (FREATO, 2009). Esta variedade encontra-se na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, desde

o início da década de 70, mantidas sob acasalamento ao acaso, sem seleção e já adaptada à região.

Os dados reprodutivos desta variedade são escassos, porém em pesquisas desenvolvidas elas apresentaram grande potencial de crescimento e ganho de peso quando cultivadas em tanques-rede (FREATO, 2009).

2.2 Ritmo circadiano dos hormônios envolvidos da reprodução

O ritmo biológico pode ser definido como a repetição de um fenômeno biológico em intervalos regulares de tempo (ASCHOFF, 1981). A maioria dos animais possui um relógio endógeno que lhes proporcionam informações temporais, aptas às mudanças diárias de luz e escuro, ocorrendo um reconhecimento dos períodos do dia e da noite, da fase lunar e da época do ano em que esses organismos se encontram. O marca-passo, que controla endogenamente os ritmos biológicos, está situado no hipotálamo, na pineal e nos olhos dos vertebrados (OLIVEIRA, 2009).

Em peixes o relógio circadiano parece estar localizado na pineal, uma glândula fotossensível envolvida no controle da síntese de melatonina. A melatonina é o hormônio que age sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal desencadeando entre outros a liberação de hormônios responsáveis pela gametogênese e maturação dos gametas (CAMPOS-MENDOZA et al., 2004; RAD et al., 2006; RIDHA; CRUZ, 2000). Estudos *in vitro* sugeriram que a maioria das espécies de teleósteos possui osciladores endógenos intrapineais, que controlam o ritmo de produção da melatonina (OLIVEIRA et al., 2009).

As variações periódicas externas são utilizadas pelos animais para ajustar seu relógio interno e seus ritmos biológicos e se denominam sincronizadores ("zeitgebers"), que podem se classificar em dois tipos: fatores abióticos e bióticos. Entre os fatores abióticos, a luz e os ciclos de temperatura

são os principais sincronizadores do ritmo diário de comportamento e de expressão de genes relógio (CARR et al., 2006) e têm um papel crucial nos ritmos estacionais, como a reprodução de peixes (BROMAGE; PORTER; RANDALL, 2001).

Em peixes teleósteos, a ovulação e a desova tendem a ocorrer em determinadas horas do dia, por causa da influência fotoperiódica (MURGAS et al., 2009). Assim, pode-se considerar que essa variável ambiental é uma das mais importantes no controle da reprodução induzida. Sabe-se, que o GtH influencia a secreção e liberação dos hormônios esteróides sexuais gonadais, sendo estes os hormônios mais importantes associados com a maturação final dos ovócitos (MATSUYAMA; YOSHIHIDE; MATSUURA, 1990).

Em regiões temperadas e tropicais, a reprodução de peixes teleósteos é controlada pelo aumento ou a diminuição do fotoperíodo e temperatura, a fim de atingir máxima sobrevivência da prole, devido às condições favoráveis que são alcançadas em determinada época do ano. O fotoperíodo sincroniza a reprodução sazonal e o órgão pineal parece ser o mediador entre o ambiente e o peixe (BROMAGE; PORTER; RANDALL, 2001).

2.3 Reprodução de peixes

A tilápia apresenta reprodução parcelada, com várias desovas anuais e ciclos reprodutivos relativamente curtos. Suas principais características reprodutivas são a alta fecundidade com 100 a 3000 ovos produzidos por desovas (DUPONCHELLE; LEGENDRÉ, 1997), com tamanho entre 2 e 7,9 mm (DE-GRAAF; GALEMONI; HUISMAN, 1999). O intervalo entre desovas é influenciado pela variedade, tamanho do peixe, densidade de estocagem, proporção macho/fêmea, estado nutricional, condições de cultivo e fatores ambientais (EL-SAYED, 2006).

Estudos mostram que na tilápia do nilo a fertilização dos ovos ocorre dentro da boca das fêmeas. Hilsdorf (1995) observou que a fêmea deposita os ovos no chão do aquário e imediatamente coleta-os para a cavidade oral. O macho, por sua vez, faz a abertura do orifício da papila genital liberando líquido seminal sobre a fêmea e a mesma começa a sugar para dentro da boca. Esse processo demora em torno de 4 a 6 minutos, e, em seguida, a fêmea se retira do local da desova. Observações similares foram feitas por Freitas e Nishida (1998) e Myers et al. (1995).

2.4 Reprodução induzida

O hipotálamo é uma região específica do cérebro que, entre outros neuro-hormônios, secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH, e a dopamina, que têm influência na regulação das gonadotrofinas hipofisárias - Hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (VAZZOLER, 1996). Este mesmo autor relata que as gonadotrofinas vão atuar sobre os folículos presentes nas gônadas, promovendo a liberação de hormônios esteroides que por sua vez irão atuar na maturação dos gametas, tanto durante o ciclo reprodutivo quanto nas fases finais de maturação e ovulação. O aumento dos esteroides séricos realiza uma retroalimentação negativa no hipotálamo e hipófise modulando as funções subsequentes desses órgãos.

Os hormônios utilizados na indução hormonal podem atuar na hipófise ou gônadas. Hormônios como os análogos de GnRH e inibidores de dopamina desencadeiam estímulos hipofisários que determinam a síntese e liberação das gonadotrofinas, induzindo a maturação e liberação dos gametas. Os antagonistas dopaminérgicos bloqueiam o mecanismo de inibição da dopamina aumentando a produção de GnRH. Nas gônadas podem ser utilizadas gonadotrofinas de peixes,

macerado de hipófises desidratadas ou glicoproteínas de outras espécies como o HCG, determinando o processo final da reprodução.

A prática mais usual da utilização de hormônios na reprodução induzida de peixes no Brasil está mais relacionada à desova de peixes de piracema. Os hormônios ou preparações hormonais podem ser utilizados para adiantar o período de desova em uma população, restringir a desova a certo período, maximizar tempo e recursos, permitir maior rendimento e rotatividade dos viveiros de alevinagem. Utilizados também para sincronizar a desova de machos e fêmeas e aumentar a produção de sêmen, que é crítico em algumas espécies. Pode-se, ainda, com a ação combinada de manejo ambiental, ampliar os períodos em que os animais estão aptos para a reprodução. São infinitas as aplicações, existindo inúmeras técnicas e várias preparações hormonais disponíveis no mercado (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999).

Esta técnica de reprodução induzida, já tem sido utilizada em tilápias para garantir o horário exato de fertilização, em testes realizados por Valentin (2007) que induziu a desova de *O. niloticus* usando HCG e no qual verificou-se taxas de fertilização e eclosão acima de 50%.

3 CONCLUSÃO

Estudos relacionados à indução hormonal e considerando horários diferentes de indução reprodutiva, favorecem a uma equalização de resultados de desova na época desejada, contribuindo para obter-se um controle da progênie, identificação das famílias de origem, além de propiciar uma melhor qualidade dos gametas e embriões.

Assim os resultados deste trabalho serão úteis a novas pesquisas relacionadas à aplicação de hormônios em tilápias.

REFERÊNCIAS

ASCHOFF, J. **Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms**. New York: Plenum, 1981. v. 4, 156 p.

BENTSEN, H. B. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 160, n. 1/2, p. 145-173, 1998.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção pesqueira e aquícola: estatística 2008 e 2010**. Brasília, 2012. 128 p.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 63-98, June 2001.

CAMPOS-MENDOZA, A. et al. Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, n. 1/4, p. 299-314, Mar. 2004.

CARR, A. J. et al. Light reaches the very heart of the zebrafish clock. **Chronobiology International**, New York, v. 23, n. 1/2, p. 91-100, May 2006.

DE-GRAAF, G. J.; GALEMONI, F.; HUISMAN, E. A. Reproductive biology of pond-reared Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 25-33, Jan. 1999.

DUPONCHELLE, F.; LEGENDRE, M. Influence of space structure on reproductive traits of *Oreochromis niloticus* females. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 4., 1997, Orlando. **Proceedings...** Orlando: ITA, 1997. p. 305-314.

EL-SAYED, A. F. M. Effects of fermentation methods on the nutritive value of water hyacinth for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1/4, p. 471-478, Mar. 2003.

_____. **Tilapia culture**. Massachusetts: CABI, 2006. 275 p.

FREATO, T. A. **Interação entre variedade e plano nutricional em diferentes sistemas de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2009. 136 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FREITAS, E. G.; NISHIDA, S. M. Sneaking behaviour of the Nile tilapia. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 11, n. 1, p. 71-79, nov. 1998.

GUPTA, M. V.; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: the success history of the GIFT project. **World Fish Center Quarterly**, Penang, v. 27, n. 3/4, p. 4-14, July/Dec. 2004.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, p. 73-84, 1995.

IGARASHI, M. A. **Cultivo de tilapia**. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br>>. Acesso em: 27 abr. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Portaria nº 145**, de 29 de outubro de 1998. Aprova a Estrutura Regimental do IBAMA. Brasília, 1998. Disponível em: <http://www.institutohorus.org.br/download/marcos_legais/PORTARIA_N_145_de_29_de_outubro_de_1998.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2012.

LAHAV, E.; RA'NAN, Z. Salinity tolerance of genetically produced tilapia (*Oreochromis*) hybrids. **Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 49, n. 3, p. 160-165, 1997.

MATSUYAMA, M.; YOSHIHIDE, H.; MATSUURA, S. Effects of steroids on germinal vesicle breakdown in vitro of intact follicles in the japonese whiting, *Sillago japonica*, a marine teleost. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology**, New York, v. 96, n. 2, p. 257-261, 1990.

MURGAS, L. D. S. et al. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. p. 74-80.

MYERS, J. M. et al. Applications of induced androgenesis with tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 149-160, Dec. 1995.

OLIVEIRA, C. **Ritmos de reprodução em el lenguado senegalés: papel del órgano pineal y la melatonina como transductores de los ciclos ambientales diarios, lunares y estacionales.** 2009. 204 p. Thesis (Doctor in Animal Physiology) - Universidad of Murcia, Murcia, 2009.

OLIVEIRA, C. et al. Daily and circadian melatonin release *in vitro* by the pineal organ of two nocturnal teleost species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, New York, v. 153, n. 3, p. 297-302, July 2009.

POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling production techniques. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA: AQUICULTURA BRASIL'98, 1., 1998, Recife. **Anais...** Recife: SBA, 1998. p. 127-145.

RAD, F. et al. Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, n. 1/4, p. 292-300, May 2006.

RIDHA, M. T.; CRUZ, E. M. Effect of light intensity and photoperiod on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. seed production. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 1/4, p. 609-617, July 2000.

VALENTIN, F. N. **Efeito da idade das matrizes de tilapia do nilo *Oreochromis niloticus* no desenvolvimento embrionário e larval.** 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 1996. 169 p.

VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. Hormônios na reprodução artificial de peixes. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 55, p. 39-48, mar./abr. 1999.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 **Influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com HCG**

ARTICLE 1 **Influence of application time and genetic variability in tilapias *Oreochromis niloticus* submitted to hormonal induction with HCG**

O artigo foi normalizado de acordo com as normas para submissão do periódico científico “Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”

Influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à indução hormonal com HCG

Influence of application time and genetic variability in tilapias *Oreochromis niloticus* submitted to hormonal induction with HCG

ULISSES NASCIMENTO DE SOUZA¹

¹ Autor para correspondência: tel: (35) 88323405 / E-mail: ulns@yahoo.com.br.
Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG
37200-000 Brasil.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência do horário de aplicação e da variedade genética de fêmeas submetidas à indução com (HCG) O experimento foi realizado nos meses de julho e agosto de 2012. Utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2x4x2 (duas variedades, quatro horários de aplicação, com e sem HCG), sendo quatro repetições para os tratamentos controle e seis para induzidos com HCG. Foram utilizadas 40 fêmeas das variedades GIFT e UFLA, microchipadas, alojadas em um sistema com recirculação de água. Foram utilizados quatro horários de aplicação 6; 12; 18 e, 24 horas. A dosagem de HCG foi de 5 UI/grama de peso de peixe, dividido em duas aplicações. A extrusão dos ovócitos foi realizada 720 horas após a última aplicação, sendo observado o número de animais de cada tratamento que apresentaram desova. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste SNK a 5% de significância. A indução com HCG proporcionou melhores ($P < 0,05$) resultados para as variáveis: índice de desova (ID), fecundidade absoluta relativa ao comprimento (FARC) e peso de desova (PD), independente da variedade utilizada. A variedade UFLA não foi influenciada pelo horário de aplicação ($P > 0,05$). Já a GIFT apresentou maior ID ($P < 0,05$) quando a indução hormonal foi realizada às 24 h em relação a aplicação realizada às 18 h. O diâmetro do ovócito da variedade UFLA é maior do que a da GIFT ($P < 0,05$). Observando o grupo controle, a variedade UFLA apresentou maior porcentagem de ovócitos com posição periférica de vesícula germinativa ($P < 0,05$) em relação à GIFT. A indução hormonal com HCG foi influenciada pela variedade e pelo horário de aplicação

Palavras -chave: Frequência absoluta. Qualidade ovocitária. Reprodução induzidas.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of the application time and of the genetic variability of females submitted to hormonal induction with HCG. The experiment was performed in the months of July and August 2012. We used a completely randomized design, with a 2x4x2 (two varieties, four application times, with or without HCG) factorial scheme, with four replicates for the control treatments and six replicated for those with HCG induction. Forty females of the GIFT and UFLA varieties, with microchips, were housed in a water recirculation system. Four application times were used: 6; 12; 18 and 24 hours. The HCG dosage was of 5UI/gram of fish, divided into two applications. Oocyte extrusion was performed 720 hours after the last application, observing the number of animals of each treatment which presented spawning. The obtained data were submitted to variance analysis and the means compared by the SNK test at 5% of significance. The induction with HCG provided better ($P<0.05$) results for the variables: spawning index (SI), absolute fecundity relative to length (AFRL) and spawning weight (SW), independent of the variety used. The UFLA variety was not influenced by the time of application ($P>0.05$), while GIFT presented higher SI ($P<0.05$) when the hormonal induction was performed at 24 h in relation to the application performed at 18 h. The diameter of the oocytes of the UFLA variety was larger than that of the GIFT variety ($P<0.05$). Observing the control group, variety UFLA presented a higher percentage of oocytes with peripheral position of the

germinal vesicle ($P < 0.05$) in relation to GIFT. The hormonal induction with HCG was influenced by the variety and the time of application.

Keywords: Absolute frequency. Oocyte quality. Inducted reproductions.

INTRODUÇÃO

A tilápia possui características reprodutivas favoráveis aos programas de melhoramento genético, como alta prolificidade, maturidade sexual precoce, fecundidade relativa elevada e desova parcelada. Entretanto, faz com que o controle reprodutivo seja um dos maiores desafios na tilapicultura (TURRA *et al.*, 2010).

Os programas de melhoramento genético são importantes para o desenvolvimento da tilapicultura, não só para atender a crescente demanda mundial por pescado, mas também para reduzir os custos de produção, melhorar a resistência a doenças, o aproveitamento alimentar e a qualidade dos produtos (GJEDREM, 2000).

Para o sucesso de uma piscicultura de produção de alevinos, a qualidade dos ovos e o número de desovas é um ponto importante, pois resultarão em altas taxas de fertilização, eclosão e maior sobrevivência das larvas após a absorção do saco vitelino (BROMAGE; CUMARANATUNGA, 1992).

O uso da técnica de aplicação hormonal em peixes possibilita programar a reprodução de forma a obter resultados favoráveis no processo de seleção de animais e origem dos mesmos. As induções químicas, podem ainda ser utilizadas para antecipar o período reprodutivo, restringi-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote de matrizes, o que permite ao produtor obter alevinos em épocas onde a lucratividade seja maior, ou que o cultivo seja finalizado em período onde a comercialização seja otimizada (VENTURIERI; BERNARDINO, 1999).

Uma série de mecanismos de ajuste está envolvida no processo de maturação gonadal e desova, basicamente através de controles hormonais. No início do desenvolvimento gonadal ocorre um aumento no nível de gonadotrofinas na hipófise e no plasma, servindo provavelmente para recrutar os ovócitos e iniciar a vitelogênese no período reprodutivo corrente (MURGAS *et al.*, 2009).

Em se tratando da técnica de reprodução induzida artificialmente, esta já tem sido utilizada em tilápias para garantir o horário exato da fertilização e já foi realizada por Senthilkumaran *et al.* (2002) que induziu a desova de *O. niloticus* usando diferentes agentes indutores, como EBHC, LH-RH, HCG e um antagonista da dopamina. (VALENTIN, 2007).

Diante disto, o objetivo com o presente estudo foi avaliar a influência do horário de aplicação e da variedade genética em fêmeas de tilápias do nilo submetidas à indução hormonal com HCG.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, época de realização e animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Recirculação, da Estação de Piscicultura, do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Lavras, UFLA – MG, Brasil, durante os meses de julho e agosto de 2012. Foram utilizadas 80 fêmeas de tilápias nilóticas *O. niloticus*, oriundas da Estação de Piscicultura do DZO - UFLA, onde 40 reprodutoras eram da variedade GIFT, com idade média em torno de 02 anos com peso médio de $0,42 \pm 0,07$ kg e comprimento

médio de $21,00 \pm 1,30$ cm; e 40 da variedade UFLA, com idade média de 04 anos, pesando $0,61 \pm 0,12$ kg e comprimento total médio de $24,63 \pm 1,78$ cm.

As matrizes encontravam em tanques escavados, agrupadas por sexo, em ambiente natural, temperatura média de $17,9$ °C, as fêmeas estavam em repouso reprodutivo e sendo alimentadas duas vezes ao dia, com ração extrusada, contendo 32% de proteína bruta.

As fêmeas aptas a receberem a indução hormonal foram selecionadas mediante observação das características secundárias de maturação sexual como: abdômen abaulado e macio ao toque, papila urogenital proeminente e de coloração rosada ou avermelhada e orifício genital ligeiramente aberto.

Após a identificação de cada fêmea através da leitura do microchip, localizado próximo à nadadeira dorsal esquerda do peixe, elas foram pesadas, medidas o seu comprimento total e estes dados foram registrados em fichas e os animais acondicionados no Laboratório.

As fêmeas foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com 08 caixas de polietileno com capacidade individual de 500 litros d'água, mantidas na proporção de 10 animais/caixa, separadas de acordo com as variedades. Cada caixa de polietileno apresentava fluxo de água e aeração contínua e temperatura da água mantida em $27,7 \pm 0,1$ °C, níveis de oxigênio dissolvido $6,6 \pm 1,0$ mg.L⁻¹, e pH $6,7 \pm 0,1$.

No período experimental que compreendeu 42 dias, os animais foram submetidos a um fotoperíodo de 12 h 12 min. horas de luz:escuro (L:E) e alimentados com ração comercial extrusada contendo 36% de proteína bruta e peletes de dois milímetros de diâmetro, fornecida uma

vez ao dia “*ad libitum*”. Antes do início da indução as fêmeas permaneceram em jejum por um período de 24 horas, sendo observadas periodicamente. Nenhuma apresentou desova espontânea, porém ao aproximar do fim do período experimental pode notar-se uma evolução nas características reprodutivas.

Aplicação hormonal

As matrizes após o jejum foram induzidas artificialmente por via intramuscular com Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG), CHORULON 5000 UI, Laboratório Intervet *Shering-Plough Animal Health*, a aplicação foi realizada na base da nadadeira dorsal com dose total de 5 UI por grama de peso de peixe, dividido em duas aplicações, a primeira correspondendo a 10% da dose total e a segunda de 90%, aplicada 18 horas após a primeira dose, de acordo com a metodologia utilizada por Valentin (2007).

Durante os horários determinados foram induzidas 06 fêmeas de cada variedade com o HCG e em 04 fêmeas foram aplicadas duas doses de soro fisiológico, sendo estas, destinadas ao tratamento controle. Os momentos de indução do HCG e soro fisiológico foram distribuídos em 04 sistemas de aplicação, sendo: Sistema 1: 6/24 h (1ª dose/2ª dose); Sistema 2: 12/6 h; Sistema 3: 18/12 h e Sistema 4: 24/18 horas.

Extrusão dos gametas

Após 24 horas da aplicação da segunda dose, as fêmeas foram retiradas de suas caixas individualmente, a papila urogenital e as superfícies circunjacentes limpas e enxugadas com toalha de papel e em

seguida submetidas à massagem abdominal com suave movimento antero-posterior, para a extrusão de gametas.

Logo após a coleta e pesagem da desova, foi destinado 1 g de ovócitos para determinação do número de ovócitos/grama. O diâmetro (μm) aferido em 10 ovócitos de cada fêmea, previamente imersos em solução de Gilson (5 mL de álcool 60%, 44 de água destilada, 0,7 g ácido nítrico 80%, 1 g de cloreto de mercúrio e 0,9 mL de ácido acético glacial).

Para a análise da posição periférica da vesícula germinativa (PPVG %), 25 ovócitos de cada fêmea foram imersos em solução de Serra (60 mL de álcool 90%, 30 mL de formaldeído e 10 mL de ácido acético glacial). As análises de diâmetro e PPVG foram realizadas com auxílio de microscópio óptico a 40x Vazzoler (1996).

Após verificar a quantidade de ovócitos/g de peixe, foram realizados os seguintes cálculos: índice de desova ($ID=(PD/PF)\times 100$) onde PD = Peso da desova e PF = Peso da fêmea subtraindo o PD; fecundidade absoluta ($FA=PD \times \text{número de ovócitos em 1 g}$) isto resulta no número total de ovócitos produzidos por peixe; fecundidade absoluta relativa para peso ($FARP=(FA/PT)$) sendo o número total de ovócitos por grama do exemplar, onde PT = Peso total do animal, e fecundidade absoluta relativa para comprimento ($FARC=FA/CT$) equivale ao número de ovócitos por centímetro do animal, onde CT = Comprimento total do animal.

Os parâmetros reprodutivos foram avaliados através das metodologias usadas por Coward e Bromage (1999a, 1999b) e Godinho (2007).

Análise Estatística

Os dados obtidos das variáveis reprodutivas das fêmeas foram previamente testados quanto às pré-suposições e submetidos à análise de variância por meio de um modelo estatístico que considerou as variedades de tilápias testadas (UFLA e GIFT), a aplicação ou não de hormônio, e a interação entre estas variáveis, além dos horários de aplicação hormonal aninhados às variedades. Quando foi detectada diferença entre os horários, as médias foram comparadas pelo teste SNK adotando o nível de 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o software “R” para Windows na versão 2.13.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variedade UFLA respondeu melhor quando induzidas com o hormônio HCG, visto que 87,5% das fêmeas induzidas desovaram, enquanto que o grupo controle apresentou somente 56,3% de fêmeas desovadas. Por outro lado, a variedade GIFT parece não ser influenciada pela aplicação do hormônio HCG, sendo observada porcentagem semelhante de fêmeas desovadas entre o grupo controle e o grupo induzido (Tab. 1). Estes resultados indicam um ponto positivo da variedade UFLA em relação à GIFT, no que diz respeito à reprodução para programas de melhoramento genético.

O número de peixes que desovaram após a indução com HCG foi diferente quando comparado os horários de aplicação do hormônio. Na Tab. 1 é possível observar que tilápias da variedade UFLA, tanto no horário de aplicação 6 h e 12 h, 100% delas desovaram. Porém nos

horários noturnos 18 e 24 horas de aplicação do HCG, apenas 67% e 83% das fêmeas desovaram respectivamente.

Quando foi avaliada a porcentagem total do número de fêmeas desovadas independente da aplicação hormonal ou não, foi observada uma maior porcentagem de fêmeas que desovaram no horário em que a primeira aplicação foi realizada no horário de 18 horas (85%). Enquanto que, os animais que receberam a primeira aplicação às 12 horas apresentaram a menor porcentagem de fêmeas desovadas (55%) (Tab. 1).

TABELA 1 Tilápias das variedades GIFT e UFLA que desovaram com e sem indução hormonal

Horário de aplicação	UFLA sh (n = 4)	UFLA ch (n = 6)	GIFT sh (n = 4)	GIFT ch (n = 6)	Total (n = 20)	Total (%)
6	1	6	3	5	15	75
12	1	6	1	3	11	55
18	3	4	4	6	17	85
24	4	5	3	3	15	75
Total (n)	9	21	11	17		
Total (%)	56,3	87,5	68,8	70,8		

(sh: sem hormônio, ch: com hormônio) em diferentes horários de indução.

Avaliando os resultados acima se pode observar que existe uma tendência das tilápias da variedade UFLA desovar em maior quantidade no período em que a primeira aplicação ocorreu no início e na metade do dia. A indução hormonal em tilápias vem sendo utilizada para garantir o horário exato da fertilização, facilitando a manipulação e fertilização de gametas em programas de seleção genética e diferentes indutores já tem sido utilizados como: LH-RH, antagonista da dopamina e HCG (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010; SENTHILKUMARAN *et al.*, 2002).

Foi possível observar na variedade GIFT no grupo controle um alto número de ovócitos por grama de desova (Fig. 1). Este resultado é um fator negativo na reprodução, visto que, um alto número de ovócitos está relacionado com ovócitos de menor diâmetro, que provavelmente não são considerados maduros.

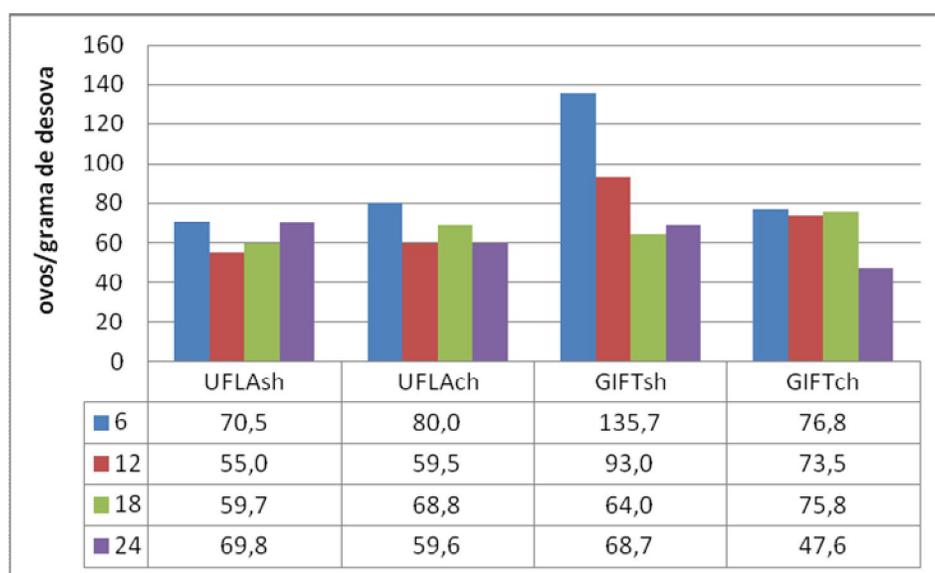


FIGURA 1 - Relação do número de ovócitos por grama de desova nas variedades UFLA e GIFT sem (sh) e com (ch) aplicação do hormônio HCG.

O índice de desova (ID) representa o número de ovócitos liberados em relação ao peso do animal. Quando avaliamos os resultados é possível observar que para a variedade UFLA, independente da utilização ou não do HCG, o horário de aplicação não influenciou ($P>0,05$) esta variável. Já

para a variedade GIFT o horário de aplicação do hormônio influenciou ($P < 0,05$) este parâmetro (Tab. 2).

Os animais da variedade GIFT que receberam a indução às 24 horas apresentou maior ($P < 0,05$) ID em relação aos animais que foram induzidos às 18 horas, não diferindo dos demais horários. No entanto, no grupo controle os animais induzidos às 18 horas foram os que apresentaram maior ID ($P < 0,05$) em relação aos induzidos às 6 e 24 horas (Tab. 3). Este resultado pode ser devido ao preparo prévio dos animais para reprodução, onde, embora tenha sido realizada uma seleção mediante visualização de características externas dos animais, esta seleção pode ser subjetiva levando a selecionar animais que não se encontram totalmente preparados reprodutivamente (Tab. 2 e 3).

Já as fecundidades absoluta, absoluta relativa ao peso e ao comprimento e posição periférica de vesícula germinativa não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) em relação aos diferentes horários de aplicação nas variedades UFLA e GIFT (Tab. 2 e 3).

Na variedade UFLA, o diâmetro dos ovócitos do grupo controle apresentou-se maior ($P < 0,05$) quando recebeu a aplicação às 18 horas, em relação ao grupo aplicado às 24 horas (Tab. 2).

TABELA 2 Médias e desvios padrão dos parâmetros reprodutivos nas tilápias variedade UFLA nos diferentes horários de indução

Hor. Aplic.	VARIÁVEIS											
	ID		FA		FARP		FARC		DIAM		PPVG	
	ch	sh	ch	sh	ch	Sh	ch	sh	ch	sh	ch	sh
6	1,2±	-	526,9±	-	1,0±	-	22,7±	-	3854,6±	-	0,4±	-
	1,1	-	477,3	-	0,9	-	20,5	-	686,4	-	0,3	-
12	1,6±	-	680,1±	-	1,0±	-	26,5±	-	4199,3±	-	0,6±	-
	0,3	-	233,3	-	0,3	-	9,1	-	409,0	-	0,2	-
18	2,1±	0,8±	814,8±	487,7±	1,4±	0,5±	34,6±	17,3±	3934,0±	4381,3±	0,8±	0,9±
	0,2	1,1	299,9	652,2	0,4	0,7	12,1	23,3	566,8	97,5a	0,2	0,1
24	1,8±	1,1±	736,7±	727,6±	1,1±	0,7±	28,3±	24,1±	4084,8±	3734,0±	0,4±	0,7±
	0,4	0,1	297,5	153,7	0,3	0,1	11,0	5,2	302,8	205,7b	0,4	0,5

Letras minúsculas diferem na coluna, indicando diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste de SNK. Horário de aplicação (Hor. Aplic.) Índice de desova (ID), fecundidade absoluta (FA), fecundidade absoluta relativa ao peso (FARP) e fecundidade absoluta relativa ao comprimento (FARC), diâmetro do ovócito (DIAM) e posição periférica da vesícula germinativa (PPVG), nas variedades UFLA e GIFT induzidas (ch) ou não(sh) com HCG.

TABELA 3 Médias e desvios padrão dos parâmetros reprodutivos nas tilápias variedade GIFT nos diferentes horários de indução

Hor Aplic	VARIÁVEIS											
	ID		FA		FARP		FARC		DIAM		PPVG	
	ch	sh	ch	sh	ch	sh	ch	sh	ch	sh	ch	sh
6	1,8±	0,8±	401,8±	676,2±	1,2±	1,2±	20,1±	29,7±	3737,0±	3326,6±	0,7±	0,5±
	1,0ab	0,1b	207,5	386,4	0,7	0,7	10,7	16,3	212,9	514,0	0,3	0,3
12	1,6±	-	389,4±	-	1,0±	-	18,1±	-	3932,0±	-	0,5±	-
	1,1ab	-	258,8	-	0,6	-	11,5	-	124,7	-	0,4	-
18	0,6±	1,6±	220,3±	576,6±	0,5±	1,1±	10,3±	25,7±	3757,3±	3830,6±	0,4±	0,3±
	0,2b	0,5a	139,7	346,6	0,3	0,7	6,3	16,1	591,5	326,1	0,3	0,2
24	2,2±	0,7±	477,2±	291,8±	1,3±	0,5±	23,7±	12,7±	3870,6±	3270,6±	0,1±	0,1±
	0,1a	0,5b	161,2	279,6	0,1	0,4	6,8	12,1	344,7	341,7	0,1	0,1

Letras minúsculas diferem na coluna, indicando diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste de SNK. Horário de aplicação (Hor. Aplic.) Índice de desova (ID), fecundidade absoluta (FA), fecundidade absoluta relativa ao peso (FARP) e fecundidade absoluta relativa ao comprimento (FARC), diâmetro do ovócito (DIAM) e posição periférica da vesícula germinativa (PPVG), nas variedades UFLA e GIFT induzidas (ch) ou não(sh) com HCG.

O índice de desova foi influenciado pela indução com HCG sendo de 1,54% para as fêmeas induzidas e 1,03% para as fêmeas não induzidas. Já a fecundidade absoluta não foi influenciada pela variedade de tilápia utilizada e nem pela indução hormonal (Tab. 4).

Avaliando a média do índice de desova das fêmeas, o grupo induzido com HCG apresentou maior ($P < 0,05$) resultado que o grupo controle, independente da variedade utilizada (Tab. 4). Nascimento (2010) encontrou um índice de desova variando de 0,64% até 1,04%, sem utilização da indução hormonal. Sendo estes resultados muito semelhantes ao encontrado para o grupo sem indução hormonal. Avaliando o OVOG pode-se observar uma média de 67,2 para a variedade UFLA e 77,4 para a variedade GIFT, sendo que a indução hormonal não afetou estas variáveis.

A fecundidade absoluta também foi influenciada pelo hormônio, principalmente para a variedade GIFT. Nesta a FA foi menor ($P < 0,05$) para os peixes induzidos (345,60) em relação ao grupo controle (514,91). Porém este resultado somente foi encontrado para esta variedade (Tab. 4).

Quando avaliado a FARP (Tab. 4) foi observado que as fêmeas induzidas apresentaram maior ($P < 0,05$) resultado, 1 quando comparados com as fêmeas não induzidas, 0,79, independente da variedade utilizada.

A FARC ($P > 0,05$) não foi influenciada nem pela variedade e nem pela indução hormonal (Tab. 4). É importante salientar que a fecundidade pode variar de acordo com a variedade de tilápia utilizada (NEUMANN, 2004).

Avaliando o PD (Tab. 4) pode-se observar que esta foi influenciada tanto pela indução hormonal quanto pela variedade de tilápia utilizada. As fêmeas GIFT apresentaram menores ($P < 0,05$) valores de PD quando comparadas com as fêmeas UFLA. O aumento desta variável nos peixes induzidos está relacionado com a capacidade do HCG em estimular a maturação folicular ovariana. De acordo com Zohar e

Mylonas (2001) os hormônios indutores têm a capacidade de estimular a liberação de hormônio luteinizante, que no final da vitelogênese induz migração e desintegração da vesícula germinativa, rompimento do envelope folicular e liberação dos ovócitos na luz dos ovários (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007), influenciando assim no aumento do peso da desova.

TABELA 4 Médias e desvios padrão de parâmetros reprodutivos de diferentes variedades de tilápia nilótica

Variáveis	Variedade	Induzidas (n=3 a 6)	Controle (n=2 a 4)	Média	CV
PD (g)	UFLA	10,3±4,3	9,22±5,7	9,75 A	47,5
	GIFT	5,35±3,12	6,06±2,9	5,70 B	
	Média	7,82 a	7,64 b		
ID (%)	UFLA	1,67 ± 0,6	1,00 ± 0,6	1,33	47,0 8
	GIFT	1,41 ± 0,9	1,07 ± 0,5	1,24	
	Média	1,54 a	1,03 b		
OVOG (n de ovócito em 1g)	UFLA	67,14 ± 36,45	65,43 ± 13,0	66,2	47,0 8
	GIFT	67,37 ± 21,97	89,44 ± 52,1	78,4	
	Média	67,25	77,43		
FA (n ovócitos liberados)	UFLA	675,51±336,5 A	624,80 ± 412,3	650,15	58,8
	GIFT	345,60±196,2Bb	514,91±341,7 a	430,25	
	Média	510,55	569,85		
FARP (n de ovócito por g de peixe)	UFLA	1,11 ± 0,58	0,67± 0,47	0,89	58,4
	GIFT	0,90 ± 0,55	0,91 ± 0,62	0,9	
	Média	1,00 a	0,79 b		
FARC (n ovócito/ comprimento de peixe)	UFLA	27,42 ± 13,8	21,25 ± 14,4	24,33	58,2
	GIFT	16,70 ± 9,49	22,70 ± 15,2	19,70	
	Média	22,06	21,97		
DIAM (µm)	UFLA	4023,05±496,5	4011,43±379,5	4017,23A	11,4
	GIFT	3806,25 ±387,1	3476,00±439,5	3641,12B	
	Média	3914,64	3743,41		
PPVG (%)	UFLA	55 ± 34b	83 ± 37aA	69	63,1
	GIFT	45 ± 37a	30 ± 29bB	37	
	Média	50	56		

Nota: Letras maiúsculas diferem na coluna e letras minúsculas diferem na linha, indicando diferença estatística a 5% de probabilidade pelo teste de SNK. Peso de desova (PD) Índice de desova (ID), número de ovócitos por grama (OVOG), fecundidade absoluta (FA), fecundidade absoluta relativa ao peso (FARP) e fecundidade absoluta relativa ao comprimento (FARC), diâmetro do ovócito (DIAM) e Posição Periférica da Vesícula Germinativa (PPVG), nas variedades UFLA e GIFT induzidas ou não com HCG.

O diâmetro dos ovócitos foi maior ($P<0,05$) para a variedade UFLA (4017,23 µm) quando comparado com os ovócitos das tilápias

variedade GIFT (3641,12 μm). O aumento do diâmetro pode influenciar na sobrevivência das larvas, indicando maior quantidade de reservas energéticas (KJORSVIK; MANGOR-JENSEN; HOLMEFJORD, 1990; BROOKS; TYLER; SUMPTER, 1997; BONISLAWSKA *et al.*, 2001). Já a aplicação do HCG não influenciou ($P>0,05$) o diâmetro, sendo que as fêmeas induzidas apresentaram DIAM de 3914,64, enquanto sem HCG este valor foi de 3743,41 μm .

O diâmetro dos ovócitos pode ser utilizado como parâmetro de qualidade de desova (BONISLAWSKA; FORMICKI; WINNICKI, 2000), sendo que para tilápias este valor varia entre 2,00 e 7,90 mm (DE GRAAF; GALEMONI; HUISMAN, 1999). Neumann (2004) relata ovócitos com diâmetro entre 2,41 e 2,70 mm e Bern e Avtalion (1990) relata ovos de peixes adultos de tilápia do Nilo com tamanho de 2,00 e 3,00 mm. Valores inferiores ao encontrado neste experimento, quando aplicado o HCG.

O HCG proporciona aumento dos níveis de gonadotrofinas, que estimulam o crescimento folicular e conseqüentemente os níveis de estradiol, que estão relacionados com a incorporação e vitelogenina nos ovócitos (DAVIS *et al.*, 2007). Estes ovos são maiores, proporcionando larvas maiores e com saco vitelino maior (WOOTTON, 1994; GISBERT; WILLIOT; CASTELLÓ-ORVAY, 2000) e maior sobrevivência larval. Assim é possível concluir que a variedade UFLA proporcionou melhor diâmetro ovocitário, que está relacionado com a sobrevivência de larvas, o que seria uma qualidade requisitada na produção comercial.

A variedade UFLA do grupo controle apresentou maior ($P<0,05$) porcentagem de PPVG em relação ao grupo que recebeu a indução

hormonal, provavelmente este resultado foi devido ao número de fêmeas que apresentaram liberação da desova, visto que do grupo induzido 21 fêmeas desovaram e do grupo controle apenas 7, levando a uma menor variabilidade dessa avaliação. Por outro lado, na variedade GIFT o grupo induzido apresentou maior ($P < 0,05$) porcentagem de PPVG em relação ao grupo controle.

No grupo controle a variedade UFLA apresentou maior ($P < 0,05$) porcentagem de PPVG em relação à variedade GIFT. A posição periférica da vesícula germinativa é um indicador do grau de desenvolvimento gonadal, tendo em vista que os ovócitos com PPVG são considerados maduros (NARAHARA *et al.*, 2002) este é um dos principais parâmetros que indica a qualidade do ovócito. Desta forma, podemos inferir que a variedade UFLA é mais indicada para a reprodução.

CONCLUSÃO

Portanto, a indução hormonal com HCG foi influenciada pela variedade e pelo horário de aplicação. A variedade UFLA respondeu melhor a indução hormonal quando realizada nos horários de 6 e 12 horas.

REFERÊNCIAS

- BERN, O.; AVTALION, R. R. Some morphological aspects of fertilization in tilapias. **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, p. 375-381, 1990.
- BONISLAWSKA, M. *et al.* Fish egg size variability: biological significance. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2001.
- BONISLAWSKA, M.; FORMICKI, K.; WINNICKI, A. Size of eggs and duration of embryogenesis in fishes. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 30, n. 1, p. 61-71, 2000.
- BROMAGE, N. R.; CUMARANATUNGA, R. Egg production in the rainbow trout. In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. (Ed.). **Recent advances in aquaculture**. London: Croom Helm, 1992. p. 63-138.
- BROOKS, S.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, p. 387-416, 1997.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Spawning frequency, fecundity, eggs size and ovarian histology in groups of *Tilapia zillii* maintained upon two distinct food ration sizes from first-feeding to sexual maturity. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 12, p. 11-22, 1999a.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Spawning periodicity, fecundity and egg size in laboratory-held stocks of a substrate-spawning tilapiine, *Tilapia zillii* (Gervais). **Aquaculture**, Stirling, v. 171, p. 251-267, 1999b.
- DAVIS, L. K. *et al.* Induction of three vitellogenins by 17beta-estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 77, n. 4, p. 614-625, Oct. 2007.

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

GISBERT, E.; WILLIOT, P.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Influence of egg size on growth and survival at early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. **Aquaculture**, Stirling, v. 183, p. 83-94, 2000.

GJEDREM, T. Genetic improvement of cold-water species. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 25-33, Jan. 2000.

GODINHO, H. P. Reproductive strategies of fishes applied to aquaculture: bases for development of production technologies. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

KJORSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg quality in fishes. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 26, p. 71-113, 1990.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. p. 74-80.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, p. 516-534, 2010.

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

NEUMANN, E. **Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia, *Oreochromis niloticus* e uma linhagem híbrida de *Oreochromis sp.*** 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SENTHILKUMARAN, B. *et al.* Ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase shows distinct surge in messenger RNA expression during natural and gonadotropin-induced meiotic maturation in Nile tilapia. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 1080-1086, 2002.

TURRA E. M. *et al.* Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 29-36, jan./mar. 2010.

VALENTIN, F. N. **Efeito da idade das matrizes de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* no desenvolvimento embrionário e larval.** 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VAZZOLER, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 1996. 169 p.

VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. Hormônios na reprodução artificial de peixes. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 55, p. 39-48, mar./abr. 1999.

WOOTTON, R. J. Life histories as sampling devices: optimum egg size in pelagic fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 1067-1077, 1994.

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

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, Stirling, v. 197, p. 99-136, 2001.

VERSÃO PRELIMINAR

**ARTIGO 2 Influência do horário de aplicação e da variedade genética
em machos de tilápias *Oreochromis niloticus* submetidas à
indução hormonal com HCG**

ULISSES NASCIMENTO DE SOUZA*

Artigo normalizado conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003).

Autor para correspondência: tel: (35) 88323405 / E-mail: ulns@yahoo.com.br.
Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG
37200-000 Brasil.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do horário de aplicação da gonadotropina coriônica humana (HCG) em machos de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* nas variedades genéticas UFLA e GIFT. O experimento foi conduzido nos meses de julho e agosto de 2012 em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4 (duas variedades e quatro horários de aplicação do HCG) com cinco repetições. A unidade experimental foi o indivíduo. Foram utilizados 20 machos das variedades GIFT e 20 machos UFLA, microchipados e alojados em um sistema recirculação de água. Os horários de aplicação foram 6; 12; 18 e, 24 horas. A dosagem de HCG foi realizada em dose única. Após 24 horas da aplicação, foi realizada a coleta do sêmen mediante massagem celomática. Foram observados os números de animais de cada tratamento que espermiaram e avaliados: volume, concentração, taxa (%) e duração (s) da motilidade e anormalidades espermáticas. Os dados obtidos submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK a 5% de significância. O horário de aplicação e a variedade utilizada não influenciaram ($P>0,05$) as variáveis analisadas, porém a variedade UFLA apresentou um maior número de animais que espermiaram. O horário de indução hormonal de HCG afetou a resposta à indução em machos de tilápias da variedade UFLA e GIFT e responderam de formas diferentes.

Palavras - chave: Espermição. Sêmen. Variedades genéticas.

1 INTRODUÇÃO

Reprodutores de diversas espécies criados em cativeiro apresentam espermiacção espontânea, mas o volume e a qualidade do sêmen podem ser aumentados com a utilização de hormônios apropriados (Donaldson et al., 1983). A indução hormonal é muito importante no aspecto fisiológico do animal desencadeando uma série de processos vitais aos peixes durante a reprodução (Hansen et. al., 2001).

Segundo Amano et al. (2004), o fotoperíodo é responsável pelo desenvolvimento gonadal, exercendo uma ação direta no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas dos peixes teleósteos ao estimular ou inibir a produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), de hormônios hipofisários (FSH e LH) e outros hormônios que modulam a reprodução e a maturação dos gametas. As gonadotrofinas regulam a maturação dos gametas, estimulando as gônadas a sintetizar hormônios esteróides. Ao longo do processo de desenvolvimento gonadal, diferentes esteróides sexuais apresentam importância em cada fase, sendo que as gonadotrofinas influenciam em suas produções (Harvey; Carolsfeld, 1993).

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Por isto, devem-se utilizar gametas de qualidade promovendo máxima fertilização e subseqüente desenvolvimento normal do embrião (Bobe & Labbe, 2010; Romagosa et al., 2010).

Para se determinar a viabilidade espermática alguns parâmetros são utilizados, como: motilidade, sobrevivência, anormalidades morfológicas e composição bioquímica do plasma seminal e podem se correlacionarem com as taxas de fertilização, metodologia utilizada por Sorensen (1979), adaptada para peixes.

Portanto este trabalho objetiva avaliar o efeito do horário de aplicação da gonadotropina coriônica humana (HCG) em diferentes variedades genéticas de machos de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, época de realização e animais

O experimento foi realizado na piscicultura, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras -MG, Brasil, durante os meses de julho e agosto de 2012. Todos os animais foram oriundos dessa Estação de Piscicultura, sendo 40 machos de tilápias nilóticas *O. niloticus*, dos quais, 20 reprodutores foram da variedade GIFT, com idade média de 02 anos, peso médio de $1,03 \pm 0,14$ kg e comprimento total médio de $29,10 \pm 1,62$ cm; e os 20 restantes da variedade UFLA, com idade média de 04 anos, pesando $1,12 \pm 0,23$ kg e comprimento total médio de $30,38 \pm 2,65$ cm.

Os animais encontravam em tanques escavados, agrupados por sexo, em ambiente natural, temperatura média de $17,9^{\circ}\text{C}$, e também em repouso reprodutivo, sendo alimentados duas vezes ao dia, com ração extrusada, contendo 32% de proteína bruta.

Os machos aptos a receberem a indução hormonal foram selecionados de acordo com as características reprodutivas citadas por Woynarovich (1989), onde ocorre à liberação de sêmen sob leve massagem celomática.

Após a identificação de cada animal através da leitura do microchip, localizado próximo à nadadeira dorsal esquerda do peixe, eles foram pesados, medidos o seu comprimento total e estes dados foram registrados em fichas e os animais acondicionado no Laboratório.

Os machos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 08 caixas de polietileno com capacidade individual de 500 litros d'água mantidos na proporção de 05 animais/caixa, separados de acordo com as variedades. Sendo que cada caixa representou um horário de aplicação hormonal. As caixas de polietileno possuíam uma capacidade individual de 500 litros d'água, com fluxo de água e aeração contínua e temperatura da água mantida em $27,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$, níveis de oxigênio dissolvido $6,6 \pm 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e pH $6,7 \pm 0,1$.

Durante este período os animais foram submetidos a um fotoperíodo de 12:12 horas de luz:escuro (L:E). Os animais receberam ração comercial extrusada contendo 36% de proteína bruta e peletes de dois milímetros de diâmetro, fornecida uma vez ao dia "*ad libitum*". Entretanto, antes do início da indução permaneceram em jejum por um período de 24 horas.

2.2 Aplicação hormonal

Os reprodutores após o jejum foram induzidos artificialmente por via intramuscular com Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG), marca comercial CHORULON 5000 UI, Laboratório Intervet *Shering-Plough Animal Health*, aplicado na base da nadadeira dorsal uma dose total de 05 UI por grama de peso de peixe, em dose única (Valentin, 2007).

Durante os horários determinados foram induzidos 05 machos de cada variedade com o HCG. Os momentos de indução do HCG foram distribuídos em 04 sistemas de aplicação, sendo: Sistema 1: 6 h; Sistema 2: 12 h; Sistema 3: 18 h e Sistema 4: 24 horas.

2.3 Coleta do sêmen

Após 24 horas da indução, foi realizada a coleta do sêmen, para isso o animal foi retirado da caixa d'água e envolvido por uma toalha úmida. Logo a seguir, a região genital e a nadadeira anal, foram enxutas com papel toalha para a execução do processo de retirada do sêmen, realizado comprimindo-se a região abdominal do animal no sentido ântero-posterior, sendo o sêmen recolhido em seringas de 1 mL (Billard et al., 1995).

Em seguida as seguintes características seminais foram avaliadas: volume total (ml), concentração (n° de espermatozoides/ml), taxa (%) e duração (s) da motilidade e morfologia espermática.

A taxa e duração da motilidade espermática foram verificadas em uma alíquota de 10 µL de sêmen em lâmina histológica, previamente ativado com água na proporção de 1:4 (sêmen: água) visualizados em microscópio no aumento de 400 x. A duração da motilidade foi registrada desde a ativação até que somente 10 % dos espermatozoides (sptz) se encontrassem ativos (Felizardo et al., 2010; Murgas et al., 2007).

Para a análise morfológica dos espermatozoides, utilizou-se uma alíquota do sêmen, diluído em formol citrato para verificação da concentração. O sêmen foi depositado sobre uma lâmina e corado com o corante Rosa Bengala. As lâminas observadas em microscópio (1000 x). Analisados 100 espermatozoides de cada amostra e registrados a porcentagem de espermatozoides normal e anormal, considerando as anormalidades de cabeça (isolada, hipercefalia e hipocefalia), da peça

intermediária e da cauda (curta/quebrada, enrolada e isolada), segundo (Streit Jr. et al., 2004).

Para avaliação da concentração espermática, o sêmen *in natura* foi diluído em solução de formaldeído na proporção de 1:1000 (sêmen:solução). A avaliação foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico. E a concentração espermática estimada pela fórmula: (CBRA,1998).

$CE = N \times FC$; em que:

CE é a concentração espermática (espermatozóides por mm^3);

N é o número de células contadas na câmara de Neubauer.

O fator de correção (FC) é dado por:

$$FC = (q \times fd) / d; \text{ em que:}$$

$q = 5$, e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de Neubauer (25) e o número de quadrículos contados (5);

fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen ($= 10^4$);

d é a profundidade entre a lamínula e a câmara de Neubauer ($= 0,1 \text{ mm}$).

2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos das variáveis reprodutivas dos machos foram previamente testados quanto às pré-suposições e submetidos à análise de variância considerando um modelo estatístico hierárquico, em que os horários de aplicação de hormônios foram aninhados às variedades

estudadas. As análises foram realizadas utilizando o software “R” para Windows na versão 2.13.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução hormonal aplicada às 18 horas, independente da variedade, proporcionou o menor número de animais que espermiaram (Tabela 1). A variedade GIFT apresentou 100% de espermiacão no grupo que recebeu aplicação na metade da noite, com uma tendência a diminuir esta porcentagem nos horários seguintes.

A variedade UFLA foi o que apresentou maior porcentagem de machos espermiados (Tabela 1). Estes resultados indicam um ponto positivo da variedade UFLA em relação à GIFT, no que diz respeito à reprodução para programas de melhoramento genético.

TABELA 1 - Tilápias induzidas que espermiaram em diferentes horários de indução com HCG

Horário de aplicação	UFLA (n = 5)	GIFT (n = 5)	Total (n = 10)	Total (%)
6	5	4	9	90%
12	5	3	8	80%
18	3	1	4	40%
24	4	5	9	90%
Total (n)	17	13		
Total (%)	85%	65%		

Avaliando os resultados acima podemos observar que existe uma tendência das tilápias da variedade UFLA espermiarem em maior quantidade no período em que a primeira aplicação ocorreu no início e na metade do dia (Tabela 1). A indução hormonal em tilápias vem sendo utilizada para garantir o horário exato da fertilização, facilitando a

manipulação e fertilização de gametas em programas de seleção genética e diferentes indutores já tem sido utilizados como: LH-RH, antagonista da dopamina e HCG (Mylonas et al., 2010, Senthilkumaran et al., 2002).

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os horários de aplicação ou para as variedades estudadas (Tabela 2). A concentração espermática apresentou uma média de $5,73 \times 10^8$ spz/ml para a variedade UFLA e $4,71 \times 10^8$ spz/ml para a variedade GIFT (tabela 2). O volume apresentou uma média de 0,69 ml para a variedade UFLA e para a GIFT este valor foi de 0,9 ml. A concentração espermática em tilápias encontrada por Genotte et al (2010) foi de $1,69 \times 10^9$ spz/ml. Matavelli et al. (2010) descreveu valores de $5,8 \times 10^8$ spz/ml e o volume de 0,3 ml. As divergências desses resultados podem ser devido ao volume, que para a GIFT foi de 0,93 ml enquanto para a UFLA foi de 0,6 ml (tabela 2). A indução hormonal no macho aumenta tanto o volume quanto a qualidade do sêmen (Kavamoto et al., 1996; Murgas et al., 2011), proporcionando assim a diferença de volume encontrada entre estes resultados e os citados.

Por outro lado, a variação encontrada no sêmen pode estar relacionada com a fase reprodutiva em que o macho se encontrava durante o horário de aplicação hormonal. A concentração espermática é maior durante os meses mais quentes, indo à época reprodutiva das tilápias entre setembro a abril. Como o experimento foi realizado em junho até agosto, pode ser que a gônada destes animais ainda não estivessem maturadas.

TABELA 2 - Médias e desvios padrão de variáveis relacionadas à qualidade espermática nas diferentes variedades de tilápias e diferentes horários de indução

Variáveis	Variedade	HORÁRIO				MÉDIA
		6h	12h	18h	24h	
Concentração (x 10 ⁸) sptz/ml	UFLA	7,09 ± 4,87	6,58 ± 4,73	5,11 ± 5,78	3,45 ± 3,40	5,73 ± 4,48
	GIFT	6,17 ± 1,29	7,46 ± 1,15	-	2,59 ± 2,01	4,71 ± 5,44
Volume (ml)	UFLA	0,60 ± 0,51	0,68 ± 0,32	0,60 ± 0,52	0,88 ± 0,33	0,69 ± 0,40
	GIFT	0,93 ± 0,19	0,87 ± 0,92	-	1,02 ± 0,58	0,90 ± 0,55
Motilidade (%)	UFLA	99 ± 2,23	94 ± 8,9	98,33 ± 2,9	95 ± 5,7	96,50 ± 5,80
	GIFT	98,7 ± 2,5	93,3 ± 5,8	-	79 ± 33,2	88,46 ± 21,45
Duração (s)	UFLA	5,6 ± 2,05	2,89 ± 1,51	4,67 ± 2,31	4,28 ± 1,69	4,33 ± 2,00
	GIFT	6,48 ± 3,86	4,61 ± 4,02	-	4,25 ± 2,23	4,80 ± 3,18
Células normais (%)	UFLA	88 ± 2,82	86,4 ± 2,20	85,33 ± 4,61	85 ± 13,21	86,35 ± 6,33
	GIFT	89 ± 3,82	88 ± 4,00	-	83,20 ± 3,34	86,46 ± 4,18

Com o aumento do volume ocorre a diluição do sêmen, determinando assim uma menor concentração espermática o que estaria de acordo com os resultados encontrados. Porém Sönmez et al. (2005) citam que o aumento das concentrações séricas de FSH e LH atuam aumentando a concentração espermática, o que não foi demonstrado.

Nas variedades UFLA e GIFT, a taxa e duração da motilidade foram de 96,5 ± 5,8%; 4,33 ± 2,0 s e 88,4 ± 21,4%; 4,8 ± 3,1s, respectivamente. A taxa de motilidade é semelhante à relatada por outros autores, porém a duração da motilidade é superior a relatada para a espécie por Bombardelli et al. (2010), onde verificaram taxa de 96% por 46 segundos e por Genotte et al. (2012) que foi de 18 segundos. Este parâmetro é utilizado para avaliar qualidade espermática, tendo relação

direta com a fertilização (Bombardelli et al., 2006), sendo um indicador de qualidade de sêmen (Coward et al., 2002).

A quantidade de células espermáticas normais apresentou uma média de 86,35% para a variedade UFLA e 86,46% para a variedade GIFT (tabela 2). Esta percentagem pode ser considerada alta quando comparada com outros autores como Mataveli et al. (2010) que relataram uma média de 16% (Mataveli et al., 2010) e Bombardelli et al, 2010 que relataram média de 50% de células normais.

Miliorini et al. (2011) relata que provavelmente a percentagem crítica de anormalidades totais de sêmen de curimba, uma espécie reofílica é acima de 50 %, considerando que a técnica de indução hormonal envolve uma alta taxa de espermatozoide: ovócito em ambiente controlado. Porém, em tilápias acredita-se que esta percentagem deva ser menor, por se tratar de uma espécie sedentária.

Na figura 1 podemos observar a percentagem de espermatozoides anormais presentes, que para a variedade UFLA foi encontrada uma média de 15% enquanto para a variedade GIFT foi de aproximadamente 14%.

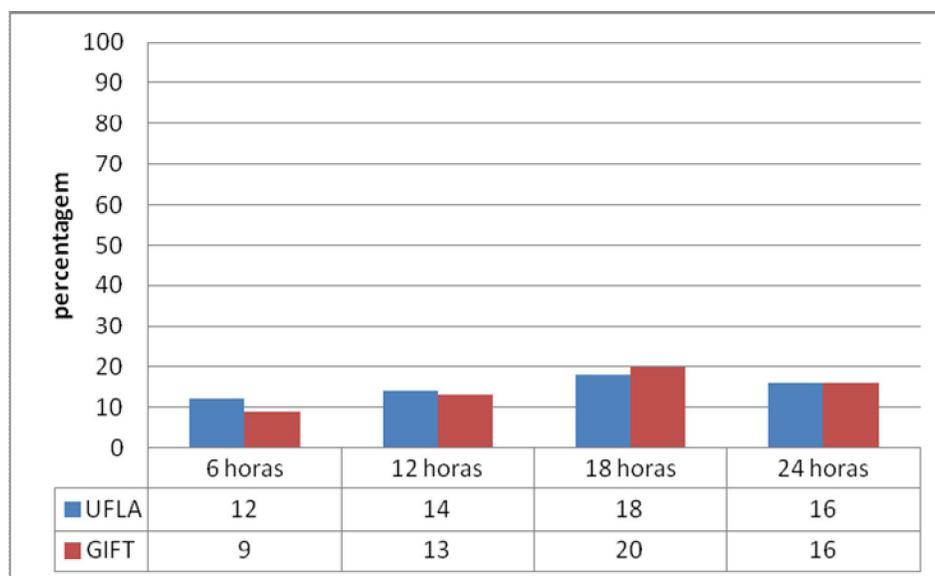


FIGURA 1 - Porcentagem de espermatozoides anormais por variedades e tempo de indução em machos de tilápias das variedades UFLA e GIFT

Como os resultados encontrados para as anormalidades foram baixos, é possível inferir que isto não tenha afetado a taxa de motilidade. Isto porque em curimba (*Prochilodus lineatus*) anomalias de sêmen acima de 30% já se associam à diminuição da taxa de motilidade (FELIZARDO et al., 2010). O maior número de patologias encontradas foram as de cabeça e cauda, independente da variedade estudada ou do horário de indução hormonal.

Identificando os tipos de anormalidades encontradas na figura 2 podemos observar que as mais encontradas foram as de cabeça, independente do horário de aplicação ou da variedade de tilápia utilizada, embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos. As

anormalidades espermáticas têm sido citadas como possíveis causas de infertilidade ou esterilidade (Collodel & Moretti, 2006).

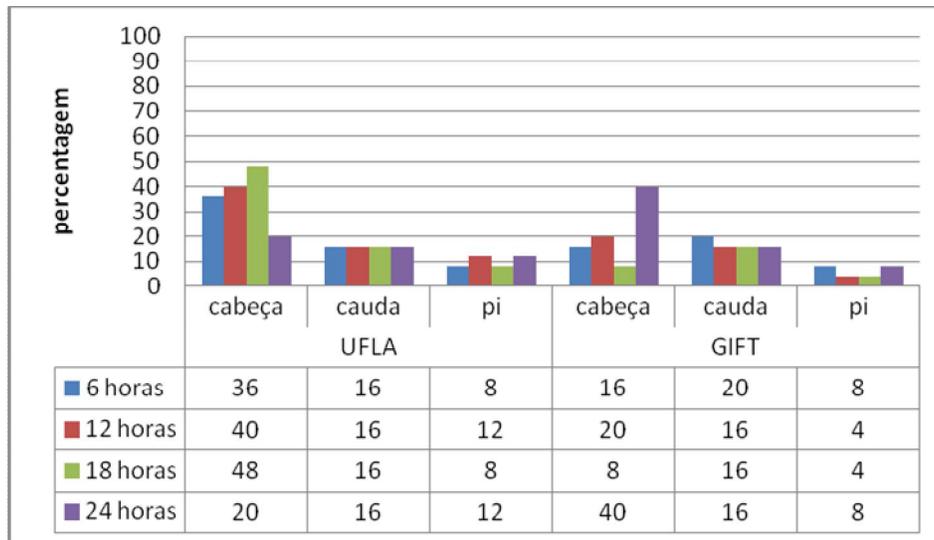


FIGURA 2 - Porcentagem de anormalidades espermáticas por variedade e tempo de indução em machos de tilápias

4 CONCLUSÃO

O horário de indução hormonal com HCG afetou a resposta da indução em machos de tilápias das variedades UFLA e GIFT e responderam de formas diferentes.

**Influence of the application time and genetic variety in male tilapia
Oreochromis niloticus submitted to hormonal induction with HCG**

ABSTRACT

The objective of this paper was to evaluate the effect of the application time of human chorionic gonadotropin (HCG) in male Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) of the UFLA and GIFT genetic varieties. The experiment was conducted in the months of June and August of 2012 in a completely randomized design, in a 2x4 factorial scheme (two varieties and four HCG application times) with five replicates. The individual was considered the experimental unit. Twenty males of each variety, with microchips, were housed in a water recirculation system. The application times were of 6, 12, 18 and 24 hours. The HCG dosage was performed in a single dose. Twenty four hours after the application, the collection of the semen was performed through coelomic massage was performed. The number of animals of each treatment which spermiated were observed and the following were evaluated: volume, concentration, motility rate (%) and duration (s) and spermatic anomalies. The obtained data were submitted to variance analyses and the means were compared by the SNK test at 5% of significance. The application time and the variety used did not influence ($P>0.05$) the analyzed variables. However, The UFLA variety presented a larger number of animals which spermiated. The HCG induction time affected the response to the induction in male tilapias of both varieties, which responded differently.

Keywords: Spermiation. Semen. Genetic varieties.

REFERÊNCIAS

AMANO, M.; IIGO, M.; IKUTA, K.; KITAMURA, S.; OKUZAWA, K.; YAMADA, H.; YAMAMORI, K. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. **Zoological Science**, v.21, p. 79-85, 2004.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. 1995 Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. (Ed.). Broodstock management and egg larval quality. **Oxford: Blackwell Science**, p. 25-52.

BOB, J & LABBE, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**. 165:535-548, 2010.

BOMBARDELLI R.A., HAYASHI C., NATALI M.R.M., SANCHES E.S., PIANA. P.A., Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia do Nilo. **Bras. Zootec.**, v.39, n.5, p.941-949, 2010.

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

CHANG, J. P., JOHNSON J. D., SAWISKY. G. R., GREY C. L., MITCHELL G., BOOTH, M., MARK V. M., PARKS S. K., THOMPSON E., GOSS, G.G., KLAUSEN C., HABIBI H.R. Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts—studies on the goldfish model. **General and Comparative Endocrinology** , p.161 42–52, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p 1998.

COLLODEL, G.; MORETTI, E. Sperm morphology and aneuploidies: defects of supposed genetic origin. **Journal Compilation**, v.38, p.208-215, 2006.

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

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. M. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, p. 351-403, 1983.

FELIZARDO, V. O. **Efeitos da exposição ao eugenol e da indução hormonal reprodutiva no ritmo biológico de peixes**. 2010. 57 p.: il. Tese (Doutor em Produção Animal) Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras.

GENNOTTE A. V., FRANCOIS B. E., ROUGEOTA C., PONTHERIC J., DELEUZEC S., MÉLARD C. **Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010 in press.

HANSEN T.; KARLSEN Ø.; TARANGER G.L.; HEMRE G-L; HOLM J.C. AND KJESBU O.S. Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. *Aquaculture*, 203: 51-67, 2001.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: **International Development Research Center**, 144 p, 1993.

KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; ANDRADE TALMELLI, E.F.; ROMAGOSA, E.; FERRAZ, STEINDACHNER E.M. Efeito do HCG na produção de sêmen do curimatá (*Prochilodus scrofa*) 1881. **Revista Ceres**, 43 (245) 76:85, 1996.

MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; GASPARINO, E. Qualidade do sêmen em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentada com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, 32(3): 345-349, 2010.

MURGAS, L.D.S., FELIZARDO, V.O., FERREIRA, M.R., ANDRADE, E.S., VERAS G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, n.2, p.186-191, 2011.

MURGAS, L. D. S.; MILLIORINI, A. B.; FREITAS, T. F.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

ROMAGOSA, E. Biologia da reprodução e fisiologia de peixes em confinamento: O cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. P, 108-116. Cyrino, E.P & Urbinati, editores. **Tópicos especiais m biologia aquática**. Aquicultura. AUABIO. Jaboticabal, 2006.

ROMAGOSA, E., SOUZA B.E., SANCHES, E.A., BAGGIO D.M., BOMABARDELLI, R.A. Sperm mobility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. **Journal of Applied Ichthyology**. 26: 678-691, 2010.

SCHULZ R.W., FRANÇA L.R.C., LAREYRE J.J., LEGAC F., CHIARINI-GARCIA H., RAFAEL R.H., MIURA T., Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology** 165 390–411, 2010.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 2063-2072, 2005.

SORENSEN Jr., A.M. *A laboratory for animal reproduction*. 4.ed. Boston: American Press. 153p, 1979.

STREIT Jr., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D.; OLIVEIRA, C.A.L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, 7(2): 157-162, 2004.

VALENTIN F. N. **Efeito da idade das matrizes de tilápia do nilo *oreochromis niloticus* no desenvolvimento embrionário e larval**. 43p. Dissertação (Mestre em Aquicultura) Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, 2007.

WOYNAROVICH, E. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 225p, 1989.