

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DA TAINHA *Mugil liza* COM A UTILIZAÇÃO DE SÊMEN FRESCO E CRIOCONSERVADO

Ricardo Igi Otsubo

Orientador: Dra. Idili da Rocha Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo

Outubro - 2010

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DA TAINHA *Mugil liza* COM
A UTILIZAÇÃO DE SÊMEN FRESCO E
CRIOCONSERVADO**

Ricardo Igi Otsubo

Orientador: Dra. Idili da Rocha Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo
Outubro - 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

O88d Otsubo, Ricardo Igi
Inseminação artificial da tainha *Mugil liza* com a utilização de sêmen fresco e criopreservado. / Ricardo Igi Otsubo. – São Paulo, 2010.
v, 59f. ; tab. ; graf.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.
Orientadora: Idili da Rocha Oliveira

1. Aquicultura. 2. Fecundação. 3. Mugilidae. 4. Reprodução. 5. Sêmen.
I. Oliveira, Idili da Rocha . II. Título.

CDD 597

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Inseminação artificial da tainha *Mugil liza* com a utilização
de sêmen fresco e crioconservado

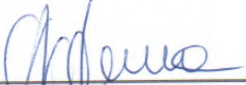
AUTOR: RICARDO OTSUBO

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Idili da Rocha Oliveira

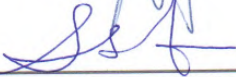
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof^a. Dra. Idili da Rocha Oliveira

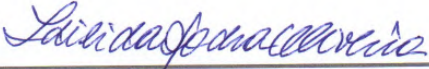


Prof. Dr. Alexandre Nirmaus Silveira



Prof^a. Dra. Lucy Satiko Hashimoto Soares

Data da realização: 19 de novembro de 2010



Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. Dra. Idili da Rocha Oliveira

AGRADECIMENTOS

À meus pais, Carlos Setsuo Otsubo e Tereza Terue Igi Otsubo, pelo total apoio, incentivo, carinho e dedicação e principalmente, por priorizarem a minha formação acadêmica;

À minha orientadora Dra. Idili da Rocha Oliveira, pela oportunidade de sua orientação e ao pesquisador Pedro Carlos da Silva Serralheiro, pelo total apoio, dedicação e por todos os valiosos ensinamentos;

Ao Instituto de Pesca APTA/SAA-SP pela viabilização logística deste trabalho junto ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca, bem como, a todos os professores e pesquisadores do Programa de Pós-graduação do Instituto de Pesca;

Aos professores e pesquisadores Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério e Dr. Edson Barbieri, pela minha qualificação e pela amizade;

Aos professores Alexandre Ninhaus Silveira, Lucy Satiko Hashimoto Soares, Yara Aiko Tabata, Edison Barbieri, por aceitarem compor minha banca defesa de dissertação e pela amizade;

Aos colegas da pós-graduação, Natalia, João, Ivans, Camila, Débora, Ariane, Felipe, e os funcionários do Instituto de Pesca, Beth e Dito;

À meus irmãos, Viviane e Marcelo, pela amizade, carinho e dedicação;

À Yukari, pelo companheirismo, incentivo e paciência;

Aos amigos, que graças a Deus, são muitos e independente de trabalharem com peixes ou não, sempre estarão ao meu lado e poderei contar com vocês. Expresso meus eternos agradecimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO GERAL	1
Família Mugilidae	1
Crioconservação	5
OBJETIVOS	8
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 1 – Inseminação artificial da tainha <i>Mugil liza</i>: determinação da proporção espermatozóides por oócito	
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2 – Inseminação artificial da tainha <i>Mugil liza</i> com sêmen crioconservado	
RESUMO	36
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Parâmetros corporais e espermáticos dos machos de *Mugil liza*.... 25

Figura 1. Linha de tendência da capacidade de fecundação (%) do sêmen fresco de *Mugil liza*, em relação à proporção espermatozóide:oócito..... 29

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Parâmetros biométricos e características seminais de *Mugil liza*.... 43

Figura 1. Motilidade do sêmen da tainha *Mugil liza* em diferentes concentrações de DMSO 45

Figura 2. Tempo de motilidade do sêmen da tainha *Mugil liza* em diferentes concentrações de DMSO..... 46

Figura 3 - Capacidade de fecundação (%) do sêmen fresco e crioconservado de *Mugil liza*, em relação a proporção espermatozóide:oócito, em diferentes concentrações de DMSO..... 50

Inseminação artificial da tainha *Mugil liza* com a utilização de sêmen fresco e crioconservado

RESUMO

No protocolo de inseminação artificial, desenvolvido para populações selvagens da tainha *Mugil liza*, foi investigado como a variação da densidade do sêmen fresco e do sêmen crioconservado influenciam o sucesso reprodutivo de um macho. Em experimentos separados de inseminação, oócitos de fêmeas induzidas à desova com gonadotrofina coriônica humana (60 UI.g^{-1} de peso) foram fecundados com sêmen fresco e com sêmen congelado. Na crioconservação, o sêmen, previamente diluído (1:3; v/v) e equilibrado (60 segundos) em meios crioprotetores (Ringer marinho, pH 8,2, combinado com 5,0, 7,5 ou 10% de dimetil sulfóxido) foi aspirado em palhetas criogênicas (0,5 mL), resfriado a $-196 \text{ }^\circ\text{C}$, em vapor de nitrogênio a $67 \text{ }^\circ\text{Cmin}^{-1}$, e estocado em nitrogênio líquido. Para cada combinação de macho-fêmea foram testadas sete proporções de espermatozoides:oócito variando entre $2,5 \times 10^4:1$ a $1,6 \times 10^6:1$. Para cada proporção, foram inseminados lotes contendo 10^3 oócitos viáveis (réplicas), com tempo de contato de 60 segundos entre os gametas, após ativação em água marinha. As taxas de fecundação foram estimadas após 16 horas de incubação. Para o sêmen fresco, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas quando as proporções variaram de $2,5 \times 10^4:1$ a $2,0 \times 10^5:1$, acima dessa concentração não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nas taxas de fecundação. As taxas máximas de fecundação ($97,29 \pm 3,46\%$) foram obtidas a partir da proporção $2,0 \times 10^5:1$. As médias obtidas na determinação das características seminais foram: volume $4,4 \pm 1,02 \text{ mL}$, concentração espermática $4,487 \pm 0,75 \times 10^{10} \text{ céls.mL}^{-1}$, motilidade $99 \pm 2,16\%$ e tempo de motilidade $458 \pm 12 \text{ s}$. No sêmen crioconservado a solução crioprotetora 7,5%, mostrou-se mais efetiva na preservação das características seminais, proporcionando índices de motilidade ($81,7 \pm 5,7\%$) relativamente próximos aos do sêmen fresco. As taxas máximas de fecundação ($97,8 \pm 2,48\%$) foram obtidas a partir da proporção $8,0 \times 10^5:1$, indicando que esta concentração é a mínima necessária para o sucesso da inseminação. Para o sêmen fresco taxas similares foram registradas em proporção inferior ($2,0 \times 10^5:1$). O benefício mais relevante referiu-se ao prolongamento da longevidade ($810 \pm 12,7 \text{ s}$), quase o dobro da apresentada pelo sêmen fresco, indicando que períodos de exposição maiores que 60 segundos podem resultar em incremento do sucesso da fecundação. A densidade dos espermatozoides teve um efeito significativo no sucesso da fecundação, como esperado, porém diversamente variável com respeito aos tipos de sêmen examinados. De um modo geral, as taxas de fecundação, que se revelaram baixas nas densidades iniciais, experimentaram uma forte evolução até atingirem um patamar máximo, após o qual não foram observadas variações ascendentes mesmo quando esse comportamento poderia ser esperado em oócitos inseminados com densidades bem maiores.

Palavras-chave: aquicultura, fecundação, Mugilidae, reprodução, sêmen

Artificial insemination of mullet *Mugil liza* using fresh and cryopreserved semen.

ABSTRACT

In the artificial insemination protocol developed for wild mullet *Mugil liza* populations, it has been investigated how density variation of fresh and cryopreserved semen influences the reproductive success of a male. In separate insemination experiments, eggs of females induced to spawning with human chorionic gonadotropin (60 UI.g^{-1} of weight) were crossed with fresh and frozen semen. In cryopreservation, semen previously diluted (1:3; v/v) and equilibrated (60 seconds) in cryoprotecting media (sea Ringer, pH 8.2, combined with 5.0, 7.5 or 10% dimethyl sulfoxide) was aspirated in cryogenic straws (0.5 mL), cooled at $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in nitrogen vapor at $67 \text{ }^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ and stored in liquid nitrogen. Seven sperm:egg ratios were tested for each male-female combination varying from $2.5 \times 10^4:1$ to $1.6 \times 10^6:1$. For each ratio, batches with 10^3 viable eggs (replicates) were inseminated with 60 seconds contact time between gametes, after activation in seawater. Fertilization rates were estimated after 16 hours of incubation. For fresh semen significant differences ($P < 0,05$) were observed when ratios varied from $2.5 \times 10^4:1$ a $2.0 \times 10^5:1$. There were no significant fertilization rate differences ($P > 0,05$) above these concentrations. Maximum fertilization rates ($97.29 \pm 3.46\%$) were obtained as from $2.0 \times 10^5:1$ ratio. Means for semen characteristics were: volume 4.4 ± 1.02 mL, sperm density $4.487 \pm 0.75 \times 10^{10}$ cels.mL⁻¹, motility $99 \pm 2.16\%$ and motility time 458 ± 12 s. For cryopreserved semen, the 7.5% cryoprotecting solution was more effective to preserve semen characteristics, allowing motility indices ($81.7 \pm 5.7\%$) relatively close to those of fresh semen. Maximum fecundation rates ($97.8 \pm 2.48\%$) were obtained as from $8.0 \times 10^5:1$ ratio, indicating that this concentration is the minimum necessary for a successful insemination. For fresh semen, similar rates were observed in lower ratio ($2.0 \times 10^5:1$). The most relevant benefit was longevity prolongation (810 ± 12.7 s), almost twice that presented by fresh semen, indicating that exposure periods longer than 60 seconds may result in further fecundation success. Sperm density had a significant effect in fertilization success, as expected, however very variable depending on types of examined semen. In general, fertilization rates, which were low with initial densities, had a steady evolution until reaching a maximum level, after which there were no ascending variations even when this behavior could be expected in eggs inseminated with much higher densities.

Keywords: aquaculture, fertilization, Mugilidae, reproduction, semen.

Inseminação artificial da tainha *Mugil liza* com a utilização de sêmen fresco e criopreservado

INTRODUÇÃO GERAL

Família Mugilidae

A família Mugilidae (Ordem Perciformes, Subclasse Actinopterygii) está representada por 17 gêneros, agrupando pelo menos 66 espécies eurihalinas e euritérmicas, encontradas em águas tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo, sobretudo em regiões costeiras (NELSON, 1994).

Além da sua importância econômica na pesca, a família Mugilidae vem despertando o interesse na aquicultura, pois suporta bem as condições de confinamento, de alimentação artificial e de variações de salinidade e temperatura (MENDEZ, 1983; MESEDA and SAMIRA, 2006). A criação da tainha vem apresentando bons resultados em sistemas de monocultivo e policultivo conduzidos em diversos países do mundo, sendo o Egito, atualmente, o responsável pela maior parte da produção (FAO, 2009).

Segundo dados da FAO (2009), a produção mundial da pesca da tainha atingiu um pico de 165 mil toneladas, em 2004, apresentando decréscimo anual, com 83 mil toneladas em 2007; enquanto que, a aquicultura cresceu de 25.600 toneladas, em 1997, para 264 mil toneladas em 2007. As espécies mais representativas na aquicultura mundial são *Mugil cephalus* (LEE and OSTROWSKI, 2001) e *Liza ramada* (MOUSA, 2010).

Em estudo morfológico recente, as tainhas que se distribuem ao longo da costa do Atlântico da América do Sul e do Caribe, foram consideradas taxonomicamente como *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (MENEZES *et al.*, 2010) e isso implica englobar, à *M. liza*, os limites de distribuição geográfica atribuídas anteriormente à *M. platanus* Günther, 1880.

Anteriormente, MENEZES e FIGUEIREDO (1985) haviam identificado sete espécies do gênero *Mugil* na costa brasileira (*M. liza*, *M. curema*, *M.*

gaimardianus, *M. incilis*, *M. curvidens*, *M. trichodon* e *M. platanus*). Dentre elas, duas conhecidas como tainhas, *Mugil liza* e *Mugil platanus*, com áreas de distribuição distintas, respectivamente, das Bermudas ao Rio de Janeiro e do Rio de Janeiro à Argentina.

A tainha é uma espécie diádroma, podendo se locomover do ambiente marinho para o de água doce ou vice-versa, porém, preferencialmente catádroma, no que diz respeito à migração para a reprodução, com desova em alto mar e uma fase estuarina obrigatória para os juvenis, que se deslocam para regiões costeiras, onde passam parte do seu ciclo de vida para maturação (MENEZES, 1983; MENEZES e FIGUEIREDO, 1985).

A tainha representa um dos principais recursos pesqueiros, no litoral de São Paulo, para a pesca artesanal e, também, a partir de 2000, para a frota industrial de traineiras, deixando de ser apenas uma espécie acessória à pesca da sardinha verdadeira (MIRANDA e CARNEIRO, 2007).

No Brasil, a tainha está associada historicamente à subsistência e à cultura de comunidades de pescadores artesanais em regiões costeiras (REIS & D'INCAO, 2000). Reconhecida pelo valor culinário da carne, o maior valor da tainha está em suas gônadas maduras, que alcançam altos preços no mercado internacional (FERREIRA, 2006). Em anos recentes, em face do aumento das capturas dirigidas para as populações adultas em migração reprodutiva, os estoques regionais de tainhas vêm diminuindo acentuadamente, cogitando-se a sua criação em cativeiro (IBAMA, 2007).

Sobrepondo-se ao tamanho dos demais mugilídeos da América do Sul e Caribe, essa espécie exibe considerável crescimento em cativeiro, com taxas similares ao *Chanos chanos*, principal espécie eurihalina criada mundialmente (ALVAREZ-LAJONCHÉRE y MOLEJÓN, 2001). Um dos maiores entraves para o desenvolvimento da piscicultura marinha, está na obtenção de juvenis de espécies com potencial na aquicultura. Apesar das tainhas possuírem carne e ovas muito apreciadas pelo mercado e estarem em situação de sobrepesca no

Brasil, os estudos para sua utilização na piscicultura marinha, somente começaram a ser desenvolvidos a partir da década de 80 (BENETTI e FAGUNDES NETTO, 1980; GODINHO, 1993).

Vários estudos têm sido realizados visando conhecimento da biologia da espécie. SCORVO FILHO *et al.* (1988) identificaram os alevinos de mugilídeos na região de Ubatuba. SERRALHEIRO *et al.* (1994), analisando dados morfométricos e RANZANI-PAIVA (1995), características hematológicas, concluíram que as tainhas capturadas na região estuarino-lagunar de Cananéia pertence a uma única espécie. Em relação à alimentação OLIVEIRA e SOARES (1996), determinaram os itens mais importantes do conteúdo estomacal da tainha. GALVÃO *et al.* (1997), estudaram o sistema digestório e enzimas digestivas proteolíticas das larvas e juvenis, verificando a necessidade do desenvolvimento de dietas com proteína previamente hidrolisada ou aminoácidos livres.

Sobre a biologia reprodutiva, VIEIRA e SCALABRIN (1991), estudando a migração reprodutiva da tainha no sul do Brasil, observaram que devido à brusca queda de temperatura e a intrusão de água salgada no estuário, a tainha inicia sua migração do estuário da Lagoa dos Patos (RS) para o mar. Na baía de Paranaguá (PR), ESPER *et al.* (2001), estudaram a época reprodutiva da tainha, e indicaram que na região, a espécie apresenta um período reprodutivo entre maio e outubro, com picos em agosto e setembro. Em Cananéia (SP), ROMAGOSA *et al.* (2000) concluíram que a tainha apresenta desova total e fecundidade variando de 500×10^3 a 2.300×10^3 oócitos, mostrando correlação positiva com o comprimento, peso do corpo e tamanho das gônadas.

Estudos foram feitos sobre a susceptibilidade de juvenis de *Mugil platanus* a fatores potencialmente limitantes para a sua criação. MIRANDA-FILHO *et al.* (1995) avaliando o efeito da amônia e do nitrito no crescimento da tainha, concluíram que níveis de amônia total maiores de 4 mg/L afetam o crescimento. Complementando este trabalho, POERSCH *et al.* (2007), determinaram 152,2 mg/L de nitrato, como limite máximo a que alevinos de

tainha poderiam ser submetidos sem prejuízo no seu desenvolvimento. OKAMOTO *et al.* (2006) observaram que as tainhas crescem melhor em temperaturas de 30°C.

Protocolos de criação têm sido propostos para a tainha em água doce (FONSECA-NETO e SPACH, 1998/1999), em água marinha (SAMPAIO *et al.*, 2001) e em policultivo com carpa (SCORVO FILHO *et al.*, 1995), com linguado (SAMPAIO, 2008) e com camarão marinho (COSTA *et al.* 2008), demonstrando a capacidade de adaptação da tainha a diferentes salinidades e as possibilidades de criação consorciada com resultados satisfatórios. Segundo dados da FAO (2009), a maioria dos registros de policultivos com tainha é realizado em consorciação com a carpa-comum, carpa-capim, carpa-prateada, tilápia, milk-fish.

Porém, a tainha mantida em condições de cativeiro tem exibido disfunções reprodutivas que inibem a liberação espontânea dos gametas, em prejuízo da reprodução. Embriões e larvas têm sido gerados experimentalmente mediante uso rotineiro da inseminação artificial (GODINHO *et al.*, 1984; ALVAREZ-LAJONCHÉRE, 1988, 1991; GODINHO *et al.*, 1993; MONTEIRO-RIBAS e BONECKER, 2001; ALBIERI e ARAÚJO, 2010). O foco dessas investigações privilegiou os aspectos reprodutivos relativos à viabilidade dos oócitos, em detrimento do sêmen. Em consequência, a influência dos efeitos parentais dos machos na variação do sucesso da fecundação não puderam ser examinados.

Na reprodução da tainha, o que mais tem chamado a atenção é o fato de uma parcela significativa das inseminações resultarem em fecundações negativas, mesmo quando os oócitos usados tinham o padrão morfológico definido como viável (GODINHO *et al.*, 1993). Supostamente, nessas tentativas de reprodução, uma parcela significativa do insucesso das fecundações estava relacionada com a quantidade sub-ótima de espermatozoides viáveis usada na inseminação dos oócitos. Estudos de inseminação artificial em peixes de água marinha (CHAO *et al.*, 1975; ROSENTHAL *et al.*, 1988; SUQUET *et al.*, 1995; TVEDT *et al.*, 2001; BUTTS *et al.*, 2009; TIBA *et al.*, 2009) e de água doce

(RURANGWA *et al.*, 1998; SANCHES *et al.*, 2009) têm demonstrado a importância da relação espermatozóides/oócitos na variabilidade das respostas da fecundação.

Entretanto, a indisponibilidade temporal de machos maduros, especialmente no período de plena atividade reprodutiva das fêmeas, compromete o potencial da aquicultura de *M. liza*. Essa separação sexual, verificada nas rotinas de reprodução artificial, foi reforçada em estudo prévio tomando como base indivíduos capturados ao longo de dois ciclos reprodutivos (ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 1996). Os autores observaram que os machos maduros que ao início da estação reprodutiva representavam a maioria quase absoluta das capturas, cederam seu predomínio para as fêmeas, até desaparecerem das capturas, em contraste com o que ocorre com as fêmeas no avanço da estação reprodutiva. Resultados semelhantes foram descritos mais recentemente por ALBIERI e ARAÚJO (2010), em dados coletados na baía de Sepetiba (RJ). As bases desse comportamento não estão claras. Baseados nessas evidências, o método de estocagem do sêmen em temperaturas criogênicas, tem sido indicado como boa alternativa para disponibilizar o sêmen em protocolos de inseminação artificial.

Crioconservação

Face ao drástico declínio dos estoques naturais de peixes no mundo (NEW, 1997) e das estimativas de redução dos principais estoques de peixes marinhos de interesse comercial, torna-se imprescindível o desenvolvimento dos métodos de conservação dos gametas e sua aplicação no controle da reprodução das espécies (DONALDSON *et al.*, 2000).

A crioconservação é uma técnica importante no controle reprodutivo de muitas espécies e vem sendo utilizada com sucesso na preservação das características do sêmen de peixes. Envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozóides em nitrogênio líquido (-196°C), mantendo a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (CAROLSFELD *et al.*, 2003; MELO e GODINHO, 2006).

O armazenamento de sêmen de peixes, por longos períodos de tempo, constitui uma ferramenta importante que possibilita a manutenção da variabilidade genética de uma população (CAROLSFELD *et al.*, 2003). Por outro lado, ainda que, as técnicas de congelamento não melhorem a qualidade do sêmen (LAHNSTEINER *et al.*, 1992), o que se verifica é que o seu uso tem trazido ganhos indiretos, em relação à identificação das fontes de variabilidade da qualidade dos gametas (HONEYFIELD and KRISE, 2000) e ao alongamento da estação reprodutiva (KNAPP, 2000).

O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe, realizado há mais de 50 anos por BLAXTER (1953), viabilizou o cruzamento de duas populações de arenque do Atlântico (*Clupea harengus*) que desovam em épocas diferentes do ano. Desde então, muitas são as técnicas de manipulação de sêmen já estabelecidas para várias espécies de peixes, com especial destaque para os ciprinídeos (BILLARD *et al.*, 1995), os silurídios (LEGENDRE *et al.*, 1996) e os salmonídeos (SCOTT and BAYNES, 1980). Mesmo assim, com exceção para a truta arco-íris e o salmão do Atlântico, ainda há muitas questões básicas para serem respondidas, no tocante às técnicas de conservação de sêmen de muitas espécies de interesse econômico e ambiental (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

Estima-se que, das mais de 200 espécies com protocolos de crioconservação experimentalmente determinados (THIRUMALA *et al.*, 2006), aproximadamente 40 são do ambiente marinho (GWO, 2000). Muitos desses estudos foram detalhadamente revisados em várias publicações (MOUNIB, 1978; SCOTT and BAYNES, 1980; RANA, 1996; GWO, 2000; SUQUET *et al.*, 2000; THIERSCH, 2000; CHAO and LIAO, 2001; THIERSCH, 2001; BILLARD *et al.*, 2004). Técnicas preliminares de crioconservação de mugilídeos foram estabelecidas em Taiwan por volta do ano de 1974, no laboratório marinho de Tungking (CHAO *et al.*, 1975).

O Instituto de Pesca, desde 1980, vem desenvolvendo tecnologias de crioconservação de sêmen para diversas espécies de peixes de água doce

como pacu, curimatá e truta (FOGLI DA SILVEIRA *et al.*, 1984; KAVAMOTO *et al.*, 1986, 1989). Em espécies marinhas do litoral brasileiro, a técnica foi aplicada, primeiro, na tainha *Mugil platanus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1992, 1999) e, depois, no robalo-peva *Centropomus parallelus* (SERRALHEIRO *et al.*, 1998; TIBA *et al.*, 2009), linguado *Paralichthys orbignyanus* (LANES *et al.*, 2008) e na garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (SANCHES *et al.*, 2008, 2009).

A crioconservação tem contribuído para o sucesso da reprodução de várias espécies de peixes, principalmente daquelas que exibem comportamento sexual assíncrono (BLAXTER, 1953; CHAO and LIAO, 2001; KOPEIKA, 2007), como no caso da tainha *Mugil liza*. Porém, o sucesso da crioconservação depende não somente da qualidade dos espermatozóides, velocidades de congelamento e descongelamento e da composição dos diluentes, mas, sobretudo do tipo e concentração do crioprotetor. Apesar das inúmeras evidências dos crioprotetores na minimização dos efeitos biológicos do resfriamento nos espermatozóides, como congelamento da água e concentração dos solutos no líquido remanescente (KOPEIKA *et al.*, 2007; ANDREEV *et al.*, 2009), pouco tem sido revelado sobre os limites de segurança tóxica aos oócitos durante a inseminação.

O dimetil sulfóxido (Me_2SO ou DMSO) tem sido considerado de baixa toxicidade e eficiente na ação de proteger os espermatozóides durante o resfriamento, reduzindo a formação de cristais de gelo, desse modo, diminuindo o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo (PELETEIRO *et al.*, 1996; SUQUET *et al.*, 2000; CHEREGUINI *et al.*, 2001; RIDEOUT *et al.*, 2004; RILEY *et al.*, 2004; CABRITA *et al.*, 2005). Em peixes marinhos, o DMSO, segundo CHAO and LIAO (2001), é um dos crioprotetores mais amplamente utilizados no congelamento do sêmen. Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, sabe-se que o DMSO interage com os fosfolipídeos estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do 0 °C (MC ANDREW *et al.*, 1993; THIRUMALA *et al.*, 2006).

Portanto, existem problemas ao se definirem protocolos específicos de crioconservação do sêmen para cada espécie, pois tendem a apresentar diferentes sensibilidades de seus espermatozoides à redução na temperatura e ao contato com soluções crioprotetoras (MURGAS, 2007).

OBJETIVOS

1. Avaliar as características espermáticas do sêmen fresco: volume de sêmen, motilidade, tempo de motilidade e densidade.
2. Avaliar os efeitos da crioconservação na motilidade e tempo de motilidade espermáticas, quando são empregadas diferentes concentrações do crioprotetor dimetil sulfóxido.
3. Determinar a capacidade de fecundação do sêmen fresco e do crioconservado na tainha.

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Como resultado dos estudos realizados com sêmen fresco e crioconservado da tainha *Mugil liza*, esta Dissertação será apresentada em dois capítulos a serem enviados como artigos, seguindo as normas da Revista Brasileira de Zootecnia (Anexo 1).

Capítulo 1. Inseminação artificial da tainha *Mugil liza*: determinação da proporção espermatozóide por oócito.

O volume do sêmen e a motilidade, tempo de motilidade e concentração espermáticos, parâmetros importantes na avaliação da viabilidade do sêmen, foram analisados e serviram como base para determinar o número de espermatozoides necessários para fecundar com sucesso oócitos da tainha *Mugil liza*, em condições de inseminação artificial.

Capítulo 2. Inseminação artificial da tainha *Mugil liza* com sêmen crioconservado.

Um protocolo de crioconservação de sêmen da tainha *Mugil liza* foi elaborado para examinar os efeitos do congelamento na motilidade e tempo de motilidade espermáticas e, também, na capacidade de fecundação do sêmen, quando são empregadas diferentes concentrações do crioprotetor dimetil sulfóxido.

REFERÊNCIAS

- ALBIERI, R.J. and ARAÚJO, F.G. 2010 Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei:Mugilidae) in a tropical Brazilian bay, *Zoologia* 27(3): 331-340.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; BERDAYES ARRITOLA, J.; LAIZ AVERHOFF, O. et al. 1988 Positive results of induced spawning and larval rearing experiments with *Mugil liza* Val., a grey mullet from Cuban Waters. *Aquaculture*, v. 73, p. 349-355.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; HERNÁNDEZ MOLEJÓN, O.G. PÉREZ SÁNCHEZ, L. 1991 Production de juveniles de la lisa *Mugil liza* Valenciennes, 1836, por reproducción controlada en Cuba. *Ciências Marinas*, 17: 47-56.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. y HERNÁNDEZ MOLEJÓN, O.G. 2001 Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, 12-13
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y. GODINHO, H.M. 1996. Características reprodutivas de tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae), da região estuarino lagunar de Cananéia, São Paulo. *Revista Ceres*, 43(246): 165-185.
- ANDREEV, A. A.; SADIKOVA, D.G.; GAKHOVA, E. N.; PASHOVKIN, T.N.; TIKHOMIROV, A.M., 2009 Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. *Biophysics* 54(5): 612-616.
- BENETTI, D.D. e FAGUNDES NETTO, E.B. 1980 Considerações sobre desova e alevinagem da tainha, *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) em laboratório. *Boletim do Instituto de Pesca*, 135: 1-26.
- BILLARD, R; COSSON, J; CRIM, L.W.; SUQUET, M. 1995 Sperm physiology and quality. In: Bromage NR, Roberts, RJ (Ed.). Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge: *Cambridge University Press*, Cambridge,. p.25-52.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, S. B.; POURKAZEMI, M. 2004 Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 266: 1-9.
- BLAXTER, J.H.S. 1953 Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 1189-1190.
- BUTTS, I.A.E.; TRIPPEL, E.A.; LITVAK, M.K. 2009 The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture*, 286: 89-94.

- CABRITA, E; ROBLES; V.; CUÑADO, S.; WALLACE, J.C.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M.P. 2005 Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology*, 50: 273–284.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI-FILHO, E. 2003 Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63: 472-481.
- CHAO, N.H.; CHEN, H.P.; LIAO, I.C. 1975 Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5: 389-406.
- CHAO, N.H. and LIAO, I.C. 2001 Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197:161-189.
- CHEREGUINI, O.; de la BANDA, I.G.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. 2001 Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. *Aquatic Resource*, 32: 133–143.
- COSTA, L.C.; NEVES, L.F.M.; CHAVIER, J.A.; LISBOA, V.C.; FIGUEIREDO, M.R.C.; WASIELESKY-Jr.,W.F.B. 2008 Policultivo de tainha (*Mugil platanus*) com camarão (*Litopenaeus vannamei*) em viveiros de terra no extremo sul do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras, *Anais...* Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia.
- DONALDSON, E.M.; SOLAR, I.I.; HARVEY, B. 2000 Induced Ovulation and Spermiation, and Factors Influencing Gamete Qualit. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M., editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 13-19.
- ESPER, M. de L.P; MENEZES, M.S.; ESPER, W. 2001 Época reprodutiva de *Mugil platanus* (Günther, 1880), Pisces Mugilidae da baía de Paranaguá (Paraná, Brasil), *Acta Biológica Paranaense*, 30(1,2,3,4): 5-17.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *Yearbook of Fishery Statistics: Summary Tables*. FAO, Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 11set. 2009.
- FERREIRA, F. de A. 2006 *Desenvolvimento de produto tipo caviar a base de ovas de tainha (Mugil platanus)*. Rio Grande. 77p. (Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal de Rio Grande).
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G.; PENTEADO, L.A.; CARVALHO FILHO, A. C. 1984 Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus*, no Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 11: 131-136.

- FONSECA-NETO, J.C.F. e SPACH, H.L., 1998/1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Boletim do Instituto de Pesca*, 25: 13-17.
- GALVÃO, M. S. N.; YAMANAKA, N.; FENERICH-VERANI, N.; PIMENTEL, C. M. M. 1997 Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, durante as fases larval e juvenil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 24 : 101-110.
- GODINHO, H.M.; DIAS, E.R. de A.; JACOBSEN, O.; YAMANAKA, N. 1984 Reprodução induzida de tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836, da região de Cananéia, São Paulo, Brasil (25°, 21'). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., São Carlos. *Anais...* São Carlos: Sociedade Brasileira de Aquicultura, 1984. p.661-667.
- GODINHO, H.M.; KAVAMOTO, E.T.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. de.; SERRALHEIRO, P.C. da S.; PAIVA, P. de.; FERRAZ, E. de M. 1993 Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GÜNTHER, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 20: 59 -66.
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R.; MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p 138-160.
- HONEYFIELD, D.C. and KRISE, W.F. 2000 Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T.R.; MAZUR, P.M. (eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. USA, p.49-58.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2007 *Relatório de Reunião Técnica para ordenamento da pesca da tainha (Mugil platanus, M. liza) na região Sudeste/Sul do Brasil*. Itajaí, SC, 85p.
- KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. 1986 Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13 (2): 45-50.
- KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. 1989 Fertilização em *Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881, com sêmen crioconservado em nitrogênio líquido. *Boletim do Instituto de Pesca*, 16 (1): 29-36.
- KNAPP, W.E. 2000 Foreword. In: TIERSCH, T.R.; MAZUR, P.M. (eds) *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. USA, p.17.
- KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J.; ZHANG, T. 2007 Cryopreservation of fish sperm. In: DAY, J.G.; STACEY, G.N. (ed) *Cryopreservation and Freeze-Drying protocols*. 2.ed. New Jersey: Totowa. p.203-218.

- LAHNSTEINER, F. WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. 1992 Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*, 103: 73-84.
- LANES, C.F.C.; OKAMOTO, M.; CAVALCANTI, P.V.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.F.; DESCHAMPS, J.C.; ROBALDO, R.B.; MARINS, L.F.; SAMPAIO, L.A. 2008 Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, 275: 361-365.
- LEE, C.S. and OSTROWSKI, A.C. 2001 Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture*, 200: 89-109.
- LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. 1996 Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Living Resource*, 9: 59-80.
- MC ANDREW, B.J.; RANA, K.J.; PENMAN, D.J. 1993 Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: MUIR, J.F.; ROBERTS, R.J. *Recent Advances in Aquaculture*, vol IV, Oxford, Blackwell, p. 295-336.
- MELO F.C.S.A. e GODINHO, H.P. 2006 A protocol for sperm cryopreservation of the vulnerable fish *Brycon orthotaenia* (Characiformes, Characidae). *Animal Reproduction*, 3: 380-385.
- MENDEZ, G.N. 1983 Estudo sobre aclimação de alevinos de tainha (*Mugil curema* Valenciennes, 1836) à água doce. *Revista Brasileira de Zoologia*, 2(1): 13-33.
- MENEZES, N.A. 1983 Guia prático para o reconhecimento e identificação de tainhas e paratis (Pisces-Mugilidae) do litoral brasileiro. *Revista Brasileira de Zoologia*, 2(1): 1-12.
- MENEZES, N.A. e FIGUEIREDO, J.L. 1985 *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil*. V. Teleostei (4). Museu de Zoologia da USP, São Paulo, 105p.
- MENEZES, N.A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. 2010 An old taxonomic dilemma: the identify of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*, 2519: 59-68.
- MESEDA, M.E. and SAMIRA, S.A. 2006 Spawning induction in the Mediterranean grey mullet *Mugil cephalus* and larval developmental stages, *African Journal of Biotechnology*, 5(19): 1836-1845.
- MIRANDA-FILHO, K.C., WASIELESKY-Jr, W., MAÇADA, A.P., 1995. Efeito da amônia e nitrito no crescimento da tainha *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 55: 45-50.

- MIRANDA, L.V. e CARNEIRO, M.H. 2007 *A Pesca da Tainha Mugil platanus (Perciformes: Mugilidae) Desembarcada no Estado de São Paulo Subsídio ao Ordenamento*. Instituto de Pesca. 13p. Série de Relatórios Técnicos nº30.
- MONTEIRO-RIBAS, W.M. e BONECKER, A.C.T. 2001 Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (VALENCIENNES, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). *Bulletin of Marine Science*, 8(3): 427-433.
- MOUNIB, M.S. 1978 Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53: 13-18.
- MOUSA, M.A. 2010 Induced spawning and embryonic development of *Liza ramada* reared in freshwater ponds. *Animal Reproduction Science*, 119: 115-122.
- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. 2007 Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(3): 526-531.
- NELSON, J.S. 1994 *Fishes of the world*. New York: John Wiley, 600p.
- NEW, M.B. 1997 Aquaculture and the capture fisheries; balancing the scales. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 28: 11-30.
- OKAMOTO, M.H., SAMPAIO, L.A., MAÇADA, A.P., 2006 Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1980. *Atlântica*, 28: 61-66.
- OLIVEIRA, I.R. e SOARES, L.S.H., 1996 Alimentação da tainha *Mugil platanus* Günther, 1980. (Pisces, Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 23: 95-104.
- PELETEIRO, J.B., CHEREGUINI, O.; CAL, R.M. 1996 Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). *Informe Tecnico Del Instituto Espanol de Oceanografo*. 162: 1-13.
- POERSCH, L. H.; SANTOS, M. H. S.; MIRANDA FILHO, K.; WASIELESKY Jr, W. 2007 Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha, *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33(2) : 247-252.
- RANA, K.J. 1996 Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Ed.) *Broodstock management and egg and larval quality*. 2.ed. Oxford: Blackwell Science. p.53-75.

- RANZANI-PAIVA, M. J. T. 1995 Características hematológicas de tainha *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, da região estuarino lagunar de Cananéia, SP. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 22(1) : 1-22.
- REIS, E.G. and D'INCAO, F. 2000 The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort to wards community-based management. *Ocean & Coastal Management*, 43: 585-595.
- RIDEOUT, R. M.; TRIPPEL, E.A.; LITVAK, M.K. 2004 The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and effect of sperm age on cryopreservation success. *Journal of fish Biology*, St. John's, 65: 299-311.
- RILEY, K.L.; HOLLADAY, C.G.; CHESNEY, E.J.; TIERSCH, T.R. 2004 Cryopreservation of sperm of red snapper. *Aquaculture*, 238: 183-194.
- ROMAGOSA, E.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; NARAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M. 2000 Desova e fecundidade da tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Mugilidae) na região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil (25°01'S; 47°57'W), *Atlântica* 22: 5-12.
- ROSENTHAL, H.; KLUMPP, D.; WILLFÜHR, J. 1988 Influence of sperm density and contact time on herring egg fertilization. *Journal of Applied Ichthyology*, 4: 79–86.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G. 1998 The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 53: 402–413.
- SAMPAIO, L.A.; FERREIRA, A.H. & TESSER, M.B. 2001 Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Gunther, 1880). *Acta Scientiarum*, 23:471-475.
- SAMPAIO, J.A. de O. 2008 *Desempenho de linguados *Paralichthys orbignyanus* em policultivo com tainhas *Mugil platanus* em viveiros de solo, no período de outono e inverno*. Rio Grande. 33p. (Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande).
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. 2008 Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Bioikos*, 22(2): 81-90.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. 2009 Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10(1): 198-209.
- SCORVO-FILHO, J.D.; PAIVA, P.; HORIKAWA, M.T.; BARROS, H.P.; BASTO, A. A.; CARVALHO-FILHO, A. C. 1988 Ocorrência de alevinos de mugilídeos

na região de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 15(2) : 213-220.

SCORVO-FILHO, J.D.; AYROZA, L. M. da S.; COLHERINHAS NOVATO, P. F.; ALMEIDA-DIAS, E. R. 1995 Efeito da densidade de estocagem sobre crescimento de tainha listrada (*Mugil platanus*) criada em mono e policultivo com carpa comum (*Cyprinus carpio*), na região do Vale do Ribeira. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 22(2) : 85-93.

SCOTT, A.P. and BAYNES, S.M. 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 17: 707-739.

SERRALHEIRO, P.C. da S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; GODINHO, H.M.; FERRAZ, E.M. 1992 Criopreservação do sêmen da tainha *Mugil platanus* em "macro-paillets". In: I REUNIAO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA 1., São Paulo, 06/04 a 10/04/1992, p. 59.

SERRALHEIRO, P.C. da S.; GODINHO, H.M.; PAIVA, P. 1994 Identificação de tainhas (*Mugil sp*) da região estuarino lagunar de Cananéia, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 21 : 95-102.

SERRALHEIRO, P.C. da S.; OLIVEIRA, I. da R.; GODINHO, H.M. 1998 Fertilização de ovócitos de robalo *Centropomus parallelus* com sêmen crioconservado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., Anais... Recife, p. 360-1.

SERRALHEIRO, P.C. da S.; FOGLI da SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M.; OLIVEIRA, I.R. 1999 O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha – *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio líquido. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13, São Carlos. Anais... p. 508.

SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. 1995 Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture*, 133: 83-90.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, Plouzané, 31: 231-243.

THIRUMALA, S.; CAMPBELL, W.T.; VICKNAIR, M.R.; TIERSCH, T.R.; DEVIREDDY, R.V. 2006 Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, 66: 964–973.

TIBA, R.M.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S.; OSTINI, S. 2009 Diluentes e proporções sêmen:diluyente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(1): 99-110.

- TIERSCH, T.R. 2000 Introduction. In: TIERSCH, T.R. and MAZUR, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. eds. Baton Rouge, Louisiana. USA: 19-26.
- TIERSCH, T.R. 2001 Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine Biotechnology*, 3: 212–223.
- TVEDT, H.B.; BENFEY, T.J.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; POWER, J. 2001 The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194 :191-200.
- VIEIRA, J.P. e SCALABRIN, C. 1991. Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platanus* Günther, 1880) no sul do Brasil. *Atlântica*, 13 (1): 131-141.

CAPÍTULO 1.

Inseminação artificial da tainha *Mugil liza*: determinação da proporção espermatozóides por oócito

Ricardo Igi Otsubo¹, Idili da Rocha Oliveira², Pedro Carlos da Silva Serralheiro²

¹ Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca, Instituto de Pesca (APTA/SAA). Av. Francisco Matarazzo, 455, CEP 05001-900, São Paulo, SP

² Instituto de Pesca (APTA/SAA), Cananéia, SP. e-mail: idili@pesca.sp.gov.br

RESUMO – Com o objetivo de determinar a concentração ótima de espermatozóides na fecundação da tainha *Mugil liza*, foram realizadas inseminações usando as proporções $2,5 \times 10^4:1$; $5,0 \times 10^4:1$; $1,0 \times 10^5:1$; $2,0 \times 10^5:1$; $4,0 \times 10^5:1$; $8,0 \times 10^5:1$; $1,6 \times 10^6:1$ (espermatozóides por oócito). O sêmen colhido individualmente de três machos foi fecundado, separadamente, com oócitos provenientes de três fêmeas submetidas à indução de desova com gonadotrofina coriônica humana (hCG), na dose 60 UI.g^{-1} de peso. Para cada proporção, foram inseminados seis lotes contendo 10^3 oócitos viáveis (réplicas). Após 16 horas de incubação, foram analisadas as taxas de fecundação para cada tratamento. As médias obtidas para as características seminais foram: volume $4,4 \pm 1,02 \text{ mL}$, concentração espermática $4,487 \pm 0,75 \times 10^{10} \text{ céls.mL}^{-1}$, motilidade $99 \pm 2,16\%$ e tempo de motilidade $458 \pm 12 \text{ s}$. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas quando as proporções variaram de $2,5 \times 10^4:1$ a $2,0 \times 10^5:1$, acima dessa concentração não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as taxas de fecundação. As taxas máximas de fecundação ($97,29 \pm 3,46\%$) foram obtidas a partir da proporção $2,0 \times 10^5:1$, indicando que esta concentração é a mínima necessária para inseminar lotes de oócitos com sucesso, podendo ser usada tanto em condições experimentais como em produções comerciais.

Palavras-chave: aquicultura, fecundação, Mugilidae, reprodução, sêmen

Artificial insemination of the mullet *Mugil liza*: establishing sperm to egg ratio

ABSTRACT – Aiming at establishing the optimal sperm density to fertilize the mullet *Mugil liza*, inseminations were performed using $2,5 \times 10^4:1$; $5,0 \times 10^4:1$; $1,0 \times 10^5:1$; $2,0 \times 10^5:1$; $4,0 \times 10^5:1$; $8,0 \times 10^5:1$; $1,6 \times 10^6:1$ ratios (sperm per egg). Individually collected semen of three males was separately crossed with eggs of three females submitted to spawning induction with human chorionic gonadotropin (hCG) in the dose of 60 IU.g^{-1} weight. Six batches with 10^3 viable eggs (replicate) were inseminated for each ratio. After 16 hours of incubation, fertilization rates for each treatment were analyzed. Means obtained for semen characteristics were: volume $4,4 \pm 1,02 \text{ mL}$, sperm density $4,487 \pm 0,75 \times 10^{10} \text{ cels.mL}^{-1}$, motility, $99 \pm 2,16\%$ and motility time, $458 \pm 12 \text{ s}$. Significant differences ($P < 0.05$) were noted when ratios varied from $2,5 \times 10^4:1$ to $2,0 \times 10^5:1$. Above these concentrations there were no significant differences ($P > 0.05$) among fertilization rates. Maximum fertilization rates ($97,29 \pm 3,46\%$) were obtained as from the $2,0 \times 10^5:1$ ratio, indicating that this concentration is the minimum necessary to successfully inseminate batches off eggs, and it may be used both experimentally and for commercial production.

Keywords: aquaculture, fertilization, Mugilidae, reproduction, semen

Introdução

A família Mugilidae está representada por 17 gêneros, agrupando pelo menos 66 espécies eurihalinas e euritérmicas, encontradas em águas tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo, sobretudo em regiões costeiras (Nelson, 1994). As espécies *Mugil cephalus* (Lee & Ostrowski, 2001) e *Liza ramada* (Mousa, 2010), são de reconhecido valor na aquicultura em países da Ásia e Europa. No Brasil, a família agrupa pelo menos 6 espécies, destacando a tainha *Mugil liza* com distribuição na costa Atlântica da América do Sul e Caribe (Menezes et al., 2010), considerada um dos recursos pelágicos com potencial para a aquicultura (Godinho, 2005).

A tainha mantida em condições de cativeiro tem exibido disfunções reprodutivas que inibem a liberação espontânea dos gametas, em prejuízo da reprodução. Embriões e larvas têm sido gerados experimentalmente mediante uso rotineiro da inseminação artificial (Godinho et al., 1984, 1993; Godinho, 2005). O foco dessas investigações privilegiou os aspectos reprodutivos relativos à viabilidade dos oócitos, em detrimento do sêmen. Em consequência, a influência dos efeitos parentais dos machos na variação do sucesso da fecundação não puderam ser examinados.

Na reprodução da tainha, o que mais tem chamado a atenção é o fato de uma parcela significativa das inseminações resultarem em fertilizações negativas, mesmo quando os oócitos usados tinham o padrão morfológico definido como viável (Godinho et al., 1993). Supostamente, nessas tentativas de reprodução, uma parcela significativa do insucesso das fecundações estava relacionada com a quantidade sub-ótima de espermatozóides viáveis usada na inseminação dos oócitos.

Estudos de inseminação artificial em peixes de água marinha (Chao et al., 1975; Rosenthal et al., 1988; Suquet et al., 1995; Tvedt et al., 2001; Butts et al., 2009; Tiba et al., 2009) e de água doce (Rurangwa et al., 1998; Sanches et al., 2009) têm demonstrado a importância da relação espermatozóides/oócitos na variabilidade das respostas da fecundação.

O presente estudo foi elaborado para determinar o número de espermatozóides requisitados para fecundar com sucesso oócitos da tainha *Mugil liza* em condições de inseminação artificial e, também avaliar o volume do sêmen e a motilidade, tempo de motilidade e concentração espermáticas, características importantes na análise da viabilidade do sêmen.

Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul (NPDLS), Instituto de Pesca-APTA-SAA, Cananéia (SP, Brasil), com 13 machos e 3 fêmeas selvagens, capturados em cerco-fixo, em julho de 2008. Os reprodutores depois de biometrados foram selecionados, sendo os machos, pela presença de gota de sêmen na papila urogenital, e as fêmeas, pelo formato distendido do ventre e dilatação da papila. Os animais foram separados por sexo e distribuídos em dois tanques (3 m³), abastecidos com aeração constante e fluxo contínuo de água marinha. A salinidade (33) e a temperatura (22 ± 1 °C) foram mantidas semelhantes à água do local de captura.

Após 72 horas nessas condições, os machos foram separados aleatoriamente em dois grupos. O primeiro, formado por 10 machos, foi usado para estimar o volume total do sêmen e a motilidade, tempo de motilidade e concentração espermáticas. O segundo, constituído pelos 3 restantes, foi usado exclusivamente para avaliar o efeito da relação espermatozóides/oócito na inseminação artificial.

A coleta do sêmen foi individual e precedida da pesagem e da mensuração de cada macho. O sêmen foi extruído mediante compressão manual do abdome e aspirado dentro de seringas plásticas graduadas (5 mL), envolvidas em papel alumínio para proteção contra a luz. Durante a colheita, a região genital dos machos foi constantemente seca com papel toalha, evitando-se a contaminação do ejaculado com fezes, urina e água. O volume total do sêmen liberado por macho foi anotado, antes que o conteúdo de cada seringa fosse transferido para frascos plásticos opacos e mantidos à temperatura de 22 °C.

A motilidade e o tempo de motilidade espermáticas foram estimados em microscópio de contraste de fase (400×). A inspeção desses parâmetros foi realizada em

um único campo focal, definido aleatoriamente, visualizado sob intensidade de luz constante. Em seguida à obtenção do sêmen de cada indivíduo, uma alíquota (15 µL) foi depositada sobre lâmina de vidro e misturada à solução ativadora (água marinha natural esterilizada, 22 °C; 1:1, v:v), com auxílio de lamínula usada para cobrir o preparado. O critério de motilidade foi conferido apenas aos espermatozóides com movimento de deslocamento. A relação entre número de células móveis e o número total de espermatozóides foi calculada para se obter a taxa de motilidade de cada macho. Na mesma amostra, foi calculado o tempo de motilidade correspondente, cronometrando o intervalo de tempo entre o início da ativação e o término dos movimentos de deslocamento celular.

A densidade de espermatozóides.mL⁻¹, por macho, foi determinada sob microscópio de contraste de fase em aumento de 200×, usando hemocitômetro Neubauer Improved, após diluição do sêmen em duas etapas, até atingir a diluição final de 1:10⁴ (sêmen:solução). Para cada diluição foram feitas triplicatas e, a média dos valores obtidos foi usada para o cálculo da densidade.

As médias do volume do sêmen e da motilidade, tempo de motilidade e concentração espermáticas calculadas para os 10 machos, foram extrapoladas para o sêmen dos outros 3 machos manuseados somente nos testes de inseminação artificial.

A inseminação artificial foi realizada pelo método “a seco”, em ambiente com temperatura controlada de 22 °C. Os oócitos foram provenientes de cada uma das 3 fêmeas após tratamento com o hormônio gonadotrofina coriônica humana (Pregnyl, Organon) (Godinho et al., 1993). No momento da liberação dos oócitos de cada uma das fêmeas, que ocorreu aproximadamente 56 horas após o início do tratamento, 42 lotes de oócitos contendo aproximadamente 10³ oócitos/lote/fêmea, foram separados em recipientes plásticos opacos com fundo cônico (50 mL) usando uma seringa (1 mL) com

cateter plástico flexível (comprimento, 5 cm; diâmetro interno, 4 mm) conectado na ponteira, para evitar a compressão dos oócitos. Cada fêmea foi cruzada com um único macho, escolhido aleatoriamente. O procedimento de extrusão das fêmeas e dos machos ocorreram simultaneamente, para que os tempos de armazenamento dos gametas em condições “ex situ” fossem semelhantes. Usando uma microseringa (Hamilton; 10 e 50 μ L), um volume de sêmen, ajustado para corresponder a cada uma das 7 proporções de espermatozóides viáveis:oócito ($2,5 \times 10^4:1$; $5,0 \times 10^4:1$; $1,0 \times 10^5:1$; $2,0 \times 10^5:1$; $4,0 \times 10^5:1$; $8,0 \times 10^5:1$; $1,6 \times 10^6:1$), foi depositado sobre os oócitos de cada lote. Os espermatozóides foram ativados para a fecundação pela adição de 0,5 mL de água marinha (22 °C). Após o tempo de contato entre os gametas de 60 segundos, o excesso do sêmen foi removido com lavagens sucessivas (4 \times) de água marinha (40 mL, cada). Em seguida, cada lote foi transferido para novos recipientes (350 mL) preenchidos com água marinha, para a incubação dos ovos. Dezesesseis horas após a inseminação, o material correspondente a cada lote foi fixado em solução de água marinha com 5% de formaldeído, para exame da fecundação. No total, 126 fecundações foram realizadas (3 cruzamentos \times 7 concentrações \times 6 réplicas). Um mínimo de 300 ovos por réplicas foi conferido em microscópio estereoscópico (16 \times) e o sucesso da reprodução foi calculado como porcentagem dos ovos fecundados do total dos examinados. Foram considerados fecundados os ovos em fase de mórula.

Todos os dados foram expressados como média \pm desvio padrão. As taxas de fecundação foram transformadas em raiz de arco-seno (ZAR, 1996). As diferenças entre as taxas de fecundação foram testadas pela ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados e Discussão

Neste estudo, foram revelados aspectos básicos da espermatologia e da inseminação artificial de *Mugil liza*. A caracterização do volume do sêmen e da motilidade, tempo de motilidade e densidade espermáticas, que sofrem ampla variação individual (Dreanno et al., 1998) e podem refletir na relação espermatozoides:oócito (Rurangwa, 2004), foi um pré-requisito para obter uma condição de inseminação mais adequada.

Os gametas usados neste estudo foram obtidos de 13 machos e 3 fêmeas, capturados próximo ao oceano, em uma única operação realizada no mês de junho, no clímax da atividade reprodutiva de *M. liza* na região sul do Estado de São Paulo (Andrade-Talmelli et al., 1996). O procedimento propiciou o acesso a um extrato da população, o mais homogêneo com relação ao estado de maturação gonadal e ao tamanho dos machos e das fêmeas. Apesar de alguns fatores responsáveis pela variabilidade do sêmen permanecerem desconhecidos (Bobe & Labbé, 2010), o reflexo da assincronia reprodutiva no sucesso da fecundação (Mylonas et al., 2009) e das funções biológicas da variação do tamanho dos reprodutores (Rurangwa et al., 2004) e da fase da estação reprodutiva (Butts et al., 2010) na qualidade dos gametas está bem definida em peixes.

O sêmen usado na caracterização dos parâmetros foi colhido de 10 machos. As médias (\pm DP) do comprimento e do peso corporais foram, respectivamente, $405,3 \pm 39,12$ mm e $887,8 \pm 98,30$ g (Tabela 1), evidenciando um lote de indivíduos relativamente homogêneo com relação ao tamanho. É provável que essa condição seja uma explicação razoável para as moderadas variações observadas, à exceção do volume do sêmen, nas amplitudes da motilidade, tempo de motilidade e densidade espermáticas.

O sêmen extruído apresentou variação intra-específica marcadamente ampla com relação ao volume, com o mais alto, 6,0 mL, equivalendo ao dobro do menor, 2,9 mL (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros corporais e espermáticos dos machos de *Mugil liza*

Macho nº	Comprimento total (mm)	Peso corporal (g)	Características Espermáticas			
			Volume de sêmen (mL)	Concentração ($\times 10^{10}$ céls.mL ⁻¹)	Motilidade (%)	Tempo de motilidade (s)
1	385	790	5,7	3,630	100	489
2	452	950	6,0	3,634	100	452
3	435	960	3,5	4,067	95	451
4	430	980	3,5	5,351	100	460
5	385	810	2,9	5,080	95	452
6	444	995	3,9	4,915	100	455
7	425	985	5,4	5,121	100	462
8	396	888	4,3	3,942	100	457
9	325	751	4,3	4,541	95	462
10	376	769	4,6	5,110	100	445
Média	405,3	887,8	4,4	4,487	98,9	458
± DP	± 39,12	± 98,30	± 1,02	± 0,75	± 2,16	± 12

O uso de seringas, para a sucção dos ejaculados diretamente do poro urogenital, foi positivo para separar o conteúdo eventualmente contaminado com a urina presente durante a colheita. Ampla variação no volume também foi constatada, em procedimentos semelhantes de coleta, no robalo-peva *Centropomus parallelus* (Tiba et al., 2009), entre 0,8 e 2,4 mL; em machos invertidos da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Sanches et al., 2008), 0,13 e 0,48 mL; na abrótea *Merluccius merluccius* (Cosson et al., 2008), 1,0 e 6,2 mL. Presumivelmente, as flutuações do volume em peixes podem ser explanada pela eliminação de pequenas quantidades do sêmen, não aferidas, contaminadas aleatoriamente com a urina e fezes dos machos durante a extrusão. A média do volume obtido em *M. liza* foi, respectivamente, 2 vezes superior à media de *C. parallelus* (Tiba et al., 2009), de 1,9 mL e 10 vezes à verificada em machos invertidos de *E. marginatus* (Sanches et al., 2008) e de *Liza abu* (Şahinöz et al., 2008),

de 0,4 mL. Isoladamente, o volume do sêmen colhido é impreciso enquanto estimador isolado da capacidade de fecundação dos espermatozoides de qualquer espécie. Neste estudo, entretanto, quando foi associado com a densidade dos espermatozoides viáveis por unidade de volume dos ejaculados, constituiu um excelente avaliador do potencial de fecundação do sêmen de *M. liza*.

A densidade espermática observada em amostras do sêmen dos 10 machos de *M. liza*, variou entre 3,63 e 5,35 ($\times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹) com média (\pm DP) de 4,48 $\pm 0,75 \times 10^{10}$ (espermatozoides.mL⁻¹) (Tabela 1). A amplitude de variação situou-se dentro dos limites compilados para a maioria dos peixes marinhos (Rana et al., 1996). A densidade média, neste estudo, foi semelhante à da tainha *Mugil cephalus* (Chao et al., 1975), mas mantém relações de proporcionalidade diversas com outras espécies. Por exemplo, a média de *M. liza* foi quase 2 vezes superior à do robalo-peva *Centropomus parallelus* (Tiba et al., 2009), de 4 vezes à do linguado-brasileiro *Paralichthys orbignyanus* (Lanes et al., 2008), e de 10 vezes à do bacalhau-do-Atlântico *Gadus morhua* (Butts et al., 2009), para a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Spedicato et al., 1995; Sanches et al., 2008 e 2009). Com relação ao robalo-europeu *Dicentrarchus labrax* (Fauvel et al., 1999), a densidade celular média do sêmen da tainha pode ser considerada ligeiramente superior, em aproximadamente 1,5 vezes ou fortemente inferior, na ordem de 10 vezes menor (Felip et al., 2008). Discrepâncias interessantes ficaram evidenciadas também com relação ao do linguado-do-Atlântico *Hippoglossus hippoglossus*, ora mostrando-se 15 vezes menos denso (Tvedt et al., 2001), ora 4 mais denso (Ottesen et al., 2009).

Apesar da densidade espermática se constituir em um fator apropriado para revelar o número de espermatozoides em suspensão por unidade de volume do sêmen e calcular as doses inseminantes (Mocé & Graham, 2006), altas densidades nem sempre

são preditivas de motilidade (Geffen & Evans, 2000; Williot et al., 2000) e duração de sobrevivência elevadas.

Em *M. liza*, os exames prévios do sêmen em seguida a colheita e antes da adição do meio ativador, revelaram estado de quiescência dos espermatozóides. Após a ativação, os valores situaram-se entre limites próximos e elevados, entre 95 e 100% (Tabela 1). Índices médios próximos ao do *M. liza* ($98,9 \pm 2,16\%$) foram encontrados no esperma do peixe-balão *Thamnaconus septentrionalis* (Kang et al., 2004), no vermelho *Lutjanus campechanus* (Riley et al., 2004) e, mais recentemente, no robalo-peva *Centropomus parallelus* (Tiba et al., 2009) e em machos selvagem e invertidos da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Sanches et al., 2008). Com referência aos outros mugilídeos, *M. liza* foi superior aos 80% de *M. cephalus* (Chao et al., 1975), e aos 54,25% de *L. Abu* (Şahinöz et al., 2008). Outros teleósteos marinhos, incluindo o bacalhau-do-Atlântico *Gadus morhua* (Rouxel et al., 2008; Butts et al., 2009; 2010), o linguado *Solea senegalensis* (Beirão et al., 2009), o robalo-europeu *Dicentrarchus labrax* (Fauvel et al., 1999) e o robalo-flexa *Centropomus undecimalis* (Tiersch et al., 2004), geralmente têm apresentado porcentagens <80%.

Para a duração da motilidade de *M. liza*, a variação obtida foi de 445 a 489 s, com média de $458,15 \pm 12,02$ s (Tabela 1). Esta variação foi mais modesta do que as verificadas em *L. abu* (Şahinöz et al., 2008), $330,15 \pm 37,92$ s; *G. morhua* (Cosson et al., 2008), 7–800 s; *C. parallelus* (Tiba et al., 2009) $464,60 \pm 47,56$ s e machos invertidos de *E. marginatus* (Sanches et al., 2008), 3060 ± 600 s. Segundo Rurangwa et al. (2004) variações intra e inter-específicas são em grande parte devido à característica subjetiva dos exames qualitativos, propondo o uso de métodos quantitativos, mais eficazes para caracterizar o sêmen. No entanto, outros fatores têm sido reconhecidos como implicados na variação, destacando a idade, condição nutricional dos machos e a

época da extrusão durante a estação reprodutiva (Isquierdo et al., 2001; Bobe & Labbé, 2010).

Os dados dos parâmetros examinados, neste estudo, foram considerados representativos das condições de qualidade do sêmen dos outros 3 machos usados exclusivamente no cruzamento com as fêmeas. O critério teve a finalidade de disponibilizar os ejaculados destes indivíduos para a fecundação, tão logo fosse terminada a colheita, evitando que a estocagem do sêmen *in vitro*, pelo período de tempo gasto com a caracterização prévia, prejudicasse a capacidade de fecundação dos espermatozóides.

A inseminação artificial dos lotes de oócitos das 3 fêmeas de *M. liza* revelou, neste estudo, um efeito significativo ($F_{(0,05),6,120} = 2,18, P < 0,01$) da concentração dos espermatozóides no sucesso da fecundação, indicando que o número de espermatozóides liberados durante os eventos da desova configura um forte preditivo do sucesso reprodutivo dos machos (Ball & Parker, 1996). Os resultados das fecundações realizadas indicaram, no geral, que o sucesso da fecundação evoluiu significativamente da taxa de $14,18 \pm 3,56\%$, na densidade $2,5 \times 10^4$, para $97,29 \pm 3,46\%$, na densidade $2,0 \times 10^5$ espermatozóides (Figura 1). No entanto, a exposição dos oócitos a um número amplamente maior de espermatozóides ($4,0 \times 10^5$ a $1,6 \times 10^6$), não foi seguida de aumento no sucesso da fecundação. Essa relação entre a fecundação e o número de espermatozóides, corrobora o modelo de dinâmica da fecundação empiricamente observado a partir de muitas espécies com fecundação externa (Casselman et al., 2006; Butts et al., 2009), que pressupõe um elevado retorno no investimento dos machos na densidade dos gametas ejaculados por indivíduo, que decai à medida que aumenta a quantidade dos oócitos fecundados (Ball & Parker, 1996).

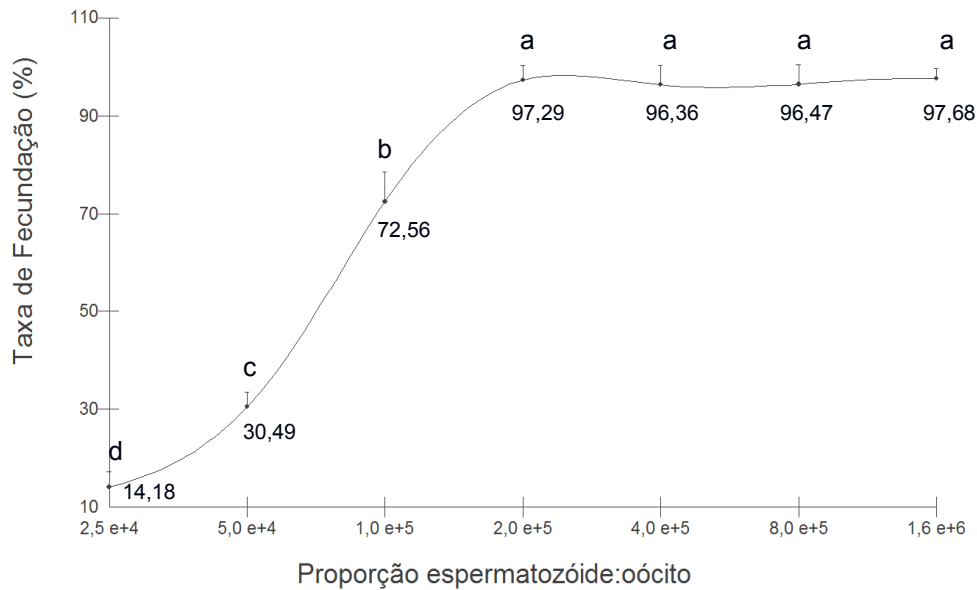


Figura 1. Linha de tendência da capacidade de fecundação (%) do sêmen fresco de *Mugil liza*, em relação à proporção espermatozói:de:ócito

^{a-d} Médias com diferentes letras para cada proporção espermatozói:de:ócito são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$)

Por exemplo, quadruplicando a densidade de espermatozói:de:de: de $2,5 \times 10^4$ para $1,0 \times 10^5$, a porcentagem da fecundação quintuplicou, de $14,18 \pm 3,56\%$ para $72,56 \pm 3,46\%$. Desse patamar de fecundação, que equivale a 3/4 do total dos oócitos inseminados, a evolução na porcentagem de fecundação diminuiu, progredindo de $72,56 \pm 3,46\%$ para $97,29 \pm 3,46\%$, 1/4 dos oócitos, enquanto que a densidade de espermatozói:de:de: foi duplicada (de $1,0 \times 10^5$ para $2,0 \times 10^5$). Nas proporções espermatozói:de:de: subsequentes ($4,0 \times 10^5:1$; $8,0 \times 10^5:1$ e $1,6 \times 10^6:1$), as taxas de fecundação não sofreram variações significativas. Esse modelo de configuração da fecundação foi identificado em muitos peixes sob condições controladas de inseminação artificial (Suquet et al., 1995; Casselman et al., 2006; Butts et al., 2009; Tiba et al., 2009). Desvios incomuns dessa tendência, observadas no bagre-africano *Clarias gariepus* (Rurangwa et al., 1998) e no dourado *Salminus brasiliensis* (Sanches et al.,

2009), com taxas descendentes de fecundação em resposta ao incremento da proporção espermatozoides/oócito, podem ser atribuídas ao suposto bloqueio mecânico do canal da micrópila sugerido em função do excesso de espermatozoides (Rosenthal et al., 1988).

Neste estudo, o significado biológico da proporção $2,0 \times 10^5:1$ em *M. liza*, pode ser interpretado como a quantidade mínima necessária de espermatozoides para se obter o máximo sucesso da fecundação. Esta necessidade com relação à fecundação é diversa entre as espécies marinhas. Por exemplo, enquanto para *Scophthalmus maximus* (Suquet et al., 1995) foram necessários 6×10^3 para alcançar o sucesso máximo da fecundação, para *G. morhua* (Butts et al., 2009) foram necessários 1×10^5 . Certamente, inseminações em *M. liza*, usando quantidades intermediárias de espermatozoides entre $1,0 \times 10^5$ e $2,0 \times 10^5$, poderiam revelar a necessidade de uma densidade menor. Variações interespecíficas na densidade têm sido identificadas como uma resposta biológica à diversidade dos padrões reprodutivos (Butts et al., 2009), qualidade dos gametas e condições de inseminação (Suquet et al., 1995; Chereguini et al., 1999).

As elevadas taxas de fecundação observadas neste estudo, ao redor de 100%, também foram observadas em estudos anteriores com a mesma espécie (Godinho et al., 1993). O controle do número de espermatozoides na inseminação foi fundamental para otimizar as taxas de fecundação e pode ser usado futuramente como uma referência para investigar a influência de outros componentes da inseminação artificial, como o tempo de contato entre os gametas (Butts et al., 2009) e as variantes “seco” e “úmido” de fecundação (Mylonas et al., 2009), além dos fatores relacionados com a viabilidade dos gametas femininos (Bobe & Labbé, 2010).

Conclusões

1- Em condições controladas de inseminação artificial, o desempenho reprodutivo dos machos de *Mugil liza* depende da densidade de espermatozóides viáveis liberados, sendo $2,0 \times 10^5$ por oócito, a proporção mínima necessária para otimização da fecundação.

2- As variáveis volume, densidade, motilidade e tempo de motilidade espermáticos analisados foram considerados representativos das condições de qualidade do sêmen

Referências

- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y. et al. Características reprodutivas de tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae), da região estuarino lagunar de Cananéia, São Paulo. **Revista Ceres**, v.43, n.246, p.165-185, 1996.
- BALL, M.A.; PARKER, G.A. Sperm competition games: external fertilization and “adaptive” infertility. **Journal of Theoretical Biology**, v.180, p.141–150, 1996.
- BEIRÃO, J.; SOARES, F.; HERRÉZ, M.P. et al. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. **Theriogenology**, v.72, p.1251–1261, 2009.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.535–548, 2010.
- BUTTS, I.A.E.; TRIPPEL, E.A.; LITVAK, M.K. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. **Aquaculture**, v.286, p.89–94, 2009.
- BUTTS, I.A.E.; LITVAK, M.K.; TRIPPEL, E.A. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Theriogenology**, v.73, p.873–885, 2010.
- CASSELMAN, S.J.; SCHULTE-HOSTEDDE, A.I.; MONTGOMERIE, R. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). **Canadian Journal of Fishery Aquatic Science**, v.63, p.2119-2125, 2006.
- CHAO, N.H.; CHEN, H.P.; LIAO, I.C. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. **Aquaculture**, v.5, p.389-406, 1975.
- CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I.G.; RASINES, I. et al. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, v.30, p.319-324, 1999.
- COSSON, J.; GROISON, A.L.; SUQUET, M. et al. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.460-486, 2008.
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYERES, E. et al. Effect of urine on semen quality in Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v.169, p.247–262, 1998.
- FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C. et al. Characteristics of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, v.54, p.356-369, 1999.
- FELIP, A.; ZANUY, S.; MURIACH, B. et al. Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. **Aquaculture**, v.275, p.347–355, 2008.

- GEFFEN, A.J.; EVANS, J.P. Sperm traits and fertilization success of male and sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.182, p.61-72, 2000.
- GODINHO, H.M.; DIAS, E.R. de A.; JACOBSEN, O. et al. Reprodução induzida de tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836, da região de Cananéia, São Paulo, Brasil (25° 21'). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., 1984, São Carlos. **Anais...**São Carlos: Sociedade Brasileira de Aquicultura, 1984. p.661-667.
- GODINHO, H.M.; KAVAMOTO, E.T.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. et al. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GÜNTHER, 1980, in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.20, p.59-66, 1993.
- GODINHO, H.M. Tainha. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. de C. (Eds.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p.433-444.
- ISQUIERDO, M.S.; HERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v.197, p.25-42, 2001.
- KANG, K.H.; KHO, K.H.; CHEN, Z.T. et al. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunther, 1877) sperm. **Aquaculture Research**, v.35, p.1429-1433, 2004.
- LANES, C.F.C; OKAMOTO, M.; CAVALCANTI, P.V. et al. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. **Aquaculture**, v.275, p.361-365, 2008.
- LEE, C.S.; OSTROWSKI, A.C. Current status of marine finfish larviculture in the United States. **Aquaculture**, v.200, p.89-109, 2001.
- MENEZES, N.A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. Na old taxonomic dilemma: the identify of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, v.2519, p.59-68, 2010.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.84, p.826-833, 2006.
- MOUSA, M.A. Induced spawning and embryonic development of *Liza ramada* reared in freshwater ponds. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.115-122, 2010.
- MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, n.3, p.516-534, 2009.
- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley, 1994. 600p.

- OTTESEN, O.H.; BABIAK, I.; DAHLE, G. Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) **Aquaculture**, v.286, p.240-245, 2009.
- RANA, K.J. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Ed.) **Broodstock management and egg and larval quality**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1996. p.53-75.
- RILEY, K.L.; HOLLADAY, C.G.; CHESNEY, E.J. et al. Cryopreservation of sperm of red snapper. **Aquaculture**, v.238, p.183-194, 2004.
- ROSENTHAL, H.; KLUMPP, D.; WILLFÜHR, J. Influence of sperm density and contact time on herring egg fertilization. **Journal of Applied Ichthyology**, v.4, p.79-86, 1988.
- ROUXEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. et al. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. **Aquaculture Research**, v.39, p.434-440, 2008.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G. et al. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.402-413, 1998.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28, 2004.
- SAHINÖZ, E.; ARAL, F.; DOGU, Z. Determination of spermatological properties of male *Liza abu* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Sanhurfa. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.34, p.71-76, 2008.
- SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2091-2098, 2009.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Bioikos**, v.22, n.2, p.81-90, 2008.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.198-209, 2009.
- SPEDICATO, M.T.; LEMBO, G.; Di MARCO, P. et al. Preliminary results in breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Cashiers Options Mediterranee**, v. 16 n.1, p.131-148, 1995.

- SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J. et al. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, v.133, p.83-90, 1995.
- TIBA, R.M.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. et al. Diluentes e proporções sêmen:diluyente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.35, n.1, p.99-110, 2009.
- TIERSCH, T.R.; WAYMAN, W.R.; SKAPURA, D.P. et al. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Aquaculture Research**, v.35, p.278-288, 2004.
- TVEDT, H.B.; BENFEY, T.J.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J. et al. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. **Aquaculture**, v.194, p.191-200, 2001.
- 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**, v.189, p.53-61, 2000.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 3.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 662p.

CAPÍTULO 2.

Inseminação artificial da tainha *Mugil liza* com sêmen criopreservado

Ricardo Igi Otsubo¹, Idili da Rocha Oliveira², Pedro Carlos da Silva
Serralheiro²

¹ Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca, Instituto de Pesca (APTA/SAA). Av. Francisco Matarazzo, 455, CEP 05001-900, São Paulo, SP

² Instituto de Pesca (APTA/SAA), Cananéia, SP. e-mail: idili@pesca.sp.gov.br

RESUMO – Neste estudo foi avaliado o número de espermatozoides necessários para fecundar com sucesso oócitos da tainha *Mugil Liza*, em condições de inseminação artificial, usando sêmen criopreservado em diferentes concentrações do crioprotetor dimetil sulfoxido (Me₂SO ou DMSO). Sêmen previamente diluído (1:3; v/v) e equilibrado (60 segundos) em meios crioprotetores (Ringer marinho, pH 8,2, combinado com 5,0, 7,5 ou 10% de dimetil sulfoxido), foi aspirado em palhetas criogênicas (0,5 mL), resfriado a -196 °C, em vapor de nitrogênio a 67 °Cmin⁻¹, e estocado em nitrogênio líquido. As proporções de espermatozoides:oócito testadas variaram entre 2,5×10⁴:1 e 1,6×10⁶:1. Para cada proporção, foram inseminados cinco lotes contendo 10³ oócitos viáveis (réplicas), provenientes de fêmeas induzidas para desova com hCG (60 UI.g⁻¹ de peso). As taxas de fecundação foram estimadas após 16 horas de incubação. O sêmen criopreservado na solução crioprotetora 7,5%, mostrou-se o mais efetivo na preservação das características seminais, proporcionando índices de motilidade (81,7 ± 5,7%) relativamente próximos aos do sêmen fresco (97,00 ± 4,83%). As taxas máximas de fecundação (97,8 ± 2,48%) foram obtidas a partir da proporção 8,0×10⁵:1 espermatozoide:oócito, indicando que esta concentração é a mínima necessária para o sucesso da inseminação. Para o sêmen fresco taxas similares foram registradas em proporção inferior (2,0×10⁵:1). O benefício mais relevante referiu-se ao prolongamento da longevidade (810 ± 12,7 s), quase o dobro da apresentada pelo sêmen fresco (455,8 ± 15,46 s), indicando que períodos de exposição maiores que 60 segundos podem resultar em incremento do sucesso da fecundação.

Palavras-chave: aquicultura, espermatozoide, fecundação, Mugilidae, reprodução

Sperm cryopreservation of the mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836)

ABSTRACT – In the artificial insemination protocol developed for the mullet *Mugil liza*, it has been investigated how density variation of cryopreserved semen influences the reproductive success of male in different concentrations of dimethyl sulfoxide cryoprotector (Me₂SO or DMSO). Previously diluted (1:3; v/v) and equilibrated (60 seconds) semen in cryoprotecting media (sea Ringer, pH 8.2, combined with 5,0, 7.5 or 10% dimethyl sulfoxide) was aspirated in cryogenic straws (0.5 mL), cooled at – 196 °C in nitrogen vapor at 67 °Cmin⁻¹, and stored in liquid nitrogen. Sperm:egg ratios tested varied between 2.5×10⁴:1 and 1.6×10⁶:1. For each ratio, five batches with 10³ viable eggs (replicates) from females induced to spawning with hCG (60 UI.g⁻¹ of weight) were inseminated. Fertilization rates were estimated after 16 hours of incubation. Cryopreserved semen in 7.5% cryoprotecting solution was more effective in preserving sperm characteristics allowing motility indices (81.7 ± 5.7%) relatively close to those of fresh semen (97.00 ± 4.83%). Maximum fecundation rates (97.8 ± 2.48%) were obtained as from 8,0×10⁵:1 ratio, indicating that this is the minimum necessary concentration for a successful insemination. For fresh semen, similar rates were observed with lower ratio (2.0×10⁵:1). Most relevant benefit was longevity prolongation (810 ± 12.7 s), almost twice that observed with fresh semen (455.8 ± 15.46 s), indicating that exposure periods longer than 60 seconds may result in further fertilization success.

Keywords: aquaculture, fertilization, Mugilidae, reproduction, sperm

Introdução

Em estudo recente, as tainhas distribuídas ao longo da costa do Atlântico da América do Sul e do Caribe, foram taxonomicamente consideradas como *Mugil liza* Valenciennes, 1836 (Menezes et al., 2010) e isso implica englobar, à *M. liza*, os limites de distribuição geográfica atribuídas anteriormente à *M. platanus* Günther, 1880.

No Brasil, a tainha está associada historicamente à subsistência e à cultura de comunidades de pescadores artesanais em regiões costeiras (Reis & D’Incao, 2000).

Reconhecida pelo valor culinário da carne, o maior valor da tainha está em suas gônadas maduras, que alcançam altos preços no mercado internacional (Ferreira, 2006). Em anos recentes, em face do aumento das capturas dirigidas para as populações adultas em migração reprodutiva, os estoques regionais de tainhas vêm diminuindo acentuadamente, cogitando-se a sua criação em cativeiro (IBAMA, 2007). Sobrepondo-se ao tamanho dos demais mugilídeos da América do Sul e Caribe, exibem considerável crescimento em cativeiro, com taxas similares ao do *Chanos chanos*, principal espécie eurihalina criada mundialmente (Alvarez-Lajonchère & Molejón, 2001).

Nos últimos 30 anos, informações foram obtidas sobre a aquicultura da tainha, tanto no Brasil como em outros países latino-americanos, incluindo crescimento (Scorvo-Filho et al., 1992; Okamoto et al., 2006), policultivo (Scorvo-Filho et al., 1995; Costa et al., 2008; Sampaio, 2008) e, principalmente, controle da reprodução e larvicultura (Alvaréz-Lajonchère et al., 1988, 1991; Godinho et al., 1993; Galvão et al., 1997; Monteiro-Ribas & Bonecker, 2001; Albieri & Araújo, 2010).

A despeito desses avanços, a produção de larvas ainda é totalmente dependente do uso de reprodutores selvagens capturados durante a estação reprodutiva. Porém, os adultos maduros capturados apresentam desproporção temporal entre os sexos, com curtos períodos de sobreposição entre fêmeas e machos (Andrade-Talmelli et al., 1996). Esse cenário, especialmente negativo para a aquicultura visto que um grande número das fêmeas maduras deixam de ser fecundadas pela falta do sêmen, tem sido contornado com sucesso usando sêmen crioconservado (Suquet et al., 2000; Chao & Liao, 2001; Tiersch, 2001).

O presente estudo foi elaborado para determinar o número de espermatozóides requisitados para fecundar com sucesso oócitos da tainha *Mugil liza* em condições de

inseminação artificial, usando sêmen criopreservado, em diferentes concentrações do crioprotetor dimetil sulfoxido.

Material e Métodos

Machos de *M. liza*, exibindo sêmen na papila urogenital sob leve pressão abdominal, e fêmeas, com abdome e papila urogenital dilatados, foram capturados em cercos-fixos, instalados no estuário de Cananéia (SP) durante a estação reprodutiva da espécie. Após o transporte ao laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul (NPDL), do Instituto de Pesca-APTA-SAA, os peixes foram mantidos em sistema de tanques com fluxo contínuo de água marinha (33) e temperatura 22 °C. Os procedimentos de remoção dos gametas, avaliação das características espermáticas (volume, motilidade, tempo de motilidade e densidade do sêmen) e fecundação foram realizados em ambiente com temperatura controlada de 22 °C.

O sêmen removido de 3 machos, individualmente, foi aspirado dentro de seringas (1mL) e separado em tubos de polietileno (15 mL), mantidos ao abrigo da luz dentro de caixa térmica. A região genital externa foi secada com papel absorvente e as porções do ejaculado, com vestígios de contaminação por urina, foram descartadas. Duas amostras do sêmen (15 µL) de cada macho foram separadas. Uma delas foi depositada em lâmina, para a checagem da auto-ativação dos espermatozoides em microscópio (400×) e, a outra, depositada em um frasco para a determinação da densidade espermática. As amostras negativas para motilidade foram ativadas com água marinha natural esterilizada (33), na proporção 1:1 (v/v; sêmen:água marinha), para o exame da motilidade e do tempo de motilidade. A mistura foi homogeneizada com lamínula, usada depois como cobertura do preparado. A motilidade e o tempo de motilidade foram examinados na mesma amostra. A motilidade foi expressada como percentual das células móveis no total das visualizadas e a duração, em segundos, foi cronometrada do

início da adição do meio ativador ao término dos movimentos de deslocamento. Os valores obtidos referiram-se às células distribuídas na área de um único campo, focalizado aleatoriamente, e com a intensidade de luz incidente mantida inalterada.

A densidade espermática foi determinada em hemocitômetro de Neubauer Improved, sob microscópio óptico (200×). O sêmen de cada macho foi diluído a 1:10.000 em solução de água marinha com formaldeído a 5%, em duas etapas (Tiba et al., 2009). A densidade celular determinada para cada macho, referiu-se à média de três contagens (réplicas).

Antes do congelamento, o sêmen fresco de cada macho foi fracionado inicialmente em volumes iguais. Um, foi separado para a avaliação das características do sêmen e para a determinação do número mínimo de espermatozóides do sêmen fresco necessários para fecundar um oócito; o outro, foi fracionado em três alíquotas iguais em volume e, cada uma diluída 1:3 (v/v; sêmen:dilúente+crioprotetor) em solução de Ringer modificado (em mM: NaCl, 135,01; KCl, 15,96; CaCl₂, 1,36; MgCl₂, 3,56; NaH₂PO₄, 0,58; NaHCO₃, 9,99; pH 8,2) (Tiba et al., 2009) suplementado com 5, 7,5 ou 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO). Após o tempo de equilíbrio de 60 segundos, o sêmen de cada combinação (dilúente+crioprotetor) foi envasado em palhetas (IVP) (5 palhetas por macho, com 0,5 mL cada), colocadas para congelar diretamente em container de vapor de nitrogênio (-196°C; Taylor-Wharton, CP 100) por 30 minutos. Em seguida, as palhetas foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido. Outras três palhetas de cada combinação, com sensores termopar (Ética Equipamentos Científicos, 521.200) introduzidos diretamente em contato com o sêmen, foram congeladas para monitorar a velocidade de congelamento, entre 22 °C, temperatura inicial, e -196 °C. O efeito da solução crioprotetora na motilidade e no tempo de motilidade foi inspecionado antes do congelamento, em amostras (15 µL)

visualizadas sob microscópio (400×). A efetividade dos tratamentos após o descongelamento foi conferida através da determinação da motilidade, tempo de motilidade e determinação da taxa de fecundação. O descongelamento do sêmen foi feito após 24 horas, por imersão das palhetas em água a 22 °C, durante 2 minutos. A motilidade e sua duração foram examinadas como descrito anteriormente para o sêmen fresco e, a fecundação, inseminando oócitos com diferentes densidades de espermatozóides.

Na fecundação, oócitos de 6 fêmeas exibindo sinais de ovulação, em resposta ao tratamento com gonadotrofina coriônica humana (Godinho et al., 1993), foram extruídos diretamente em placas de Petri e fecundados, individualmente, com o sêmen fresco e crioconservado dos respectivos sêmens (3 machos). Volumes fixos de oócitos (1,62 mL), previamente aferidos para conter aproximadamente 1.000 oócitos de *M. liza*, separados aleatoriamente de cada fêmea, com o auxílio de seringas de polietileno (3 mL) e cânulas adaptadas na ponteira, foram depositados no fundo de recipientes de policarbonato cônicos opacos (50 mL). Com micro-seringas (10 e 50 µL), volumes do sêmen fresco e do crioconservado, equivalentes a sete densidades de espermatozóides (expressadas nas proporções: $2,5 \times 10^4$; $5,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $2,0 \times 10^5$; $4,0 \times 10^5$; $8,0 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^6$ espermatozóides:oócito), foram colocados sobre os oócitos. Para a determinação dos volumes, foi considerada a densidade dos espermatozóides viáveis do sêmen apresentado pelos machos antes do congelamento. Em seguida à homogeneização do sêmen aos oócitos, foi adicionada 0,5 mL de água marinha estéril (33) para ativar a motilidade. Após o tempo de contato entre os gametas de 60 segundos, o excesso de espermatozóides foi retirado por meio de 4 trocas sucessivas de água. Após a última, os oócitos foram transferidos para recipientes contendo 350 mL de água marinha e deixados para incubar por 16 horas, sendo então fixados em solução de água

marinha natural (33) esterilizada e formaldeído a 5% (v/v). O percentual da fecundação foi determinado examinando 300 células, em 5 réplicas. Foram identificados como fecundados, aqueles em estágio de mórula. No total, foram realizados 315 cruzamentos para as 3 fêmeas e sêmen criopreservado de 3 machos (7 proporções espermatozoides:oócito × 9 sêmens criopreservados × 5 réplicas) e 105 cruzamentos para as outras 3 fêmeas com sêmen fresco de 3 machos (7 proporções x 5 réplicas x 3 sêmens frescos) .

Os valores em porcentagem da motilidade e da fecundação foram transformados em raiz quadrada de arco-seno (Zar, 1996). ANOVA foi usada para comparar os efeitos da concentração do crioprotetor sobre a motilidade espermática, tempo de motilidade espermática e taxa de fecundação. Diferenças foram consideradas significativas a $P < 0,05$. Teste de Tuckey foi usado quando as diferenças foram significativas.

Resultados e Discussão

Em populações selvagens de tainha *Mugil liza*, capturadas no interior de estuários durante a estação de reprodução, tem sido reportado que a proporção sexual entre os adultos maduros sempre se inclina para um dos sexos, com a predominância sexual alternando-se à medida que a estação evolui (Andrade-Talmelli et al., 1996; Albieri & Araújo, 2010). Esse fato tem afetado invariavelmente o desempenho das rotinas de inseminação artificial para gerar larvas de tainha. Em espécies com semelhante comportamento reprodutivo, muitos pesquisadores usando sêmen criopreservado têm logrado êxito nas tentativas de estender artificialmente o período de reprodução (Kopeika et al., 2007). Em *M. liza*, somente agora foi possível comprovar esse benefício.

Entretanto, para que o sêmen criopreservado significasse um avanço na inseminação artificial de *M. liza*, foi necessário testar a sua qualidade em termos de retorno no sucesso da fecundação. Todos os testes de congelamento e de fecundação foram conduzidos em uma única estação reprodutiva, durante os curtos períodos de sobreposição de machos e fêmeas maduros.

Os machos e fêmeas usados, neste estudo, foram capturados em meados do mês de julho, período de maior incidência temporal de ambos dentro do estuário de Cananéia, SP (Andrade-Talmelli et al., 1996). Ambos foram selecionados para serem os mais homogêneos com relação ao tamanho corporal, critério que atendeu as necessidades de minimizar o efeito biológico potencial desse fator na variação da qualidade e quantidade dos gametas. As médias (\pm DP) do peso e comprimento dos exemplares, como também dos parâmetros seminais examinados, estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados biométricos e características seminais de *Mugil liza*

Dados	Média \pm DP
Peso dos machos (g), (N=3)	641,4 \pm 43,59
Peso das fêmeas (g), (N=6)	1356 \pm 67,52
Comprimento total dos machos (mm)	270,3 \pm 32,1
Comprimento total das fêmeas (mm)	300,33 \pm 15,01
Volume do sêmen liberado por macho (mL)	4,6 \pm 0,6
Densidade espermática (espermatozoides $\times 10^{10}$. mL ⁻¹)	4,53 \pm 0,53
Motilidade espermática (%)	97,00 \pm 4,83
Tempo de motilidade espermática (s)	455,8 \pm 15,46

A magnitude dos dados observados para o volume do sêmen colhido, motilidade, tempo de motilidade e densidade espermáticos, relativamente elevada considerando a

maioria das espécies dióicas de peixes marinhos compiladas por Tripel (2003), pode ser a tática reprodutiva dos machos, necessária para o sucesso na fecundação do alto número de oócitos liberados de uma única vez pelas fêmeas. Essa hipótese é reforçada pela alta fecundidade absoluta estimada para *M. liza*, entre 55×10^4 a 365×10^4 oócitos (Romagosa et al., 2000; Albieri & Araújo, 2010).

A motilidade espermática do sêmen da tainha examinada em seguida à colheita, revelou que os espermatozóides são imóveis no plasma seminal. Entretanto, altas taxas de motilidade ($97,00 \pm 4,83\%$) foram observadas, microscopicamente, em seguida a adição de água marinha 33 (Tabela 1). Estado de quiescência dos espermatozóides nos dutos espermáticos tem sido reportado em todas as espécies marinhas de fecundação externa investigadas (Morisawa et al., 1993; Koldras et al., 1996; Cosson et al., 2008). Para esses autores, apesar de funcionalmente aptos, a condição de motilidade celular só é adquirida após a liberação do sêmen em meios aquáticos com adequada hipertonicidade.

O exame da motilidade realizado no sêmen, 60 s após a mistura de cada uma das 3 soluções crio-protetoras (diluente+crioprotetor), revelou motilidade prematura, de $7,5 \pm 2,75\%$, no sêmen diluído na solução DMSO 10% (Figura 1). O fato desse efeito ter sido constatado somente no sêmen combinado com o diluente de maior concentração de DMSO, indica que a participação desta substância na variação da pressão osmótica do meio proporcionou o sinal necessário para que alguns espermatozóides fossem ativados. Em muitos estudos com peixes marinhos, a sensibilidade osmótica dos espermatozóides tem sido considerada como um importante sinal para a ativação da motilidade (Tanaka et al., 2002; Cosson, 2004).

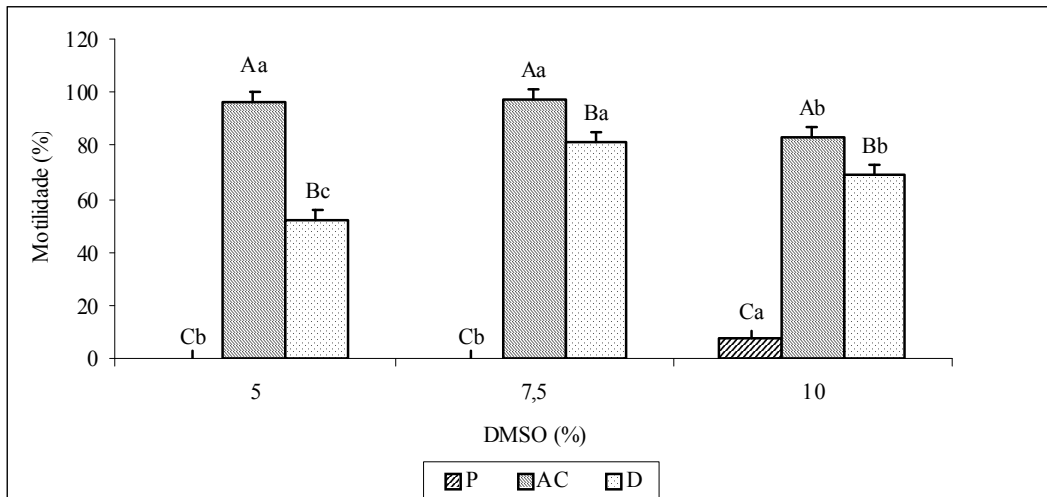


Figura 1 - Motilidade do sêmen da tainha *Mugil liza* em diferentes concentrações de DMSO

^{A-C} Médias com diferentes letras para a mesma concentração de DMSO são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$)

^{a-c} Médias com diferentes letras são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

[Onde, P = ativação prematura; AC = Antes do Congelamento e D = Após descongelamento]

A motilidade aferida após a ativação, realizada sob as mesmas condições usadas para o sêmen fresco, ficou reduzida para $83,33 \pm 5,77\%$, mostrando-se significativamente inferior ($F_{(0,05), 1, 10} = 4,96$, $P < 0,01$) em relação ao sêmen não diluído ($97,00 \pm 4,83\%$). Essa diferença era esperada como reflexo da solução crioprotetora na desestabilização do estado de quiescência de uns poucos espermatozóides. Apesar da maioria dos estudos sobre crioconservação em peixes marinhos não determinarem a influência da concentração do DMSO, é conhecido que a maioria dos espermatozóides de peixes marinhos iniciam a motilidade em meios hipertônicos (Cosson, 2004). Nas outras duas combinações de diluente- DMSO (5 e 7,5%), a motilidade após a ativação, respectivamente de $96,67 \pm 2,89\%$ e $97,50 \pm 4,18\%$, similares à do sêmen fresco, corrobora a informação anterior que indicou ausência de efeito negativo dessas soluções na estabilidade do sêmen.

Neste estudo, diferentes tempos de motilidade pré-congelamento foram registrados para todas as situações de exposição do sêmen às soluções crio-protetoras (Figura 2).

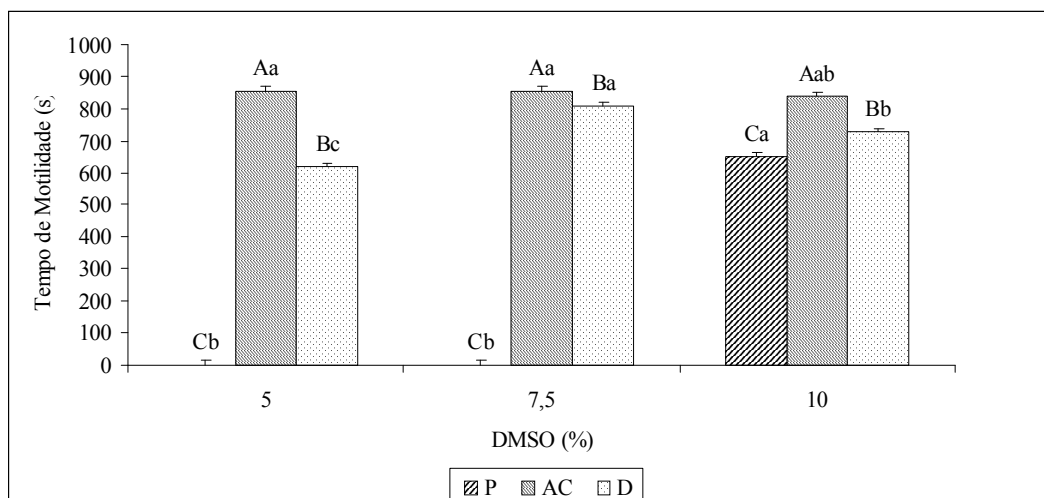


Figura 2 - Tempo de motilidade do sêmen da tainha *Mugil liza* em diferentes concentrações de DMSO

^{A-C} Médias com diferentes letras em cada uma das concentrações de DMSO, são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$)

^{a-c} Médias com diferentes letras nas três concentrações de DMSO, são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$)

[onde P = ativação prematura; AC = Antes do Congelamento e D = Após descongelamento]

No sêmen diluído na crio-solução com 10% do dimetilsulfóxido, os espermatozóides ativados prematuramente permaneceram ativos por $651,7 \pm 13,7$ s, tempo significativamente inferior ao observado após a ativação ($837,2 \pm 12,3$ s). Nas concentrações 5 e 7,5% do crio-protetor, os tempos foram similares entre si, respectivamente $855,5 \pm 9,0$ s e $854,8 \pm 14,7$ s. Esses valores foram significativamente superiores ($F_{(0,05), 2, 15} = 3,68$, $P < 0,01$) ao do sêmen fresco ($455,8 \pm 15,46$ s).

Esse efeito surpreendente em termos de potencialização da longevidade dos espermatozóides, que não é inédito em peixes (Cosson, 2004), pode ser explanado pela habilidade do meio artificial em modificar as características iniciais do fluido seminal que, supostamente, estão direta ou indiretamente envolvidas com a regulação da motilidade, principalmente, constituintes químicos, pH e osmolalidade (Lin and Randall, 1993; Pastor-Soler et al., 2003; Nakajima et al., 2005; Cosson et al., 2008; Ingermann et al., 2008; Alavi et al., 2009). Essa qualidade do diluente de promover o

alongamento do tempo de motilidade, revelada previamente no sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Sanches et al., 2008) e do robalo-peva *Centropomus parallelus* (Tiba et al., 2009), levou-nos a selecioná-lo para congelar o sêmen da tainha.

No sêmen crioconservado, altas taxas de motilidade foram observadas somente no sêmen diluído na crio-solução com dimetil sulfoxido 7,5%, 24 h após o congelamento (Figura 1). A motilidade de $81,67 \pm 5,77\%$ foi significativamente maior ($F_{(0,05) 2, 15} = 3,68$, $P < 0,01$) que na concentração 5% ($51,67 \pm 2,89\%$) e 10% ($69,17 \pm 3,76\%$). Em todas as amostras a motilidade revelou-se menor quando comparada ao sêmen fresco. Em outros teleósteos marinhos, a concentração de DMSO requisitada para reter a motilidade do sêmen pós-congelamento é diversa e específica para cada espécie. Por exemplo, na dourada *Spaurus aurata*, na garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* e no vermelho *Lutjanus argentimaculatus* a concentração de 5% foi a mais efetiva comparada com concentrações maiores (Fabbrocini et al., 2000; Sanches et al., 2008; Vuthiphandchai et al., 2009), enquanto que, na enguia-européia *Anguilla anguilla* e no robalo-peva *Centropomus parallelus*, foi reportada como mais efetiva a concentração de 10% (Garzón et al., 2008; Tiba et al., 2009).

A maior longevidade dos espermatozoides ($810,0 \pm 12,7$ s) foi observada na concentração do crioprotetor 7,5%, seguida de $728,2 \pm 11,3$ s e $618,2 \pm 9,6$ s, respectivamente, nas concentrações 10% e 5% (Figura 2). Esses tempos mostraram-se significativamente inferiores ($F_{(0,05) 2, 15} = 3,68$, $P < 0,01$) aos observados nas diluições correspondentes, antes do congelamento: de $837,2 \pm 12,3$ s (DMSO-10%), $854,8 \pm 14,7$ s (7,5%) e $855,5 \pm 9,0$ s (5%), porém, mais elevadas que o sêmen fresco ($455,8 \pm 15,46$ s). Apesar das diferenças entre os valores do tempo de motilidade antes e após o congelamento, os resultados evidenciam a efetividade do protocolo de congelamento

usado, neste estudo, na recuperação da longevidade dos espermatozóides. Resultados semelhantes com o mesmo diluente, foram reportados para o sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Sanches et al., 2008) e do robalo-peva *Centropomus parallelus* (Tiba et al., 2009) e, presumivelmente, estão relacionados com a constituição química do diluente, principalmente, o pH e a presença do bicarbonato de sódio. Em estudos com a enguia-européia *Anguilla anguilla*, tem sido sugerido que essa substância nos meios exerce um duplo papel, de inibição e de ativação de moléculas que têm participação efetiva no desencadeamento da motilidade (Tanaka et al., 2004). Nesse sentido, ainda tem sido proposto que o uso de meios, com características físico-químicas adequadas, podem prolongar o tempo de vida e incrementar a motilidade do sêmen (Ohta & Izawa 1996; Tanaka et al., 2002).

O processo de resfriamento artificial dos espermatozóides de peixes induz severos danos celulares, incluindo modificações na organização das proteínas e lipídeos da membrana, levando à perda do estado de fluidez e, em consequência, comprometimento de uma das funções essenciais da membrana, que é permitir a troca de íons e água entre o meio externo e o citoplasma (Müller, 2008). Desregulação do mecanismo de fosforilação das proteínas do axonema tem sido reportado comprometendo a motilidade (Zilli et al., 2008). O dimetil sulfóxido, isoladamente ou associado a outras substâncias, tem sido o mais comumente usado para aumentar a resistência dos espermatozóides ao resfriamento intenso (Kopeika et al., 2007). A habilidade de proteção desta substância está associada com a prevenção da peroxidação de lipídeos, da perda da fluidez da membrana, da transição de fase dos lipídeos, da perda de componentes e da estabilidade das proteínas de membrana (De Leeuw et al., 1993; Watson & Morris, 1987). Mas entre seu papel protetor e sua ação tóxica, a sua concentração no diluidor tem sido um fator crítico. Por exemplo, no sêmen do *Morone saxatilis* foi evidenciado que a função

mitocondrial diminuiu significativamente em função do incremento da concentração (2,5; 5 ou 10%) (He & Woods III, 2004).

Em teleósteos, a densidade de espermatozóides é um forte componente de variação paternal no sucesso da fecundação (Butts et al., 2009) e, por essa razão, foi considerada para o desenvolvimento deste protocolo de inseminação. Apesar do largo uso da técnica de criopreservação, poucos esforços têm sido feitos para avaliar os efeitos da densidade na fecundação e, presumivelmente, em muitos estudos, o excesso de espermatozóides e de exposição entre gametas tenham interferido no julgamento da qualidade do sêmen.

Para a determinação do número mínimo de espermatozóides por oócito, neste estudo, o sêmen de cada macho, tanto o fresco como o criopreservado, foi cruzado individualmente com lotes de oócitos provenientes de três fêmeas (Figura 3). Nossos dados em *M. liza*, sugerem que o prejuízo causado pelos níveis de concentração do DMSO podem ser significativos para os gametas. Os resultados dos nossos experimentos indicaram que o sêmen após o descongelamento (2 minutos, temperatura de 22 °C) promoveu um efeito significativo no retorno do sucesso da fecundação em função do incremento da densidade dos espermatozóides. Relação semelhante foi descrita no linguado *Scophthalmus maximus* (Chen et al., 2004) testando 3 proporções espermatozóide:oócito, variando entre $1 \times 10^4:1$ e $5 \times 10^4:1$. Em contraste, nenhuma relação positiva da fecundação foi verificada no sêmen criopreservado da perca (*Lateolabrax japonicus*) usando 4 proporções, de $2 \times 10^5:1$ a $3,6 \times 10^5:1$ (Ji et al., 2004). Neste estudo, foi evidenciado, também, um efeito significativo da concentração do DMSO no sucesso da fecundação (Figura 3).

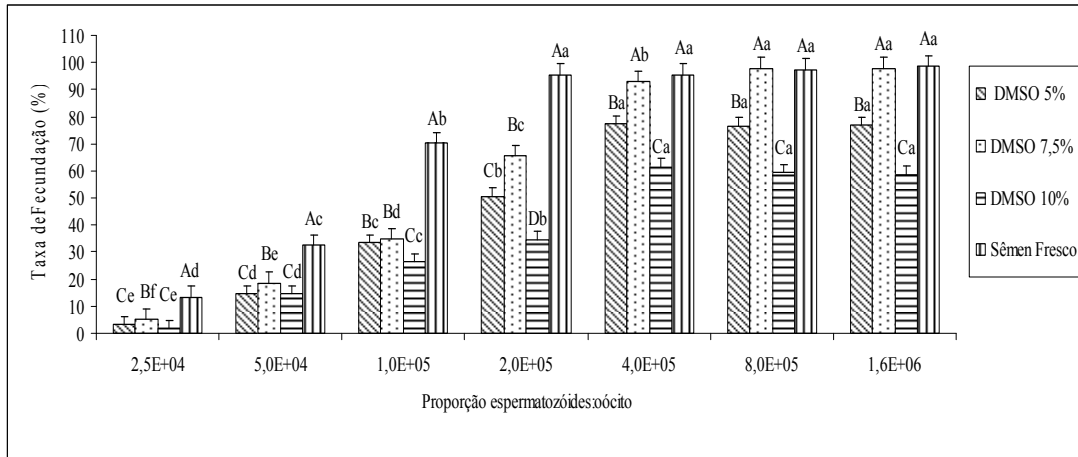


Figura 3 - Capacidade de fecundação (%) do sêmen fresco e crioconservado de *Mugil liza*, em relação a proporção espermatóide:oócito, em diferentes concentrações de DMSO

^{A-D} Médias das taxas de fecundação em cada proporção espermatóides:oócito com diferentes letras, são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$)

^{a-f} Médias com diferentes letras entre as proporções espermatóides:oócito e para cada concentração de DMSO são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$)

Na concentração 7,5%, o mínimo de espermatóides foi de $8,0 \times 10^5$, com taxas de fecundação de $97,82 \pm 2,48\%$, mostrando-se significativamente diferente ($F_{(0,05), 2, 40} = 3,23$, $P < 0,01$) das observadas em 5 e 10%, respectivamente, $77,33 \pm 2,6\%$ e $61,54 \pm 1,83\%$, na densidade de $4,0 \times 10^5:1$.

Os dados mostram que a habilidade de fecundação do sêmen crioconservado sofreu impacto considerável da concentração do DMSO no meio diluente. Em particular, indicam que a recuperação da capacidade de fecundação foi maior quando foi usada a concentração intermediária da amplitude experimental (7,5%), como os valores da motilidade prediziam. Em adição, as taxas de fecundação do sêmen foram verificadas com o sêmen no diluente-DMSO 10% (motilidade de $69,17 \pm 3,16\%$) mostraram-se menores comparadas com DMSO 5%, quando o contrário seria esperado pelo fato deste ter apresentado taxas de motilidade mais baixa ($51,67 \pm 2,89$). Essa discrepância é uma evidência que os oócitos, como os espermatóides, também podem ter sido injuriados pelo mesmo efeito de concentração do DMSO. Oócitos de várias espécies de salmão

suspensos em fluido ovariano contendo baixas concentrações de DMSO (1,7% e 3,5%) foram parcialmente colapsados, pelo efeito sugerido de estresse osmótico (Harvey et al., 1983).

Os resultados das inseminações com sêmen fresco e criopreservado, mostraram que a densidade dos espermatozoides teve um efeito significativo no sucesso da fecundação, como esperado, porém diversamente variável com respeito aos tipos de sêmen examinados. De um modo geral, as taxas de fecundação, que se revelaram baixas nas densidades iniciais, experimentaram uma forte evolução até atingirem um patamar máximo, após o qual não foram observadas variações ascendentes, mesmo quando esse comportamento poderia ser esperado em oócitos inseminados com densidades bem maiores. Inseminações de lotes de oócitos com ejaculados que não satisfaçam essa condição mínima de espermatozoides ativos por oócito, podem maximizar as fontes de variação da fecundação, diminuindo o sucesso reprodutivo dos machos.

O controle do número de espermatozoides na inseminação, fundamental para otimizar as taxas de fecundação, pode ser usado futuramente como uma referência para investigar a influência de outros componentes da inseminação artificial, como o tempo de contato entre os gametas e as variantes “seco” e “úmido” de fecundação, além dos fatores relacionados com a viabilidade dos gametas femininos.

Por outro lado, devido ao prolongamento do tempo de motilidade no sêmen criopreservado, presumimos que se os oócitos de *M. liza* permanecem viáveis para fecundação por períodos superiores a 60 s, taxas de fecundação superiores podem ser obtidas em densidades menores de espermatozoides, se tempos de exposição entre gametas, superiores ao fixado neste estudo (60 s), forem testados doravante nos protocolos de inseminação.

Conclusões

1- Na tainha *Mugil liza*, altas taxas de fecundação, ao redor de 98%, similares ao do sêmen fresco, podem ser obtidas na densidade 8×10^5 espermatozóides:oócito utilizando sêmen crioconservado em soluções iônicas com dimetil sulfóxido a 7,5%.

2- O prolongamento do tempo de motilidade no sêmen crioconservado, quase o dobro da apresentada pelo sêmen fresco, indicam que períodos de exposição maiores que 60 segundos podem resultar em incremento do sucesso da fecundação.

Referências

- ALAVI, S.M.H.; RODINA, M.; POLICAR, T. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.153, n.4, p.430-437, 2009.
- ALBIERI, R.J.; ARAÚJO, F.G. Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei:Mugilidae) in tropical Brazilian bay. **Zoologia**, v.27, n.3, p.331-340, 2010.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; BERDAYES ARRITOLA, J.; LAIZ AVERHOFF, O. et al. Positive results of induced spawning and larval rearing experiments with *Mugil liza* Val., a grey mullet from Cuban Waters. **Aquaculture**, v. 73, p. 349-355, 1988.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; HERNÁNDEZ MOLEJÓN, O.G. PÉREZ SÁNCHEZ, L. Production de juveniles de la lisa *Mugil liza* Valenciennes, 1836, por reproducción controlada en Cuba. **Ciências Marinas**, v.17, p. 47-56, 1991.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; HERNÁNDEZ MOLEJÓN, O.G. **Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p.12-13, 2001.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y. et al. Características reprodutivas de tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae), da região estuarino lagunar de Cananéia, São Paulo. **Revista Ceres**, v.43, n.246, p.165-185, 1996.
- BUTTS, I.A.E.; TRIPPEL, E.A.; LITVAK, M.K. The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. **Aquaculture**, v.286, p.89-94, 2009.
- CHAO, N.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189, 2001.
- CHEN, S.L.; JI, X.S.; YU, G.C. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. **Aquaculture**, v.236, p.547-556, 2004.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v.12, p.69-85, 2004.
- COSSON, J.; GROISON, A.L.; SUQUET, M. et al. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.460-486, 2008.
- COSTA, L. C.; NEVES, L. F. de M.; XAVIER, J. A. et al. Policultivo de tainha *Mugil platanus* com camarão *Litopenaues vannamei* em viveiros de terra no extremo sul

- do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 2008, Lavras, **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008.
- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G. et al. Effect of various cryoprotectants agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing, **Cryobiology**, v.30, p.32-44, 1993.
- FABBROCINI, A.; LAVADERA, S.L.; RISPOLI, S. et al. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p.46-53, 2000.
- FERREIRA, F. de A., **Desenvolvimento de produto tipo caviar a base de ovos de tainha (*Mugil platanus*)**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande.
- GALVÃO, M.S.N.; FENERICH-VERANI, N.; YAMANAKA, N. et al. Histologia do sistema digestivo da tainha *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, durante as fases larval e juvenil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, p.91- 100, 1997.
- GARZÓN, D. L.; PENÂRANDA, D. S.; PEREZ, L. et al. Effects of pH, Sodium Bicarbonate, Cryoprotectants and Foetal Bovine Serum on the Cryopreservation of European Eel Sperm. **Reproduction of Domestic Animal**, v.43, p.99-105, 2008.
- GODINHO, H.M.; KAVAMOTO, E.T.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. et al. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GÜNTHER, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.20, p.59-66, 1993.
- HARVEY, B.; STOSS, J.; BUTCHART, W. **Supercooled storage of salmonid ova**. Fisheries and Aquatic Sciences, n.22, 1983, p.10, (Canadian Technical report).
- HE, S.; WOODS III, L.C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, v.48, p.254-262, 2004.
- INGERMANN, R.L.; HOLCOMB, M.; ZUCCARELLI, M.D. et al. Initiation of motility by steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: membrane ion exchangers and pH sensitivity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 151, p.651-656, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Ordenamento da pesca da tainha (*Mugil platanus*, *M. liza*) na região Sudeste/Sul do Brasil**. Itajaí, SC, 2007, 85p, (Relatório de Reunião Técnica).
- Jl, X.S.; CHEN, S.L.; TIAN, Y.S. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. **Aquaculture**, v.241, p.517-528, 2004.

- KOLDRAS, M.; LOIR, M.; MAISSE, G. et al. Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Aquatic Living Resource**, v.9, n.4, p.337-345, 1996.
- KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J.; ZHANG, T. Cryopreservation of fish sperm. In: DAY, J.G.; STACEY, G.N. (ed) **Cryopreservation and Freeze-Drying protocols**. 2.ed. New Jersey: Totowa, 2007. p.203-218.
- LIN, H.; RANDALL, D.J. H⁺-ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue – inhibitor sensitivity and environmental and hormonal-regulation. **Journal of Experimental Biology**, v.180, p.163 -174, 1993.
- MENEZES, N.A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. Na old taxonomic dilemma: the identify of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, v.2519, p.59-68, 2010.
- MONTEIRO-RIBAS, W.M.; BONECKER, A.C.T. Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (VALENCIENNES, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). **Bulletin of Marine Science**, v.8, n.3, p. 427-433, 2001.
- MORISAWA, S.; ISHIDA, K.; OKUNO, M. Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm motility during migration from the sea to the river in chum salmon. **Molecular Reproduction and Development**. v.34, n.4, p.420-426, 1993.
- MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of reproduction**, v.78, p.390-399, 2008.
- NAKAJIMA, A.; MORITA, M.; TAKEMURA, A. et al. Increase in intracellular pH induces phosphorylation of axenomal proteins for activation of flagellar motility in starfish sperm. **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p.4411-4418, 2005.
- OHTA, H.; IZAWA, T.. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, v.142, p.107–118, 1996.
- OKAMOTO, M.H.; SAMPAIO, L.A.; MAÇADA, A.P. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1980. **Atlântica** v.28, p.61-66, 2006.
- PASTOR-SOLER, N.; BEAULIEU, V.; LITVIN, T.N. et al. Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. **Journal of Biology Chemistry**, v.278, p.49523–49529, 2003.
- REIS, E.G.; D'INCAO, F. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort to wards community-based management. **Ocean & Coastal Management**, v.43, p.585-595, 2000.

- ROMAGOSA, E.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; NARAHARA, M.Y. et al. Desova e fecundidade da tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Mugilidae) na região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil (25°01'S; 47°57'W), **Atlântica**, v.22, p.5-12, 2000.
- SAMPAIO, J. A. de O. **Desempenho de linguados *Paralichthys orbignyanus* em policultivo com tainhas *Mugil platanus* em viveiros de solo, no período de outono e inverno**. 2008. 33f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Bioikos**, v.22, n.2, p.81-90, 2008.
- SCORVO FILHO, J.D.; ALMEIDA DIAS, E.R de; AYROZA, L.M. da S. et al. Efeito da densidade sobre o desenvolvimento de alevinos da tainha listrada (*Mugil platanus*) em água doce. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.19, p.105 -109, 1992.
- SCORVO-FILHO, J.D.; AYROZA, L.M. da S.; COLHERINHAS NOVATO, P.F. et al. Efeito da densidade de estocagem sobre crescimento de tainha listrada (*Mugil platanus*) criada em mono e policultivo com carpa comum (*Cyprinus carpio*), na região do Vale do Ribeira. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.22, n.2, p.85-93, 1995.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v.31, p.231-243, 2000.
- TANAKA, S.; ZHANG, H.; HORIE, N. et al. Long term cryopreservation of sperm of Japanese eel. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.139-146, 2002.
- TANAKA, S.; UTOH, T.; YAMADA, Y. et al Role of sodium bicarbonate on the initiation of sperm motility in the Japanese eel. **Fishing Science**, v.70, p.780-787, 2004.
- TIBA, R.M.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. et al. Diluentes e proporções sêmen:diluyente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.35, n.1, p.99-110, 2009.
- TIERSCH, T.R. Cryopreservation in aquarium fishes. **Marine Biotechnology**, v.3, p.212-223, 2001.
- TRIPPEL, E.A. Estimation of male reproductive success of marine fishes. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v.33, p.81-113, 2003.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; CHOMPHUTHAWACH, S.; NIMRAT, S. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. **Theriogenology**, v.72, p.129-138, 2009.
- WATSON, P.F.; MORRIS, G.J. Cold shock injury in animal cells. **Society for Experimental Biology**, p.311-337, 1987.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; STORELLI, C.; VILELLA, S. Effect of cryopreservation on phosphorylation state of proteins involved in sperm motility initiation in sea bream. **Cryobiology**, v.57, p.150-155, 2008.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 3.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 662p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Face ao drástico declínio dos estoques naturais de peixes no mundo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos de conservação de gametas e sua aplicação no controle da reprodução das espécies.

O potencial de *Mugil liza* na aquicultura vem sendo objeto de muitos estudos, pelo reconhecido valor econômico e cultural da espécie. Porém, a assincronia sexual tem sido importante fonte de variação da fecundação de *Mugil liza*, em condições controladas de inseminação, indicando o uso de sêmen criopreservado.

A metodologia utilizada neste estudo foi adequada, pois permitiu que os objetivos fossem alcançados, determinando: 1. a íntima relação entre os parâmetros da qualidade do sêmen com o sucesso da fecundação; 2. as concentrações mínimas necessárias para obter o máximo sucesso na fecundação, de $2,0 \times 10^5$ espermatozoides:oócito utilizando sêmen fresco ($97,3 \pm 3,46\%$) e de $8,0 \times 10^5$ espermatozoides:oócito, com criopreservado ($97,8 \pm 2,48\%$); 3. a solução crioprotetora, dimetil sulfoxido, na concentração de 7,5%, mostrou ser a mais efetiva na preservação das características seminais.

Os resultados das inseminações com sêmen fresco e criopreservado, mostraram que a densidade dos espermatozoides teve um efeito significativo no sucesso da fecundação, como esperado, porém diversamente variável com respeito aos tipos de sêmen examinados. De um modo geral, as taxas de fecundação, que se revelaram baixas nas densidades iniciais, experimentaram uma forte evolução até atingirem um patamar máximo, após o qual não foram observadas variações ascendentes, mesmo quando esse comportamento poderia ser esperado em oócitos inseminados com densidades bem maiores. Inseminações de lotes de oócitos com ejaculados que não satisfaçam essa condição mínima de espermatozoides ativos por oócito, podem maximizar as fontes de variação da fecundação, diminuindo o sucesso reprodutivo dos machos.

O controle do número de espermatozóides na inseminação foi fundamental para otimizar as taxas de fecundação, podendo ser usado futuramente como uma referência para investigar a influência de outros componentes da inseminação artificial, como o tempo de contato entre os gametas e as variantes “seco” e “úmido” de fecundação, além dos fatores relacionados com a viabilidade dos gametas femininos.

O benefício mais relevante refere-se ao prolongamento do tempo de motilidade no sêmen criopreservado, cujos índices ($809,4 \pm 22,4$ s) foram quase o dobro do sêmen fresco ($455,8 \pm 15,46$ s). Presumindo que os oócitos de *M. liza* permaneçam viáveis para fecundação por períodos superiores a 60 s, pode-se prever que taxas de fecundação superiores poderiam ser logradas em densidades menores de espermatozóides, se tempos de exposição entre gametas, superiores ao fixado neste estudo (60 s), forem testados doravante nos protocolos de inseminação.