

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE MANEJO REPRODUTIVO COMO
SUBSÍDIOS PARA A IMPLANTAÇÃO DE UM PROGRAMA DE
MELHORAMENTO GENÉTICO DA TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) variedade chitralada NO CENTRO DE
PESQUISA EM AQUICULTURA-CPA/DNOCS**

ERIVÂNIA GOMES TEIXEIRA

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
AGOSTO/2007**

**ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE MANEJO REPRODUTIVO COMO
SUBSÍDIOS PARA A IMPLANTAÇÃO DE UM PROGRAMA DE
MELHORAMENTO GENÉTICO DA TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) variedade chitralada NO CENTRO DE
PESQUISA EM AQUICULTURA-CPA/DNOCS**

ERIVÂNIA GOMES TEIXEIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ COMO REQUISITO PARCIAL PARA
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA.**

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
AGOSTO/2007**

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Erivânia Gomes Teixeira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Prof. Dr. José Renato de Oliveira César
Orientador
Presidente

Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto
Conselheiro

Prof. Dr. Vicente Vieira Faria
Conselheiro

À minha querida mãe, fé e perseverança personificadas, e à memória do meu querido pai, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Renato César pela orientação e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho, nas mais diversas áreas de conhecimentos.

Ao Professor Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, pela força e estímulo neste trabalho, além de suas valiosas críticas e correções do trabalho.

Ao Professor Vicente Vieira Faria, por participar da banca examinadora e pela disponibilidade em contribuir na revisão desse trabalho.

A Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa – FUNCAP pelo o apoio concedido e pelo empenho que dedica ao desenvolvimento técnico-científico no Estado do Ceará.

Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS pela concessão de toda estrutura física, logística e laboratorial para execução desta pesquisa.

Ao Sr. Pedro Eymard, Chefe do Centro de Pesquisa em Aqüicultura CPA/DNOCS que permitiu o uso do Laboratório de Genética e toda estrutura necessária para realização desta pesquisa, e também por suas valiosas sugestões.

A Carlos Riedel Porto Carreiro, Pesquisador e responsável pelo Laboratório de Genética Molecular do DNOCS, por sua valiosa contribuição e participação.

A todos os colegas da Universidade Vale do Acaraú – UVA, Universidade Federal do Ceará – UFC, que formam a equipe do Laboratório de Genética Molecular do Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS e que me deram total apoio e um convívio amistoso.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS, pelo convívio harmonioso.

A meu esposo Paulo Coelho de Alcântara e toda minha família pela confiança, apoio e ajuda em todas as horas.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE TABELAS | xiv |
| 1 - INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Origem e distribuição geográfica das tilápias | 16 |
| 1.2. Classificação taxonômica da tilápia do Nilo | 18 |
| 1.3. Introdução da tilápia no Brasil | 19 |
| 1.4. Aqüicultura mundial e a importância econômica da tilapicultura..... | 20 |
| 1.5. Genética e biologia molecular aplicadas à aqüicultura | 23 |
| 1.6. Melhoramento genético | 26 |
| 2 – REVISÃO DA LITERATURA | 31 |
| 2.1. Processo de anestesia de peixes | 31 |
| 2.2. Métodos e tipos de marcação peixes | 32 |
| 2.3. Sexagem de peixes | 34 |
| 2.4. Caracteres morfométricos e merísticos | 35 |
| 2.5. Características do sêmen de peixes..... | 37 |
| 2.6. Criopreservação e resfriamento de sêmen | 38 |
| 2.7. Sistema de reprodução e crescimento em hapas | 40 |
| 2.8. Isolamento de DNA genômico de tecido sanguíneo..... | 42 |
| 3 – OBJETIVOS | 44 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 44 |
| 3.2. Objetivos específicos | 44 |

| | |
|--|----|
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 4.1. Protocolo de anestesia..... | 45 |
| 4.2. Protocolo de marcação..... | 47 |
| 4.3. Protocolo de amostragens de caracteres fenotípicos | 49 |
| 4.3.1. Sexagem..... | 49 |
| 4.3.2. Amostragem dos caracteres morfométricos e merísticos | 50 |
| 4.4. Teste de criopreservação de sêmen..... | 56 |
| 4.5. Resfriamento de sêmen..... | 59 |
| 4.6. Experimento de reprodução em Hapas | 60 |
| 4.7. Sistema de Incubadoras | 63 |
| 4.8. Hapas de crescimento e acompanhamento de alevinos | 65 |
| 4.9. Coleta de sangue para extração de DNA..... | 66 |
| 4.10. Extração de DNA | 69 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 71 |
| 5.1. Protocolo de anestesia..... | 71 |
| 5.2. Protocolo de marcação de tilápia..... | 73 |
| 5.3. Sexagem de tilápia | 75 |
| 5.4. Protocolo de amostragem dos caracteres morfométricos e merísticos..... | 76 |
| 5.4.1. Caracteres morfométricos dos reprodutores | 76 |
| 5.4.2. Caracteres fenotípicos observados em tilápias fêmeas | 78 |
| 5.4.3. Análise do sêmen de tilápia..... | 80 |
| 5.5. Teste de criopreservação de sêmen de tilápia | 83 |
| 5.6. Resfriamento do sêmen de tilápia | 85 |
| 5.7. Experimento de reprodução em hapas | 87 |

| | |
|---|-----|
| 5.8. Coleta de sangue e extração de DNA | 92 |
| 6 – CONCLUSÕES | 95 |
| 7 – TRABALHOS FUTUROS | 98 |
| 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 100 |

RESUMO

Tilápias são peixes da família Cichlidae de origem africana, com cerca de 22 espécies, cultivadas no mundo todo, sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a de maior preferência comercial. A primeira espécie de tilápia introduzida no Brasil foi a *Tilapia rendalli*, que foi seguida pela tilápia do Nilo (*O. niloticus*), que por apresentar boas qualidades para o cultivo foi disseminada por todo o país. Com o passar do tempo, pela falta de atenção científica e falta de programa de monitoramento genético, observou-se a gradativa perda de algumas características ideais de produtividade necessárias ao cultivo, o que levou à necessidade iminente da realização de um trabalho de melhoramento genético dos plantéis. Neste sentido, diversos programas de melhoramento genético da tilápia foram executados em vários países. Os objetivos do presente trabalho foram: testar e adaptar um conjunto de protocolos e métodos com aplicabilidade no manejo reprodutivo da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) variedade chitralada, e também propor metodologias para implantação de um programa de melhoramento genético da tilápia no Centro de Pesquisa em Aqüicultura-CPA/DNOCS baseado no sistema de reprodução em hapas. Foram testados e adaptados protocolos de anestesia, utilizando Eugenol; marcação através de inserção de etiqueta e amputação de um espinho da nadadeira dorsal; sexagem, testando duas classes de peso. Também foram testados e adaptados métodos de coleta de caracteres morfométricos (peso, comprimento e altura máxima do corpo) e caracteres merísticos (número de óvulos produzidos, motilidade espermática expressa em porcentagem e extração de DNA a partir de amostras de sangue). Foi realizado um experimento de reprodução em hapas utilizando a proporção de 1 macho para 2 fêmeas. Os protocolos e métodos testados e adaptados forneceram subsídios importantes para a futura implantação de um programa de melhoramento genético no Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS.

ABSTRACT

The Nile tilapia *Oreochromis niloticus* is the most cultured species from the Cichlidae family. Despite its natural occurrence in Africa, it has been introduced in many countries including Brasil. The lack of management strategies for keeping the genetic variability of broodstocks produced a gradual loss of traits of aquacultural interest, and has created an urgent demand for genetic improvement of the cultured stocks. The purpose of the present work was to test and adapt a set of methods for the reproductive management of Nile tilapia variety chitralada, as a means for the future implantation of a program for genetic improvement of this species in the Center of Aquaculture Research (CPA/DNOCS) in Pentecostes, Ceará, Brazil. Protocols tested included anesthesia using Eugenol, individual tagging, sex differentiation, and collection of both morphometric (body weight, length and height) and meristic (number of eggs; characterization, motility, and criopreservation of the sperm) data. In addition, a protocol for DNA extraction using CTAB reagent was tested with good results. One experiment of reproduction efficiency was carried out in cages enclosed in hapas, and the proportion of broodstocks used was one male to each two female. The overall results provided some meaningful pieces of information that will assist the implantation of a program of genetic improvement for tilapia at the CPA/DNOCS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Origem e locais de introdução das tilápias no mundo | 17 |
| Figura 2. Diagrama mostrando a seqüência das etapas do Programa de Melhoramento Genético de Tilápia Cultivada – GIFT | 29 |
| Figura 3. Hapas montadas em estruturas de madeira em formato retangular..... | 41 |
| Figura 4. Vista geral dos tanques de manejo e bancada de procedimentos do CPA/DNOCS em Pentecoste - CE..... | 46 |
| Figura 5. Método 1 de marcação: Detalhe do procedimento inserção da cânula na musculatura do peixe..... | 48 |
| Figura 6. Método 2 de marcação: amputação do espinho da nadadeira dorsal..... | 48 |
| Figura 7. Diferenciação anatômica externa de macho e fêmea de tilápia <i>O. niloticus</i> | 50 |
| Figura 8. Medição de tilápia usando ictiômetro confeccionado em madeira..... | 51 |
| Figura 9. Observação de ovos incubados na cavidade bucal de fêmea de tilápia..... | 53 |
| Figura 10. Pesagem de ovos de tilápia..... | 54 |
| Figura 11. Contagem de ovos de tilápia utilizando contador de placas bacterianas..... | 54 |
| Figura 12. Coleta de sêmen de tilápia <i>O. niloticus</i> | 55 |
| Figura 13. Observação da motilidade do sêmen de <i>O. niloticus</i> através de microscópio óptico..... | 56 |
| Figura 14. Tubo de microcentrífuga contendo sêmen de tilápia <i>O. niloticus</i> | 57 |
| Figura 15. Recipiente de nitrogênio líquido utilizado para criopreservação do sêmen de tilápia <i>O. niloticus</i> | 59 |
| Figura 16. Hapas de reprodução instalados em viveiro escavado no CPA/DNOCS em Pentecoste – CE..... | 62 |
| Figura 17. Tanques do tipo raceway utilizados no experimento..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Sistema de incubadoras utilizado no experimento..... | 64 |
| Figura 19. Tanque circular de alvenaria utilizado para estocagem de alevinos após a absorção do saco vitelino..... | 65 |
| Figura 20. Hapas utilizadas para criação de alevinos..... | 66 |
| Figura 21. Tilápias submetidos ao processo de anestesia utilizando o Eugenol..... | 68 |
| Figura 22. Coleta de sangue de tilápia <i>O. niloticus</i> para extração de DNA..... | 68 |
| Figura 23. Ácidos nucléicos precipitados por adição de isopropanol 100% resfriado..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Taxa de crescimento médio anual (%) da produção aquícola global por continente e por década, entre 1950 e 2004..... | 21 |
| Tabela 2. Principais áreas da genética aplicadas à piscicultura..... | 24 |
| Tabela 3. Critérios utilizados para codificação da maturidade sexual das fêmeas de tilápia do Nilo <i>O. niloticus</i> | 52 |
| Tabela 4. Proporções de sêmen e soluções diluidoras utilizadas no teste de resfriamento..... | 60 |
| Tabela 5. Seqüência de estágios de sedação de tilápia (<i>O. niloticus</i>) variedade chitralada submetidas ao efeito anestésico do Eugenol..... | 71 |
| Tabela 6. Número de peixes por classe de peso de acordo com o sexo..... | 75 |
| Tabela 7. Características morfométricas das tilápias (<i>O. niloticus</i>) variedade chitralada utilizadas no experimento de reprodução em hapas..... | 77 |
| Tabela 8. Número e peso de ovos produzidos por fêmea..... | 80 |
| Tabela 9. Taxa de motilidade, pH e volume de sêmen produzido por peixe..... | 81 |
| Tabela 10. Taxa de motilidade (%) pós-descongelamento e ativação de espermatozóides de tilápia (<i>O. niloticus</i>) criopreservados em quatro soluções diluidoras | 84 |
| Tabela 11. Taxa de motilidade de espermatozóides de tilápia (<i>O. niloticus</i>) pós-resfriados e observados em três diferentes intervalos de tempo utilizando NaCl como solução ativadora..... | 86 |
| Tabela 12. Descrição de produção, coleta de ovos e estocagem de larvas de tilápias..... | 90 |
| Tabela 13. Peso médio dos alevinos de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) variedade chitralada, estocadas nas hapas de crescimento durante 128 dias de cultivo, no Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS..... | 91 |
| Tabela 14. Peso médio dos alevinos, machos e fêmeas, de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) variedade chitralada, estocadas nas hapas de crescimento durante 128 dias de cultivo, no Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS..... | 92 |

| | |
|--|----|
| Tabela 15. Concentrações de DNA genômico das gerações de reprodutores de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) de 2002, 2005 e 2007 do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS..... | 93 |
|--|----|

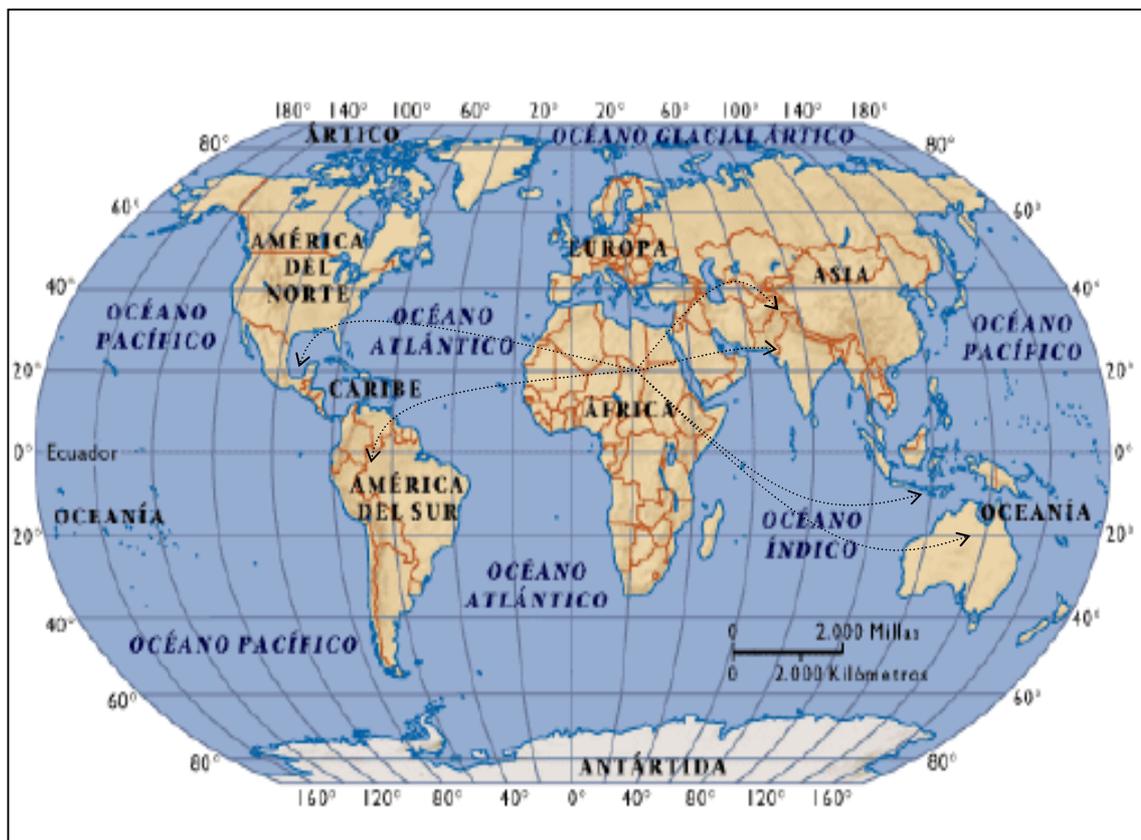
1. INTRODUÇÃO

1.1 – Origem e distribuição geográfica das tilápias

As tilápias são um grupo de peixes originários da África, pertencentes à família Cichlidae, que compreende cerca de 1200 espécies, das quais dezenas foram introduzidas em vários países do mundo (FIGURA 1), e encontram-se ocupando diversos nichos ecológicos (DEY & GUPTA, 2000; FRYER & ILES, 1972; KORNFELD, 1984). Cerca de 22 espécies de tilápias são cultivadas comercialmente no mundo, destacando-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia moçambicana (*O. mossambicus*), a tilápia azul (*O. aureus*), além de *O. macrochir*, *O. hornorum*, *O. galilaeus*, *Tilapia zillii* e a *T. rendalli*, como as espécies de maior preferência para o cultivo (EL-SAYED, 1999).

A disseminação das tilápias pelo mundo foi iniciada com o intuito de promover a criação de peixes para subsistência em países em desenvolvimento (LOVSHIN, 1997). Esta dispersão começou com a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) que foi a primeira espécie exportada em 1939 da África para a ilha de Java, na Indonésia. Porém, esta espécie mostrou-se com baixo desempenho para utilização na aquicultura (LAZARD & ROGNON, 1997). Entre os anos 1950 e 1960, a tilápia de Moçambique foi introduzida em vários países da América Central, América do Sul, Ilhas do Caribe, Sudeste da Ásia, Índia, Bangladesh, Paquistão e Austrália (LOVSHIN 1997). No entanto, o entusiasmo por essa cultura como fonte de alimento rapidamente diminuiu com o problema da superpopulação e precocidade reprodutiva em viveiros estocados com machos e fêmeas (POPMA & PHELPS, 1998).

Entretanto, no final dos anos 70, a espécie *Oreochromis niloticus* demonstrou alto potencial para a aquicultura, em vários sistemas de criação (LAZARD & ROGNON, 1997). Esta espécie se distribuiu originalmente desde o centro-sul da África até o norte da Síria (POPMA & PHELPS 1998). São peixes predominantemente de águas quentes, onde a temperatura pode variar de 20 a 30°C, embora possam tolerar temperaturas de aproximadamente 12°C (SWIFT, 1993).



Fonte: modificado de PANAMÁ MAPAS

FIGURA 1 – Origem e locais de introdução das tilápias no mundo.

1.2 – Classificação taxonômica da tilápia do Nilo

A classificação taxonômica da tilápia do Nilo, de acordo com FISHBASE (2007), é da seguinte forma:

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus*

No Brasil, as duas linhagens desta espécie, que são de grande importância, são a Bouaké e a Chitralada. A linhagem Bouaké é oriunda da Costa do Marfim enquanto que a linhagem Chitralada é proveniente da Tailândia, que importou do Japão um estoque de origem Egípcia. O plantel inicial foi domesticado e melhorado geneticamente nos viveiros do Palácio Real de Chitralada, em Bangkok, o que ocasionou a denominação tilápia chitralada (MOREIRA, 1999; KUBITZA, 2000).

A tilápia *Oreochromis niloticus* variedade chitralada, também conhecida como tilápia tailandesa é uma das variedades de tilápias mais cultivadas por apresentar características zootécnicas de grande interesse como, a forma do corpo arredondado, o reduzido tamanho da cabeça, o rendimento de carcaça superior e o desempenho maior quando comparadas com outras linhagens (ZIMMERMANN, 1999; AIT, 2003).

1.3 – Introdução da tilápia no Brasil

A primeira espécie de tilápia que chegou ao Brasil foi a *T. rendalli*, em 1952 (GURGEL, 1998). A tilápia do Nilo (*O. niloticus*) foi introduzida no Brasil, mais especificamente no Nordeste brasileiro, em 1971 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), que formou um pequeno plantel de reprodutores e suas sucessivas gerações foram utilizadas para peixamentos de açudes e cultivos. De acordo com LOVSHIN & CIRYNO (1998), esse peixe da linhagem Bouaké, proveniente da Costa do Marfim, oeste africano, foi distribuído pelo país, sendo cultivado desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande de Sul. Com o passar do tempo pôde-se observar que este peixe perdeu algumas características ideais necessárias em cultivos intensivos e super-intensivos, como o rápido crescimento e conversão alimentar satisfatória. Isto ocorreu principalmente devido a ausência de trabalhos relacionados com a seleção de indivíduos com excelente patrimônio genético (LIMA, 1999).

Com o objetivo de melhorar geneticamente o plantel de tilápias no Brasil, em 1996 foram importadas da Tailândia matrizes da linhagem chitralada, conhecida também como tailandesa. Estas matrizes foram doadas pelo Asian Institute of Technology (AIT) (ZIMMERMANN, 2000).

As tilápias representam um ótimo modelo experimental para realização de pesquisas na área de melhoramento genético pois reproduzem-se naturalmente em tanques e apresentam curto período entre as gerações com grande número de descendentes (POPMA & GREEN, 1990).

Em 2002, atentando para a insatisfação dos piscicultores nordestinos com os resultados obtidos na produção de tilápias, o Departamento Nacional

de Obras Contra as Secas (DNOCS) importou um lote de tilápias tailandesas da variedade chitralada para formar um plantel de reprodutores de boa qualidade genética. Além disso, houve a intenção de manter um banco germoplasma visando manter a qualidade da linhagem original importada da Tailândia para suprir os piscicultores do Nordeste do Brasil com garantia de qualidade (CAJADO, 2004).

1.4 – Aqüicultura mundial e a importância econômica da tilapicultura

A aqüicultura mundial cresceu muito nos últimos cinquenta anos, partindo de uma produção menor que 1 milhão de toneladas na década de 1950 para mais de 59,4 milhões de toneladas em 2004, crescendo a uma taxa média de 8% ao ano. Especialmente na América Latina e região do Caribe, as taxas de crescimento médio anuais foram as mais elevadas, da ordem de 21,3%, seguidos pelo Leste e Norte da África e África sub-Saara (FAO, 2006). A taxa média de crescimento da aqüicultura em cada continente é mostrada na TABELA 1.

O uso de espécies exóticas não é novidade na aqüicultura. Em 2004, América Latina e região do Caribe, mais de 65% da produção da aqüicultura, foi conseguido unicamente com espécies introduzidas. Isto inclui a grande produção de salmões, trutas, tilápias e carpas (FAO, 2006). A produção mundial de pescado oriunda da aqüicultura continental em 2004 foi da ordem de 25.751.633 toneladas sendo que desse total 1.495.744 toneladas foram de tilápias da espécie *O. niloticus* (FAOSTAT, 2004).

O Brasil possui um grande número de espécies nativas com potencial para exploração aquícola (OSTRENSKI *et al.*, 2000), porém, a falta de aporte

científico e tecnológico não permite a viabilidade econômica da utilização destas, o que faz com que as espécies exóticas predominem nos cultivos comerciais. Pelo menos 64 espécies exóticas vêm sendo utilizadas, comercial ou experimentalmente, pela aquicultura brasileira e dentre as espécies comercialmente cultivadas, a tilápia ocupa uma posição de destaque com uma produção de 67.850,5 toneladas em nosso país (OSTRENSKY *et al.*, 2000; IBAMA, 2007). Esta produção vem crescendo a cada ano, devido ao aumento na demanda do mercado interno e possibilidades de exportação para os Estados Unidos e outros países da Europa. Como resultado, o Brasil alcançou em 2004, a sétima colocação entre os 10 principais produtores mundiais de tilápia, com a produção de 69.078 toneladas (TACHIBANA *et al.*, 2004; FAO, 2006).

Tabela 1 – Taxa de crescimento médio anual (%) da produção aquícola global por continente e por década, entre 1950 e 2004.

| REGIÃO | 1950 | 1960 | 1970 | 1980 | 1990 | 2000 | 1950 |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | - | - | - | - | - | - | - |
| | 1960 | 1970 | 1980 | 1990 | 2000 | 2004 | 2004 |
| China | 27.6 | 4.0 | 7.5 | 11.6 | 15.1 | 6.2 | 12.4 |
| Ásia e região do Pacífico | 10.1 | 7.6 | 9.2 | 6.4 | 3.4 | 9.1 | 7.4 |
| Europa Ocidental | 4.3 | 6.1 | 4.4 | 5.5 | 5.6 | 2.0 | 4.9 |
| América Latina e Caribe | 16.2 | 21.1 | 37.0 | 23.3 | 14.2 | 11.4 | 21.3 |
| América do Norte | 5.2 | 4.8 | 0.0 | 7.6 | 5.0 | 6.5 | 4.7 |
| Leste e Norte da África | 8.7 | 2.8 | 14.5 | 11.7 | 17.7 | 9.2 | 10.8 |
| Europa Central e Oriental | 3.8 | 4.5 | 5.3 | 6.5 | 8.2 | 4.3 | 2.4 |
| África Sub-Saara | 19.8 | 5.9 | 5.2 | 10.2 | 13.1 | 9.9 | 10.7 |
| Total | 12.3 | 5.7 | 7.6 | 8.6 | 10.5 | 6.8 | 8.8 |

Fonte: FAO (2006).

As tilápias apresentam excelentes qualidades para o cultivo e atualmente estão entre os peixes mais cultivados do mundo, sendo superadas apenas pelas carpas. Sua rusticidade, crescimento rápido, pouca exigência tecnológica, alta prolificidade, desova durante todo o ano, boa conversão alimentar e excelentes sabor e textura são as principais características que as tornam interessante para a aqüicultura. Estas qualidades reunidas pela tilápia, somadas ao aprimoramento das tecnologias de manejo fez com que a tilapicultura alcançasse posição de destaque no ranking mundial da produção de pescado. Sua importância como fonte de proteína animal nos países subdesenvolvidos é amplamente reconhecida (McCONNELL *et al.*, 2000).

A tilápia (*O. niloticus*) é uma espécie que se adapta bem à superpopulação, tem reconhecido valor econômico e comercial, é bastante resistente a doenças e ao manejo e tem seu peso mínimo para obtenção de filés em torno de 400 g, que pode ser atingido com 4 meses de engorda (GRAEFF & AMARAL, 2004). Dentre as espécie de peixes mais cultivadas, a tilápia do Nilo é a que melhor resiste à altas temperaturas, a baixas concentrações de oxigênio dissolvido e a altas concentrações de amônia na água. As principais vantagens do cultivo da tilápia do Nilo são o seu baixo custo de alimentação, principalmente na fase de alevino, somados à boa qualidade da sua carne (LAHAV & RA'NAM, 1997).

A produção média anual de tilápias cultivadas no nosso Estado tem sido de aproximadamente 12 mil ton/ano, embora o cultivo com uso de tanques-rede tenha o potencial de elevar a produção anual para cerca de 200 mil

toneladas/ano caso a capacidade hídrica oferecida pelo Estado seja utilizada plenamente (SEAGRI, 2004).

Uma grande preocupação que devem ter os tilapicultores, é quanto à degradação do patrimônio genético dos estoques de tilápia do Nilo que já chegou a atingir níveis preocupantes, cerca de 35% em algumas desovas, transformando-se em assunto amplamente debatido em encontros e congressos e que incentivou os produtores a buscar a solução deste problema através da importação de alevinos. A preservação da qualidade genética dos reprodutores pode ser alcançada através da aplicação de ferramentas genéticas apropriadas (DNOCS, 2003; CAJADO, 2004). Segundo KOH *et al.* (1999), o manejo adequado e programas de seleção preservam a variabilidade genética e previne quanto à depressão endogâmica. O mesmo autor recomenda estas técnicas para larviculturas de tilápias no Brasil.

1.5 - Genética e biologia molecular aplicadas à aqüicultura

Atualmente várias técnicas de genética aplicada vêm sendo utilizadas na aqüicultura, principalmente na piscicultura, visando resultados econômicos superiores. As principais áreas envolvidas pela genética aplicada à piscicultura são: conservação genética, manipulação genética, monitoramento genético e manejo genético (TABELA 2).

A conservação genética utiliza análises citogenéticas e citológicas de gônadas, da gametogênese e dos gametas com o objetivo de detectar bancos genéticos e fazer a manutenção destes bancos de espécies nativas destinadas à piscicultura e à avaliação continuada dos riscos biológicos potenciais de

estoques de peixes geneticamente manipulados, sobre populações selvagens e cultivadas (TOLEDO-FILHO, 1998).

TABELA 2 - Principais áreas da genética aplicadas à piscicultura.

| ÁREAS | METODOLOGIAS | FINALIDADES |
|------------------------|--|--|
| Monitoramento Genético | Marcad. genéticos | Detecção de níveis de consangüinidade, heterozigose, semelhança genética, hibridação e introgressão. |
| Manejo Genético | Manejo dos reprodutores, dos cruzamentos e da fertilização. | Atenuação de efeitos da consangüinidade e do uso de poucos reprodutores. |
| Manipulação Genética | Clássicas: Seleção, hibridação, endogamia. Modernas: Biotecnologia e Engenharia Genética. | Obtenção de melhoramento genético, linhagens estéreis, monossexuais e hormonalmente revertidas. |
| Conservação Genética | Marcadores genéticos Testes de fertilidade Análise citogenética e/ou citológica de: gônadas, gametogênese e gametas. | Detecção de bancos genéticos selvagens Avaliação de riscos biológicos potenciais de estoques geneticamente manipulados. |

Fonte: Toledo-Filho, (1998).

Os maiores objetivos dos programas de conservação genética são a manutenção de altos níveis de variabilidade genética e baixos níveis de consangüinidade (SCHIAFFINO-MACHADO *et al.*, 2007). As recomendações para manutenção de uma população genética em geral são: evitar consangüinidade e manter a variação genética (HEDRICK & MILLER, 1992).

Populações de algumas espécies ameaçadas têm se tornado reduzidas por apresentarem baixas variações genética e variantes genéticas deletérias em alta frequência. (LAND *et al.*, 2001; WESTEMEIER *et al.*, 1998; MADSEN *et al.*, 1999; VILÁ *et al.*, 2003). Para evitar a extinção por deterioração genética, algumas populações podem se beneficiar da introdução de indivíduos de populações aparentadas ou subespécies para restauração genética, isto é, eliminação de variantes deletérias e restauração dos níveis normais de variação genética (HEDRICK, 2004).

A manipulação genética usa metodologias clássicas como a seleção, a hibridação e a endogamia e também metodologias modernas como a biotecnologia e a engenharia genética, destinadas ao aumento da produtividade e à obtenção de linhagens estéreis, monossexuais e hormonalmente revertidas (LIMA, 1999).

Os programas de manipulação clássica em piscicultura não atuam diretamente sobre o genótipo dos peixes. A primeira iniciativa de um programa de manipulação genética clássica consiste em definir o fenótipo que se pretende trabalhar e em seguida, tentar caracterizá-lo em qualitativamente e quantitativamente. Essa caracterização possibilita a análise e manipulação adequada para cada tipo. O monitoramento genético, através do uso de marcadores moleculares tem o objetivo de detectar os níveis de consangüinidade, heterozigose, similaridade genética, hibridação e introgressão em estoques de peixes, enquanto que o manejo genético procura atenuar os efeitos da consangüinidade e do uso de poucos reprodutores, através do manejo adequado dos reprodutores, dos cruzamentos e da fertilização (TOLEDO-FILHO, 1998).

Apesar dos efeitos negativos, a consangüinidade pode ser aplicada quando há interesse em aumentar a participação no estoque de um determinado reprodutor, ou na criação de linhagens endocruzadas que serão utilizadas para produzir híbridos F₁ de crescimento rápido, e também para a fixação de características externas (MOREIRA, 2001).

Diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüências de DNA, para a detecção de polimorfismos genéticos. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares localizados em todo o genoma do organismo. Estes marcadores podem ser utilizados para diversas aplicações, tais como a medição dos níveis de expressão genética e também para a seleção de linhagens com desempenho superior (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de utilização de marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é adequada para o monitoramento genético em peixes, o qual é utilizado em programas de seleção, para melhoria das produtividades (APPLEYARD & MATHER, 2000). Pode ser, portanto, uma boa ferramenta para o melhoramento genético na tilapicultura (POVH *et al.*, 2005).

1.6 – Melhoramento genético

Até recentemente, muitos cultivos de peixes coletavam ovos e alevinos diretamente da natureza, ou utilizavam desovas em cativeiro, com pouca ou nenhuma aplicação de manejo genético. A produção de alevinos em incubadoras e a habilidade para cultivar gerações sucessivas até a maturidade sexual, em escala comercial, começaram no século passado, na década de 70

para as carpas Chinesa e Indiana e nas décadas de 80 e 90, respectivamente, para camarões peneídeos e milkfish (*Chanos chanos*). O primeiro Simpósio Internacional de Genética em Aqüicultura do Mundo foi realizado em 1982 (ASIAN DEVELOPMENT BANK, 2005).

Atualmente existem várias programas de melhoramento genético da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Dentre estes, podemos citar: (a) "GIFT" ou Genetic Improvement of Farmed Tilapia, que consiste em um estoque desenvolvido através de combinações de espécies e seleções dentro da espécie, que engloba o GIFT-GST ou GIFT-Genomar Supreme Tilapia (EKNATH *et al.*, 1993; GJOEN, 2001); (b) GMT ou Genetically Male Tilapia, formado por um estoque de machos produzidos através de um processo de feminização, que pode ser obtido com uso de hormônios feninizantes, e teste de descendência (MAIR *et al.*, 1995; MAIR *et al.*, 1997); (c) FAST ou Freshwater Aquaculture Center-Selected Tilapia, um estoque desenvolvido através de seleção dentro da espécie (BOLIVAR & NEWKIRK, 2002); (d) GET-EXCEL ou Genetically Enhanced Tilapia, um cruzamento entre GIFT e um estoque FAST; e (e) SEAFDEC-selected do Southeast Asian Fisheries Development Center, um estoque desenvolvido através de seleção massal simples (BASIAO & DOYLE, 1999). Animais oriundos dos programas GIFT-GST e GMT estão atualmente disseminados pelo mundo enquanto os demais programas estão sendo aplicados na aqüicultura Filipina (ROMANA-EGUIA *et al.*, 2005).

Um programa de melhoramento genético envolve praticamente as quatro principais áreas da genética aplicadas à aqüicultura, principalmente quando a espécie de interesse é exótica. MATHER (2001) afirmou que o nível de caracterização e o padrão de diversidade genética nas populações de tilápias

representam importantes recursos para o melhoramento do cultivo desta espécie. De acordo com MELO *et al.* (2006), a variabilidade genética é fundamental para a implantação de programas de criação seletiva comerciais, que tenham como objetivo a produção de peixes de crescimento rápido, com melhores índices de conversão alimentar e resistência à doenças.

Quando não há controle dos grupos de acasalamento nos estoques, o eventual acasalamento entre indivíduos aparentados pode ocasionar a diminuição da variabilidade genética. Um bom manejo dos reprodutores, principalmente quando estes são em número reduzido colabora para atenuar os efeitos da consangüinidade indesejável (TOLEDO-FILHO, 1998).

Várias técnicas genéticas como a hibridação, a manipulação cromossômica, a tecnologia do macho YY, e a reprodução seletiva foram desenvolvidas visando o aumento da produtividade em espécies aquícolas, inclusive em tilápias. Com exceção da reprodução seletiva, estas tecnologias resultam somente em um ganho imediato, e não em um melhoramento continuado. A melhoria contínua de características relevantes requer um programa de reprodução seletiva onde o “pedigree” da geração de peixes é monitorado para aumentar a precisão da seleção e para restringir a endogamia (WORLD FISH CENTER, 2004).

O ICLARM (1998) desenvolveu um conjunto de metodologias, pesquisas e técnicas dentro do projeto GIFT (Genetic Improvement of Farmed Tilapia). Este projeto contou com uma estrutura composta por várias instalações: (a) recepção; (b) quarentena; (c) exame de caracteres morfométricos; (d) laboratórios; (e) reprodução; (f) berçários; e (g) crescimento (FIGURA 2).

Em 2002, o Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) importou da Tailândia um plantel de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) variedade chitralada, com a intenção de adaptar e implantar técnicas e metodologias do Projeto GIFT no Centro de Pesquisa em Aqüicultura (CPA/DNOCS) em Pentecoste - CE.

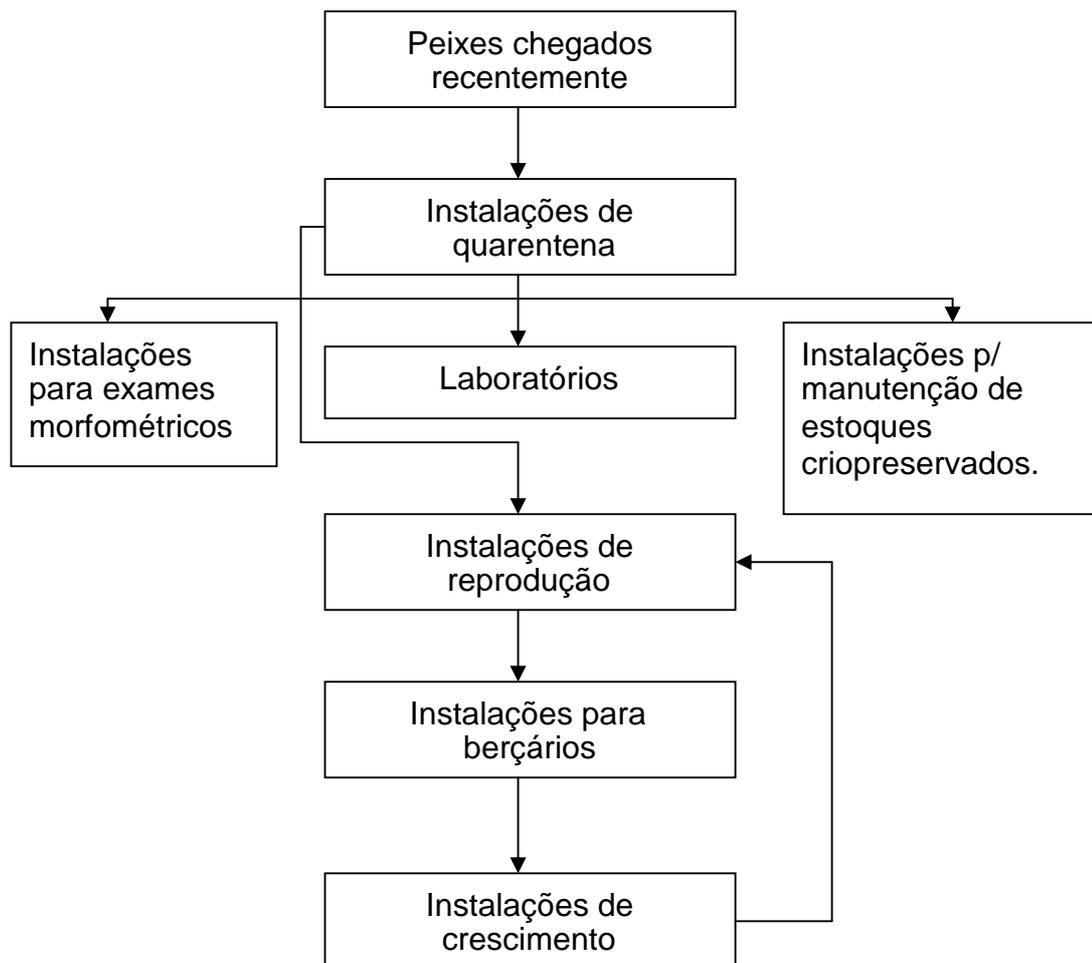


FIGURA 2 – Diagrama mostrando requerimentos de operações de instalações do Melhoramento Genético de Tilápia Cultivada - GIFT.

Fonte: Adaptado de ICLARM, (1998).

O Centro de Pesquisa em Aqüicultura (CPA/DNOCS), conta com uma estrutura composta por viveiros escavados, taques tipo “raceway” e tanques circulares de alvenaria, instalações de manejo e laboratório constituindo uma

composição básica semelhante às estruturas utilizadas pelo ICLARM para implantação do Projeto GIFT. Este projeto adota os seguintes protocolos: (a) anestesia, (b) marcação; (c) sexagem; (d) e coleta de caracteres morfométricos e merísticos, com metodologias específicas.

O presente trabalho tem o objetivo de testar e adaptar as metodologias citadas acima adequando-as à estrutura disponível no Centro de Pesquisa em Aqüicultura (CPA/DNOCS), em Pentecoste - CE .

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Processo de anestesia em peixes

Os procedimentos de captura e manejo dos peixes geralmente têm, fortes efeitos na fisiologia e comportamento destes animais e a anestesia pode ser usada para minimizar o estresse ou danos físicos causados por estes procedimentos (ROSS & ROSS, 1999). O procedimento de anestesia deve ser realizado de forma eficiente, tanto do ponto de vista biológico quanto econômico, isto é, sem causar prejuízos à sanidade dos animais nem tornar o procedimento oneroso. Para tanto, é necessário escolher produtos adequados às espécies, e quantidades ideais a serem aplicadas nas operações.

Em anos recentes, uma considerável quantidade de trabalhos foi realizada sobre o efeito de diferentes métodos de anestesia na fisiologia e comportamento de peixes (SAVENIJE *et al.*, 2002). A necessidade da descoberta de novos anestésicos que ofereçam custos reduzidos e segurança para os animais tem estimulado as investigações acerca de outros produtos (GUÉNETTE *et al.*, 2007).

Embora existam muitos produtos anestésicos utilizados na aquicultura, no Brasil os produtos mais utilizados são: MS-222 (Tricaína metano sulfonato), benzocaína (etil-p-aminobenzoato), quinaldina (2-4-metilquinolina), fenoxietanol e mentol (ROUBACH & GOMES, 2001). Embora estes produtos sejam muito eficientes, a maioria deles apresenta efeitos indesejáveis como acidificação da água, baixa solubilidade, reações irritante aos peixes e ao operador.

A tricaína metanosulfonato (Finquel, MS-222) é o único anestésico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration – Departamento de

Fiscalização de Alimentos e Medicamentos) para peixes comerciais nos Estados Unidos (HARPER, 2003). Recentemente tem sido mostrado que procedimentos de anestesia em peixes utilizando o MS-222, o eixo hipotálamo–pituitária–interno (HPI) é ativado e orientado para aumentar a concentração de cortisol, que é um indicador de condição de estresse (SMALL, 2003).

O eugenol (2-metox-4-(2-propenil) fenol) é o componente mais abundante (70–90% do peso) em óleo de cravo (*Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica*) e pode ser extraído do caule, flores e folhas (LEE & SHIBAMOTO, 2001; MARTINI *et al.*, 1996). Devido à sua eficácia, baixo preço e ausência de efeitos negativos para o consumidor, o eugenol tem sido considerado como um anestésico promissor para a indústria da aquicultura (HARPER, 2003). Peixes anestesiados com eugenol não apresentam aumento significativo na concentração de cortisol no sangue (SMALL, 2003; PALIĆ, 2006). O óleo de cravo tem sido utilizado como anestésico, com sucesso, em várias espécies como anestésico incluem: *Sparus auratus* (TORT *et al.*, 2002), *Oncorhynchus nerka* (WOODY *et al.*, 2002), *Salmo salar* (IVERSEN *et al.*, 2003), (*Bidyanus bidyanus*) (KILDEA *et al.*, 2003).

2.2 – Métodos e tipos de marcação de peixes

A marcação é uma estratégia importante tanto em estudos de melhoramento genético, em processos experimentais ou de produção em escala comercial, quanto em estudos de dinâmica de populações de peixes em ambientes naturais, pois através desta é possível estabelecer um histórico individual dos animais. Alguns fatores devem ser considerados na escolha da técnica de marcação: (1) efeitos sobre o comportamento, (2) a fisiologia e a sobrevivência dos indivíduos marcados, (3) a natureza e a duração da marca,

(4) a porção de tecido afetado, (5) se provoca um estresse momentâneo ou prolongado, (6) se após a marcação o animal terá riscos de infecção ou abscessos (FARIA *et al.*, 2003).

De acordo com ICLARM (1998), as marcações utilizadas em peixes incluem geralmente um dos seguintes procedimentos: (I) remoção de nadadeira ou espinho e (II) etiquetagem através da inserção, fixação ou injeção de um objeto dentro do corpo do peixe. Geralmente o processo de marcação é bastante traumático para o animal.

A inserção de etiquetas com miçangas ou identificadores coloridos na musculatura do peixe, transpassando de um lado a outro, acima da linha lateral e entre o sexto e sétimo espinho da nadadeira dorsal, é um método muito utilizado (LEBOUTE *et al.*, 2002). Segundo os mesmos autores, estão disponíveis no mercado marcas constituídas de material plástico ou metálico, de cores variadas, já enumeradas, os quais são fixados à musculatura dos animais através do disparo de um aplicador. Estas marcas externas têm boa durabilidade, embora possam ser perdidos.

Para utilizar a marcação através da extração da nadadeira pélvica deve-se, fazer um corte na base da mesma, estancar o sangramento e aplicar um desinfetante no local. A desvantagem desse método é que somente dois grupos poderiam ser marcados (ICLARM, 1998).

A extração do espinho da nadadeira dorsal é outro método fácil para a marcação individual dentro de um grupo reduzido. Cada reprodutor em potencial tem um único espinho ou combinação de espinhos removidos. Não é recomendada a retirada do primeiro espinho já que ele serve como um ponto

de referência para localização e identificação dos espinhos que foram removidos.

Como uma alternativa para a extração do espinho da nadadeira dorsal, as tilápias podem ser identificadas utilizando transmissores receptores passivos integrados (PIT- Passive Integrated Transponder), também conhecidos como “chips”, que são implantados na cavidade visceral do peixe, oferecendo uma identificação individual segura e permanente identificação individual. A leitura do chip é feita geralmente através do uso de um scanner eletrônico (WORLDFISH CENTER, 2004).

2.3 – Sexagem de peixe

As diferenças entre sexos foram definidas por Darwin (1871) como características anatômicas ou morfométricas que auxiliam na busca por parceiros durante a época do acasalamento. As principais características que distinguem machos e fêmeas são: primárias, secundárias e “ecológicas”. Os órgãos reprodutores são as diferenças sexuais primárias. As diferenças secundárias são aquelas que não estão relacionadas com os órgãos reprodutores e são geralmente expressas na morfologia externa do indivíduo e as diferenças ecológicas são as relacionadas a diferentes hábitos de vida (RAPP PY-DANIEL & COX FERNANDES, 2005).

Os peixes são organismos particularmente interessantes em estudos de dimorfismo sexual por causa dos muitos casos únicos de dimorfismo entres os sexos. Possivelmente, uma das categorias mais comuns de dimorfismo sexual em peixes é a variação no tamanho do corpo, sendo geralmente os machos maiores que fêmeas (NEAT *et al.*, 1998, FLETCHER, 1999), embora também

hajam exemplos de espécies com fêmeas ser maiores que machos (KONG *et al.*, 1998; BARAS, 1999). Variações na morfologia da cabeça também podem estar relacionadas ao sexo de uma espécie (HASTINGS, 1991; GRAMITTO & COEN 1997). Existem ainda, inúmeras outras estruturas que podem estar relacionadas com período reprodutivo ou com o dimorfismo sexual.

Em catfish (*Ictalurus punctatus*) os machos são de maior porte, com a cabeça mais larga e o poro urogenital menor e um pouco mais distante do ânus, enquanto que em lambari (*Astyanax* sp.), existe uma região rugosa típica, localizada na nadadeira peitoral, exclusivamente nos machos (BEERLI & LOGATO, 1997).

A diferenciação sexual em tilápias é facilmente executada quando a papila genital torna-se claramente diferenciada ou quando o peixe atinge um peso mínimo de 15g. Para diferenciação do sexo na tilápia do Nilo (*O. niloticus*), observa-se que o macho tem dois orifícios na região anal, sendo um deles correspondente ao final do sistema urinário, o outro correspondente ao ânus. Em contraste, as fêmeas apresentam um poro genital além dos dois orifícios dos machos, totalizando 3 orifícios (ICLARM, 1998). LOVSHIN (1976), afirma que a sexagem dos peixes é feita visualmente quando os peixes alcançam 40g de peso.

2.4 – Caracteres morfométricos e merísticos

Muitos cultivos de tilápia realizam procedimentos de seleção direta ou indireta, através do descarte de peixes pequenos dos estoques de reprodutores. Vários cultivos adotam seleção massal uma vez que o espaço para os reprodutores é limitado. A seleção massal consiste em um método

simples de melhoramento genético no qual os indivíduos acasalados são previamente selecionados baseados em características fenotípicas (FALCONER & MACKAY, 1996).

Os programas de seleção têm por finalidade privilegiar a média populacional de fenótipos considerados vantajosos, visando ao aumento da produtividade (TOLEDO-FILHO, 1998). Na maioria dos casos, o acompanhamento de caracteres morfométricos e merísticos possibilita o conhecimento dos ganhos ou perdas entre uma geração e outra.

Um bem sucedido programa de reprodução depende de uma bem-organizada coleta de dados, o que envolve o registro do peso vivo de todos os reprodutores, para assegurar o acasalamento de machos e fêmeas de tamanhos proporcionais. Esta alocação de parceiros pode ser feita baseada em uma avaliação visual preliminar de seus tamanhos, embora seja importante ter registro do número de larvas e média do peso dos animais coletadas de cada hapa de reprodução, das larvas estocadas em cada hapa berçário e dos alevinos transferidos e coletados de cada hapa. Estes registros são importantes para assegurar que um elevado número de alevinos seja produzido e que as condições de cultivo sejam padronizadas para todas as famílias. ICLARM (1998) sugere várias formas de registrar esses e outros dados, e estas metodologias de registro podem ser adaptadas às necessidades específicas de cada projeto individual (WORLD FISH CENTER, 2004).

Os caracteres morfométricos que possibilitam estimar a eficiência do programa de seleção recomendados pelo ICLARM (1998) para serem registrados são: (a) comprimento padrão, (b) peso, e (c) altura máxima do

corpo. Quanto aos caracteres merísticos, devem ser registradas a fecundidade e a qualidade do sêmen produzido.

2.5 – Características do sêmen de peixes

O sêmen é composto de espermatozóides e de plasma seminal, que é o meio ambiente das células espermáticas. Contém fundamentalmente carboidratos e proteínas. A quantidade de sêmen produzida por peixes varia conforme a espécie, o tamanho e a idade do animal, podendo a quantidade de células espermáticas atingir até 20 milhões/cm³ (KOVACS, 1990).

Os conhecimentos básicos da composição do plasma seminal de peixes, índice de produção de esperma (volume e densidade) e comportamento da relação esperma e condição ambiental tais como íons e osmolaridade podem contribuir para o entendimento das variações intra e inter-espécies destes animais (ALAVI & COSSON, 2005; 2006).

Os espermatozóides dos peixes são imóveis nas gônadas e somente apresentam motilidade quando em contato com a água ou outro meio suficientemente hiposmótico. Uma vez ativado, a motilidade tem curta duração de tempo, após a qual o espermatozóide perde sua capacidade de fertilizar. Nas espécies dulcícolas, a motilidade espermática resulta, sobretudo, da abrupta redução da pressão osmótica do meio e da diluição das altas concentrações de íons potássio do plasma seminal (CARNEIRO, 2007; STOSS & DONALDSON, 1982; MUTR & ROBERTS, 1993). A motilidade espermática é também influenciada por vários parâmetros tais como temperatura, pH, osmolaridade e taxa de diluição na solução de ativação (COSSON, 2004).

O armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas, exige que seu congelamento ou resfriamento seja feito sem que ele seja ativado, pois as reservas energéticas do espermatozóide são exauridas rapidamente após sua ativação (HARVEY & CAROLSFELD, 1993; CARNEIRO, 2007). Por outro lado, os procedimentos de congelamento de sêmen utilizam meios diluentes e agentes protetores constituídos de soluções aquosas que devem ser formuladas de modo a não provocar a ativação do sêmen (OHTA & IZAWA, 1996).

A velocidade de descongelamento do sêmen deve ser ideal, permitindo a re-hidratação celular e evitando que cristais no interior da mesma a prejudiquem. Tanto a velocidade de congelamento quanto de descongelamento devem ser conhecidas através da realização de experimentos preliminares para a espécie desejada uma vez que existem muitas particularidades entre os semens das várias espécies (FAUVEL *et al.*, 1998; BILLARD *et al.*, 2004).

2.6 – Criopreservação e resfriamento de sêmen

A criopreservação do sêmen é uma ferramenta que vem sendo bastante utilizada na aqüicultura para a conservação de seus recursos genéticos. Este processo consiste na preservação do material biológico através do congelamento usando temperaturas extremamente baixas. Este congelamento é realizado em nitrogênio líquido (KOVÁCS, 1990) e tem por objetivo manter o material viável por períodos prolongados.

Bancos de sêmen de peixes são arquivos de material genético congelado utilizado em piscicultura e em programas de conservação de espécies ameaçadas (RIBEIRO & GODINHO, 2003). Os mesmos autores

afirmam que dentre as aplicações de bancos de sêmen em piscicultura incluem-se: a) utilização de número adequado de machos na produção massal de alevinos; b) eliminação do problema da assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas; c) facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético; e e) maior segurança quanto à sanidade do plantel (RIBEIRO & GODINHO, 2003).

A criopreservação de sêmen é uma técnica aplicada na reprodução artificial e melhoramento genético de espécies. A utilização de sêmen criopreservado de peixe é feita com vários propósitos tais como programas de seleção de reprodutores, reprodução artificial e criação de bancos de germoplasma para conservação de espécies ameaçadas (DAVID *et al.*, 2000; MONGKONPUNYA *et al.*, 2000).

O ICLARM (1998) adota um protocolo de criopreservação de sêmen de tilápias desenvolvido na Universidade de Stirling, na Escócia. As técnicas de criopreservação de sêmen têm sido aplicadas em várias espécies de peixes, como: *O. niloticus* (GODINHO *et al.*, 2003), *Leporinus macrocephalus* (RIBEIRO & GODINHO, 2003), *Silurus glanis* (LINHART, 2005), *Carassius auratus* (MAUGER *et al.*, 2006), e *Perca fluviatilis* (ALAVI *et al.*, 2007).

O resfriamento de sêmen é outra técnica que apresenta uma série de vantagens para a piscicultura, desde favorecer trabalhos genéticos até a organização do trabalho de reprodução, já que o sêmen pode ser colhido e preservado para posterior utilização (CARNEIRO *et al.*, 2006).

Os espermatozoides necessitam de energia para manter suas funções vitais. Se quisermos preservar o sêmen e sua energia para a fecundação, é necessário que o consumo de energia para atividades das funções vitais seja

diminuído. Esta diminuição se dá através da diminuição da temperatura do meio possibilitando dessa maneira a sua preservação por curtos espaços de tempo (KOVACS, 1990). A preservação de sêmen por curtos intervalos de tempo, consiste na manutenção de sua viabilidade por um período de horas ou dias, usualmente em temperaturas ao redor de 4°C, sendo indicada para facilitar o manejo, por dispensar a presença do macho no ato da fecundação, e também para aumentar a eficiência da reprodução artificial nas estações de piscicultura.

Segundo MURGAS *et al.* (2004) a busca constante pela otimização de processos técnicos na preservação de espermatozoides de peixes é condizente com objetivos econômicos e ecológicos atuais.

2.7 – Sistema de reprodução e crescimento em hapas

“Hapas” são gaiolas especiais construídas geralmente com estrutura de madeira e tela feita em polietileno, costuradas com linha de nylon, com as junções feitas em partes dobradas para evitar que estas soltem ou rasguem. As dimensões podem variar desde 1 x 1 x 1m, 2 x 2 x 1m ou 3 x 3 x 1m. A malha, usualmente, é de 1 a 2 mm para larvas e alevinos e de 5 a 6 mm para peixes maiores (WORLDFISH CENTER, 2004). As hapas são montadas sobre armações de madeira fixadas dentro de viveiros escavados e geralmente possuem formato retangular, conforme mostrado na figura (FIGURA 3).

Para a tilápia do Nilo, *O. niloticus*, hapas suspensas em viveiros fertilizados são muito utilizadas para cultivar larvas até o tamanho de marcação ou até o momento da venda (LITTLE *et al.*, 2003). Em cultivos intensivos, a produção de larvas de *O. niloticus* é tipicamente realizada através da

estocagem de machos e fêmeas em grandes hapas suspensas em viveiros fertilizados, sendo que após a fertilização, os ovos são retirados da boca da fêmea e incubados artificialmente (LITTLE *et al.*, 1995).



FIGURA 3 – Hapas montadas em estruturas de madeira em formato retangular.

Por conveniência de monitoramento, manejo e identificação de famílias, as hapas são frequentemente dispostas paralelamente, formando fileiras dentro do viveiro. O ICLARM (1998) usa hapas de reprodução instaladas em viveiros com vista à produção controlada de proles numerosas.

Quando os viveiros são heterogêneos em relação à disponibilidade de nutrientes, o arranjo espacial dos hapas pode criar uma correlação ambiental entre as unidades próximas (CHARO-KARISA *et al.*, 2006). A maior restrição do uso prolongado de hapas para desova de tilápia é a incrustação que

normalmente se forma na parte interna da hapa que leva à progressiva deterioração da qualidade da água e o crescimento de perifiton ou lodo inorgânico que reduz a troca de água através das malhas (LITTLE *et al.*, 2000).

2.8 - Isolamento de DNA genômico de tecido sanguíneo

Muitas ferramentas moleculares têm sido criadas e utilizadas em pesquisas nas áreas de medicina humana e veterinária. A reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilita testes altamente sensíveis, cujas aplicações vão desde o diagnóstico clínico até os programas de melhoramento animal. Contudo, tais procedimentos dependem da habilidade de se extrair DNA em quantidade e qualidade suficientes. Existem vários métodos de extração e purificação do DNA genômico, mas ainda persistem problemas como contaminações por DNAs exógenos, inibidores de PCR e relativa sensibilidade da molécula de DNA, que facilitam sua desnaturação e degradação (COELHO *et al.*, 2004).

Um dos métodos mais utilizados para extração de DNA de diferentes espécies é baseado no uso de detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) no tampão de extração, o qual é comumente chamado de protocolo "CTAB". Este detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (WEISING *et al.*, 1995). A maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza o protocolo CTAB padrão, com algumas modificações, que visam a resolver problemas específicos da espécie em estudo (LIMA, 1999).

A extração de DNA a partir de amostras de sangue tem a grande vantagem de não haver necessidade da morte dos animais em estudo, uma

vez que uma pequena alíquota de sangue é suficiente para obter quantidades de DNA suficiente para várias análises. LIMA (1999) afirmou que o uso desta metodologia não é invasiva nem prejudicial aos animais e pode ser utilizada com sucesso em estudos da herança de características de interesse econômico para aquicultura.

3. OBJETIVOS

A piscicultura cresceu muito nos últimos anos graças a estudos que forneceram conhecimentos e avanços tecnológicos aplicados à área, possibilitando a melhoria do manejo e assim, o aumento da produtividade. Dentro destes estudos, a genética aplicada ganhou grande destaque no desenvolvimento de programas de melhoramento genético de espécies cultivadas.

O Centro de Pesquisa em Aqüicultura dispõe de estruturas físicas e laboratoriais aptas para a realização de um programa de melhoramento genético de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Diante deste quadro, o presente trabalho teve como objetivos:

3.1 – Objetivo geral

Adaptar metodologias de manejo reprodutivo como subsídios para a implantação de um programa de melhoramento genético da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) variedade chitralada no Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS em Pentecoste – CE.

3.2 – Objetivos específicos

- I – Testar e adaptar protocolos de anestesia, sexagem e marcação.
- II – Testar e adaptar técnicas de coleta de caracteres morfométricos e merísticos com aplicabilidade no manejo reprodutivo.
- III – Sugerir metodologias para a implantação de um Programa de melhoramento genético, para tilápia do Nilo adequadas à realidade do Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no período de setembro de 2005 a maio de 2007 no Centro de Pesquisa em Aqüicultura Rodolpho Von Ihering do Departamento Nacional de Obras contra as Secas – CPA/DNOCS localizado no município de Pentecoste, situado a 126 km de Fortaleza, capital do estado do Ceará.

Foi realizado um projeto piloto para testar e adaptar um conjunto de metodologias de manejo reprodutivo, com vistas à futura implantação de um programa de melhoramento genético da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) no CPA/DNOCS. As metodologias testadas foram: protocolo de anestesia de tilápia, protocolo de marcação de tilápia (método e tipo de marcação), protocolo de amostragens de caracteres fenotípicos (sexagem, caracteres morfométricos, caracteres merísticos), e experimento de reprodução em hapas.

4.1 – Protocolo de anestesia

Este protocolo foi baseado na metodologia utilizada por PALIĆ (2006) sendo que como anestésico foi utilizado o Eugenol (2-metox-4-(2-propenil) fenol), 100% nas proporções de 2mL/L de água. Para realização do teste de anestesia foram utilizadas duas classes de peso (220 e 540g) com cinco repetições cada. Os espécimes foram estocados em tanque de manejo (FIGURA 4) provido de aeração e sem receber alimentação 24 horas antes dos procedimentos. Inicialmente foi preparado um segundo tanque de manejo com circulação de água constante provido com aerador para receber os peixes após os procedimentos.

A solução anestésica foi preparada adicionando-se 10 mL de Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) a cada 5 litros de água em um aquário com capacidade para 10L, provido de oxigenação. Após a homogeneização da solução, cada peixe foi retirado do tanque de manejo com auxílio do puçá e colocado na solução, onde permaneceu até mostrar sinais característicos do efeito anestésico: ausência de reação ao toque, perda total do equilíbrio e redução dos movimentos operculares e das nadadeiras. Depois de anotadas as informações necessárias, seqüência de estágios de sedação, tempo para atingir o estágio de anestesia profunda e peso, os peixes foram estocados no segundo tanque de manejo no qual foram observados, e o tempo de recuperação de cada um foi registrado. Estes peixes permaneceram em observação por períodos de 6 horas depois de encerrado o efeito anestésico e então foram transferidos para tanques circulares.



FIGURA 4 – Vista geral dos tanques de manejo e bancada de procedimentos do CPA/DNOCS em Pentecoste – CE.

4.2 – Protocolo de marcação

Foram testados dois métodos baseados na metodologia descrita pelo WORLD FISH CENTER (2004), utilizada na Malásia, com algumas alterações. Em todos os testes foram utilizados 5 animais. Os peixes foram coletados individualmente do tanque de manejo utilizando um puçá e anestesiados de acordo com os procedimentos descritos previamente. Em seguida, cada animal foi individualmente envolvido em toalha úmida para minimizar o estresse, e levado para a bancada onde foi executada a marcação.

O método 1 consistiu do uso de etiquetas do tipo cânula, com numeração. Com auxílio de uma agulha cirúrgica, um fio de seda foi introduzido na cânula, transpassando de um lado a outro, e em seguida a agulha foi introduzida na parte dorsal da musculatura do peixe acima da linha lateral, entre o sexto e sétimo espinhos da nadadeira dorsal, fixando a etiqueta no músculo do peixe (FIGURA 5).

O método 2 consistiu na amputação de um espinho da nadadeira dorsal. Utilizando uma tesoura cirúrgica, primeiramente foram cortadas as membranas laterais do espinho da nadadeira dorsal e depois foi realizada a extração através do corte, aproximadamente 0,5 cm acima da base do espinho (FIGURA 6). Para evitar infecção foi colocado iodo sobre o local do corte. O primeiro espinho não foi utilizado por ser de tamanho consideravelmente inferior aos outros e provavelmente oferecer dificuldades posteriores para identificação. Depois de realizados todos os procedimentos, os peixes foram estocados separadamente, de acordo com o método de marcação utilizado, em dois tanques circulares. Após 20 dias de estocagem as marcações foram verificadas e os resultados registrados.



FIGURA 5 – Método 1 de marcação: detalhe do procedimento de inserção da cânula na musculatura do peixe.

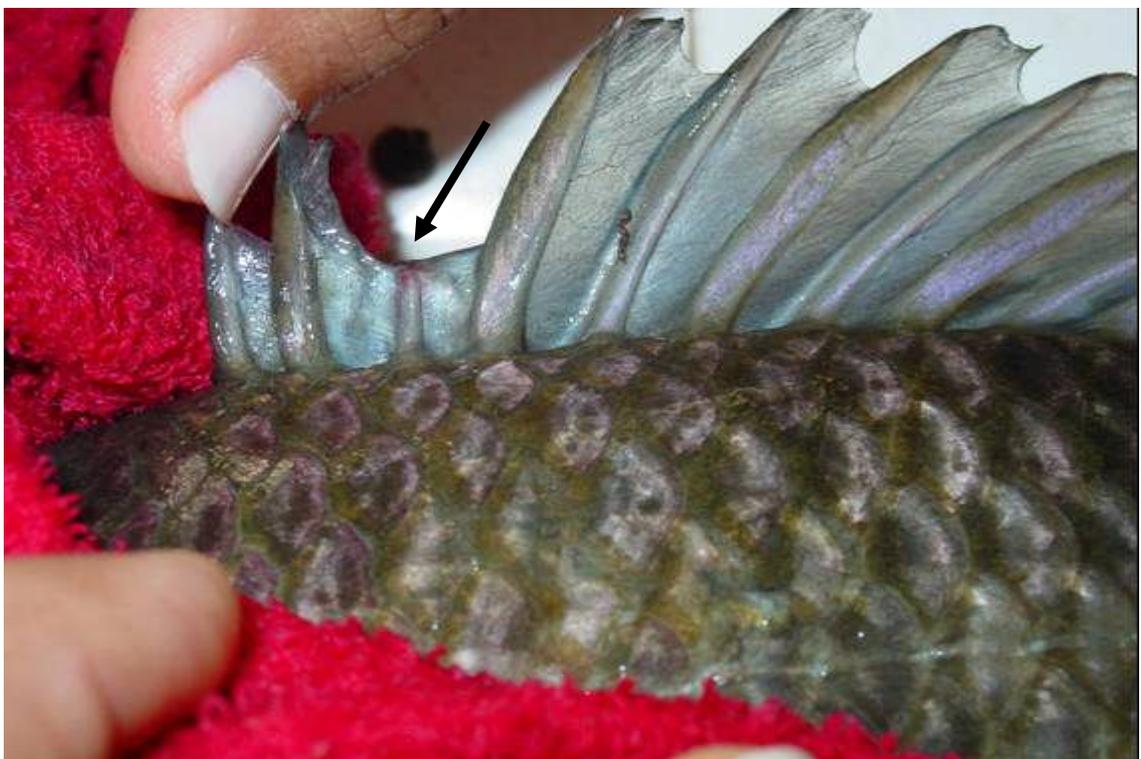


FIGURA 6 – Método 2 de marcação: amputação do espinho da nadadeira dorsal. Note o espinho amputado no detalhe.

4.3 – Protocolo de amostragens de caracteres fenotípicos

4.3.1 – Sexagem

Foram selecionados 30 peixes formando duas classes de peso: uma com peso de 15 a 25g e outra com peso de 26 a 50g, cada classe com 15 peixes. Estes espécimes foram estocados com 24 horas de antecedência no tanque de manejo provido de aeração. Durante o período de estocagem os peixes não foram alimentados.

Sob efeito anestésico, cada indivíduo foi envolvido na toalha úmida para facilitar o manejo e diminuir o estresse. Cada animal foi individualmente colocado sobre a bancada de procedimentos e em seguida, fazendo uso da lente de aumento foi observada a região urogenital para caracterizar os machos com a presença de dois orifícios: ânus e poro genital; e as fêmeas com a presença de três orifícios, ânus, uretra e oviduto (FIGURA 7).

Depois de feito o registro dos dados, os indivíduos foram re-estocados no tanque de manejo para recuperação, onde permaneceram em observação por um período de 6 horas, tendo sido posteriormente transferidos para tanques tipo “raceway”.

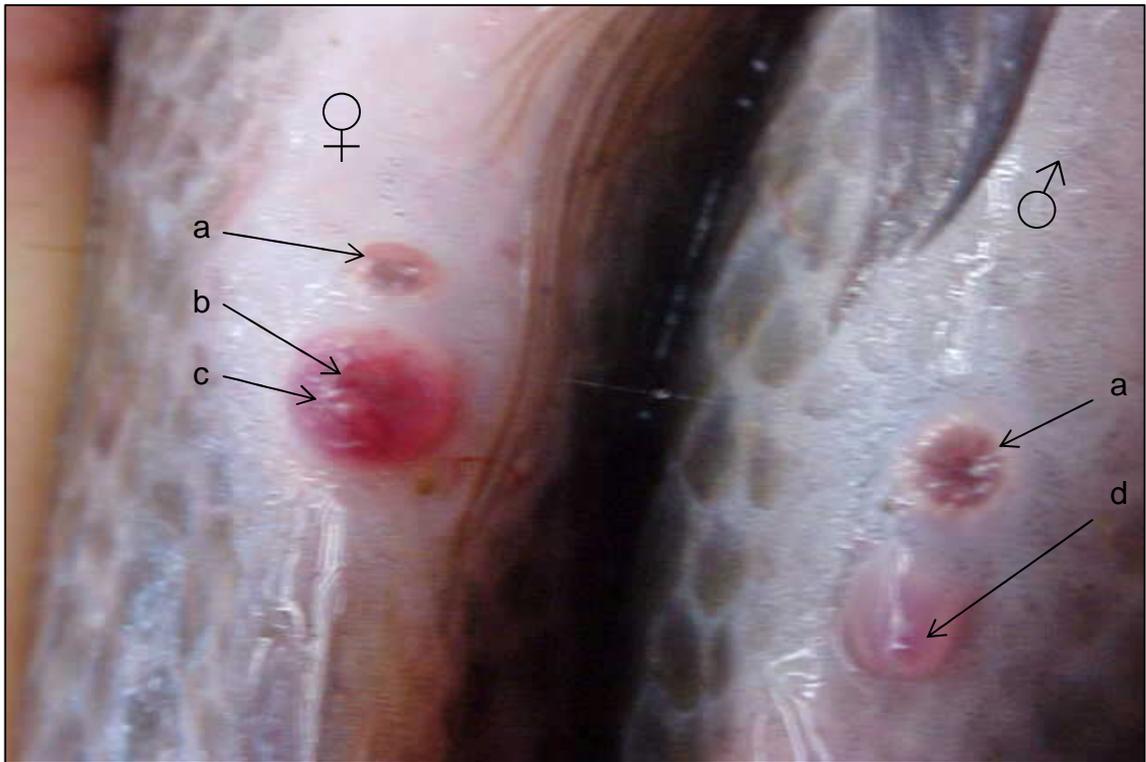


FIGURA 7 – Diferenciação anatômica externa de macho e fêmea de tilápia *O. niloticus*. Observar a fêmea à esquerda e o macho à direita. a = ânus, b = oviduto, c = uretra, d = poro urogenital.

4.3.2 – Amostragem dos caracteres morfométricos e merísticos

Todos os procedimentos foram baseados no método utilizado por ICLARM (1998) com algumas adequações. Foram selecionadas 20 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) do plantel de reprodutores do Centro de Pesquisa em Aqüicultura do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – CPA/DNOCS, sendo 10 machos e 10 fêmeas. Estes animais foram estocados separadamente de acordo com o sexo em tanques de descanso. Após um período de 8 dias, os animais foram coletados utilizando rede de arrasto e transferidos para o tanque de manejo.

Os peixes foram coletados do tanque de manejo e submetidos ao efeito do anestésico, em seguida foram transferidos para a bancada de

procedimentos e envolvidos em uma toalha úmida. Os espécimes foram marcados, e foi realizada a medição do comprimento total e altura máxima do corpo com o auxílio do ictiômetro (FIGURA 8), e pesagem em balança digital. Os caracteres merísticos registrados foram: (a) número de ovos, e (b) motilidade espermática expressa em porcentagem. Para realizar a contagem de ovos, as fêmeas foram identificadas e codificadas quanto à maturidade sexual de acordo com os critérios da tabela 3, antes da estocagem para produção dos ovos.



FIGURA 8 – Medição de tilápia usando ictiômetro confeccionado em madeira.

(a) Produção de ovos e codificação da maturidade sexual

As 10 fêmeas foram devidamente marcadas, medidas e pesadas. Cada fêmea foi examinada quanto à predisposição para desovar através das condições da papila genital de acordo com os critérios da TABELA 3.

TABELA 3 – Critérios utilizados para codificação da maturidade sexual das fêmeas de tilápia do Nilo *O. niloticus*.

| Estágio | Condições da Papila Genital | Período de observação (dias) | Ilustração |
|------------------------------------|--|------------------------------|---|
| Pronto para desovar (PD) | Papila genital avermelhada e projetada para fora, poro genital totalmente aberto e abdômen distendido. | 3 – 7 |  |
| Desovada (D) | Papila ainda avermelhada e abdômen comprimido. | 15 – 30 |  |
| Não está pronta para desovar (NPD) | Papila genital esbranquiçada e plana, abdômen normal. | 21 – 30 |  |
| Intumescida (I) | Papila genital amarelada, poro genital ligeiramente aberto. Abdômen ligeiramente distendido. | 5 – 10 |  |

Fonte: ICLARM (1998), com adaptações.

Esta classificação foi utilizada para determinar as fêmeas a serem utilizadas na formação das hapas de reprodutores e também para se conhecer o melhor período de inspeção das hapas para verificar a presença de ovos na boca da fêmea.

As fêmeas nos estágios PD e I foram selecionadas para fazer parte do experimento de reprodução em hapas. As mesmas foram estocadas em hapas de reprodução na proporção de duas fêmeas (uma PD e outra I) para um macho. Após 7 dias foi iniciado o processo de inspeção para coleta de ovos

incubados na boca das fêmeas. A coleta dos ovos foi realizada após a captura e observação individual de cada fêmea utilizando um puçá. Uma vez detectada a presença de ovos na cavidade oral como mostrado na FIGURA 9, a fêmea era colocada dentro de um recipiente plástico com capacidade para 40 litros, contendo 15 litros de água. Cada fêmea foi induzida a liberar seus ovos na água do recipiente através da realização de uma lavagem bucal, realizada através da abertura de sua boca por alguns segundos, provocando que os ovos fossem expelidos naturalmente através do movimento opercular do animal.



FIGURA 9 – Observação de ovos incubados na cavidade bucal de fêmea de tilápia.

Os ovos foram coletados do recipiente utilizando uma peneira de 1 mm de abertura de malha em placas de petri e levados para o laboratório onde foi realizada a pesagem através do uso de balança analítica (FIGURA 10). A contagem dos ovos foi realizada utilizando contador de placas bacterianas que

foi colocada debaixo das placas de petri contendo os ovos (FIGURA 11). As fêmeas desovadas foram levadas para tanques do tipo “raceway”.

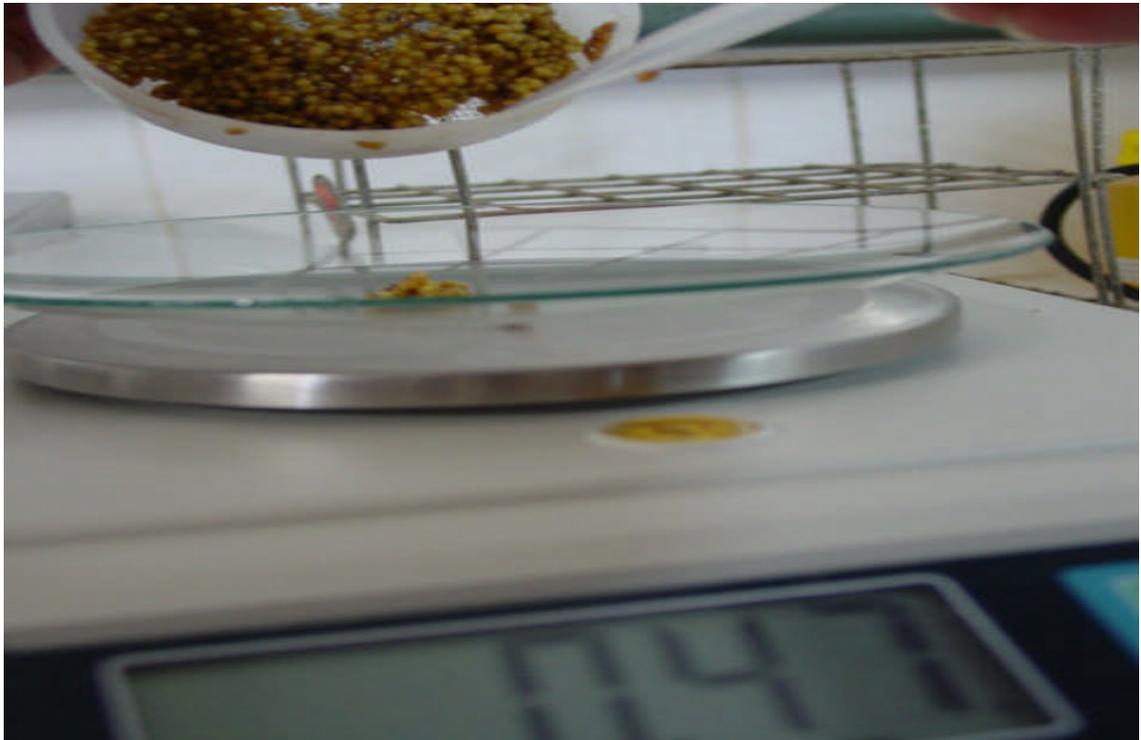


FIGURA 10 – Pesagem de ovos de tilápia.



FIGURA 11 – Contagem de ovos de tilápia utilizando contador de placas bacterianas.

(b) motilidade espermática de tilápia *Oreochromis niloticus*

O Processo de coleta do sêmen foi executado através da coleta individual de cada peixe seguida pela anestesia utilizando Eugenol e transporte para a bancada de procedimentos onde cada espécime foi envolvido com uma toalha úmida. A região genital foi seca utilizando papel toalha para evitar contato do sêmen com qualquer tipo de líquido (urina, água, muco), e evitar sua ativação. O sêmen foi extraído através de suaves massagens sobre a região ventral do peixe, e foi coletado diretamente em tubos de microcentrífuga de 2 mL (FIGURA 12).



FIGURA 12 - Coleta de sêmen de tilápia *O. niloticus*.

Após a coleta do sêmen, foram medidos o pH através do uso de medidor de pH portátil da marca POCKET e a motilidade, através do uso de microscópio óptico binocular invertido acoplado a uma câmera fotográfica e filmadora (FIGURA 13). Para caracterização da motilidade, uma gota do sêmen

foi colocada sobre uma lâmina ao microscópio já focalizado, e o sêmen foi ativado através da adição de água destilada. A motilidade foi determinada baseada na metodologia usada por MARIA *et al.* (2004), através da estimativa da taxa de espermatozóides móveis, utilizando uma escala arbitrária de 0 a 100%, determinada por um único observador.



FIGURA 13 - Observação da motilidade do sêmen de *O. niloticus* através de microscópio óptico.

4.4 – Teste de criopreservação de sêmen

O teste de criopreservação consistiu no congelamento e posterior restauração e verificação de sua qualidade, e foi realizado dez dias após a análise do sêmen descrita anteriormente.

Para realização da coleta do sêmen cada animal foi coletado do tanque de manejo e imobilizado com o auxílio de uma toalha úmida. A papila urogenital foi seca utilizando papel toalha, para reduzir os riscos de possíveis contaminações com água, fezes ou urina. O sêmen foi coletado, em tubos de microcentrífuga (FIGURA 14), e após a medição do volume, os tubos foram envolvidos em papel e armazenados em gelo até a chegada ao laboratório. Uma gota do sêmen fresco de cada amostra foi observada ao microscópio, para certificar a ausência de motilidade espermática e de contaminação.

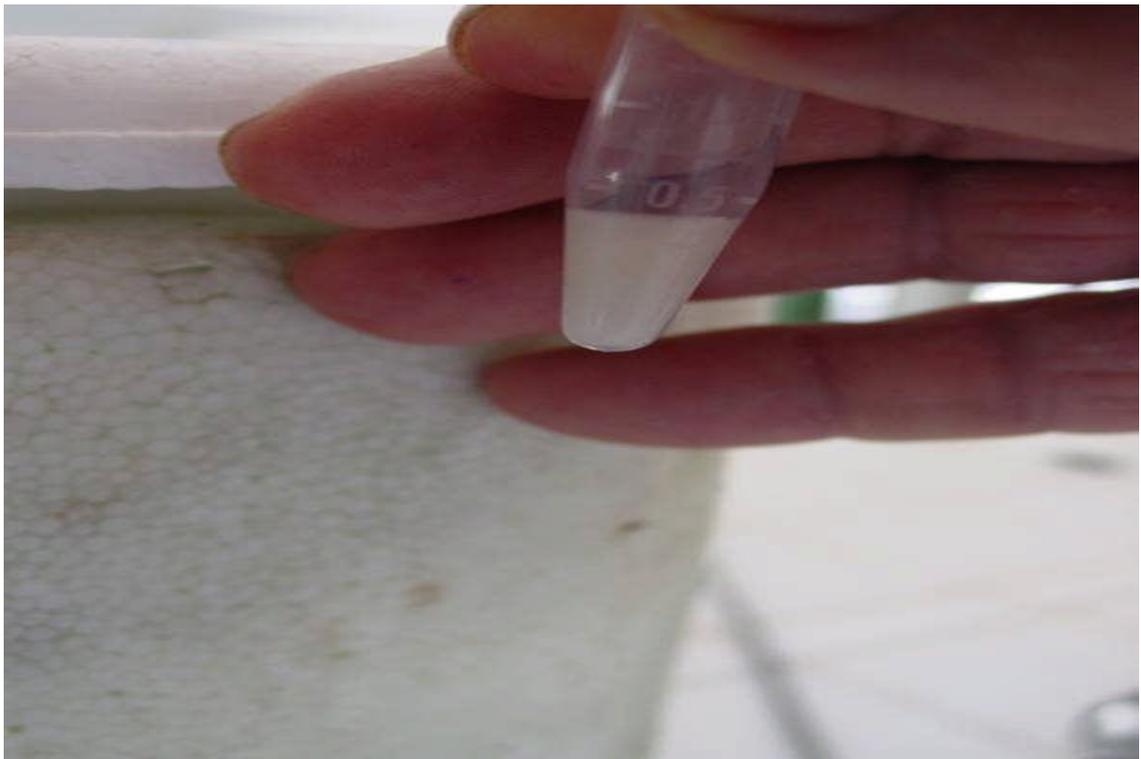


FIGURA 14 – Tubo de microcentrífuga contendo sêmen de tilápia *O. niloticus*.

Para realização do teste de criopreservação foram utilizadas as amostras de cinco peixes formando um “pool” que foi misturado à solução diluidora (diluidor + crioprotetor) na proporção de 1:9 (sêmen:diluyente) de

acordo com método de HARVEY & KELLEY (1988). Os diluidores utilizados foram Ringer e Glicose enquanto que os crioprotetores utilizados foram o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metanol. A proporção de solução diluidora foi de 90% de diluidor para 10% de crioprotetor.

Aos diluentes contendo DMSO, adicionou-se 10% de gema fresca de ovo de galinha, enquanto que naquele contendo metanol adicionou-se 10% de leite em pó desnatado, de acordo com HARVEY (1983). Para cada solução foram realizadas três repetições. Cada amostra de sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, vedada com álcool polivinílico, armazenada em hastes metálicas, e colocada no botijão de nitrogênio líquido, como mostrado na (FIGURA 15) , em conformidade com HARVEY (2000).

Após 24 horas de congelamento, as amostras foram retiradas do container de criopreservação e colocadas em banho-térmico a 40°C durante 8 segundos. Após serem enxugadas externamente, o conteúdo de cada amostra foi colocado em placa de petri. Para os procedimentos de análise de motilidade, foi retirada uma gota de sêmen de cada amostra, a qual foi colocada sobre uma lâmina e em seguida ativada com uso de NaCl 25 mM. Com o uso de microscópio binocular, com aumento de 400X, a motilidade foi observada e classificada através de uma escala de 0 a 100%.



FIGURA 15 – Recipiente de nitrogênio líquido utilizado para criopreservação de sêmen.

4.5 – Resfriamento de sêmen

Seguindo os mesmos procedimentos de coleta de sêmen citados anteriormente, foram utilizados cinco peixes, sendo que destes, o sêmen foi coletado separadamente e em seguida uma gota do sêmen fresco de cada amostra foi levado ao microscópio para certificar a ausência de motilidade espermática e de contaminação.

Utilizando tubos de microcentrífuga, foram preparados três tratamentos: um constando somente de sêmen, que serviu como amostra padrão, e os outros dois contendo solução diluidora (diluidor + crioprotector DMSO) e sêmen nas proporções indicadas na TABELA 4. Este procedimento foi realizado para todas as amostras de sêmen.

TABELA 04 – Proporções de sêmen e soluções diluidoras utilizadas no teste de resfriamento.

| Tipo de Solução diluidora | Quantidade de sêmen (mL) | Quantidade de diluidor (mL) |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Glicose (5%) | 0,1 | 0,9 |
| RINGER | 0,1 | 0,9 |
| Padrão | 0,3 | 0,0 |

Cada tubo de microcentrífuga contendo sêmen foi vedado com filme plástico que foi perfurado algumas vezes com agulha para permitir a oxigenação. Em seguida as amostras foram levadas para resfriamento a 4°C.

Para verificar a eficiência do resfriamento foram realizadas três análises após intervalos de tempo de 2,5h, 5h e 24h. As análises consistiram da retirada de uma gota de sêmen de cada tubo de microcentrífuga, colocação sobre uma lâmina, e observação em microscópio para verificar a ocorrência de motilidade pré-ativação. A ativação da motilidade espermática foi realizada através da adição de uma gota de NaCl 25 mM como solução ativadora.

4.6 – Experimento de reprodução em hapas

Para realização do experimento preliminar de reprodução em hapas foram utilizados 20 peixes (10 machos e 10 fêmeas) selecionados aleatoriamente do plantel de reprodutores do Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS.

Foi utilizado um viveiro escavado de 0,3 hectares de área total e profundidade média de 1,5 metros, com abastecimento de água feito através

de um canal derivado do Açude Pereira de Miranda que abastece o Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS em Pentecoste - CE.

Inicialmente o viveiro foi exposto à radiação solar por um período de quatro dias para secagem e eliminação de prováveis larvas, ovos e contaminações, antes de receber os reprodutores. Depois da secagem foi realizada uma “calagem” através da aplicação de cal virgem (Óxido de Cálcio) nas partes ainda úmidas, para tentar eliminar toda e qualquer possibilidade de sobrevivência de espécies indesejáveis, larvas de insetos e doenças. No sexto dia, o viveiro foi abastecido até a metade do seu volume final, em seguida foi montada no interior do viveiro a estrutura de madeira das hapas. Primeiramente foram montadas as 7 hapas de reprodução, com dimensões 1,2x1,0 x1,0m, de forma eqüidistante (FIGURA 16), com espaços de separação de 1m entre cada hapa. Cinco hapas foram utilizados para reprodução e as outras duas foram usadas para estocagem de animais que poderiam ser utilizados eventualmente. Na construção das hapas foi utilizada tela de polietileno com 2 mm de diâmetro de abertura de malha.

Após a montagem das hapas, 20 peixes foram selecionados para compor as hapas de reprodução, sendo que cinco destes ficaram distribuídos em hapas reserva. Após o registro dos caracteres morfométricos (peso, comprimento e altura máxima do corpo) e marcação individual, os animais foram estocados na proporção de 1 macho para cada 2 fêmeas por hapa, compondo cinco hapas de reprodução.

Cada hapa recebeu uma etiquetagem onde constava o número da hapa (1 a 7) e o número da marcação de cada peixe nela estocados. A estocagem dos reprodutores ocorreu na proporção de um macho para cada duas fêmeas

(1:2) por hapa, obedecendo as mesmas proporções utilizadas por ICLARM (1998).



FIGURA 16 - Hapas de reprodução instaladas em viveiro escavado no CPA/DNOCS em Pentecoste – CE.

Sete dias após a estocagem, foram iniciadas as inspeções matinais diárias para verificar a presença de ovos incubados na cavidade oral das fêmeas. Uma vez detectados os ovos, a fêmea era capturada e os ovos eram coletados utilizando os procedimentos mencionados anteriormente. Após a coleta dos ovos, a hapa onde estava a fêmea não era mais utilizada e os reprodutores eram colocados em tanques do tipo “raceway” (FIGURA 17), separados de acordo com o sexo.



FIGURA 17 – Tanques do tipo raceway utilizados no experimento.

4.7 – Sistema de incubadoras

Uma bateria de 8 incubadoras (FIGURA 18) foi previamente preparada para receber os ovos dos casais em reprodução. Cada incubadora constou de um recipiente de polietileno com capacidade de 2,5 litros, provido com uma mangueira de regulação da vazão da água, e uma para saída das larvas após a eclosão. Concluída esta fase, as larvas recém-natantes foram conduzidas pela correnteza da água para uma bandeja plástica onde permaneceram até a completa absorção do saco vitelino. A vazão da água foi constante e promoveu a circulação de oxigênio entre os ovos, propiciando-lhes movimento constante, e evitando o desenvolvimento de fungos nos ovos.



FIGURA 18 - Sistema de incubadoras utilizado no experimento.

Após a completa absorção do saco vitelino, os alevinos foram contados e transferidos, separadamente por família, para tanques circulares de alvenaria com capacidade para 2000 litros (FIGURA 19), providos de circulação constante de água alimentada pelo canal de abastecimento que recebe água do açude Pereira de Miranda, Pentecoste - CE. Os alevinos permaneceram nestas estruturas durante 23 dias, e foram alimentados com ração comercial contendo 32% de proteína bruta. Após este período foram transferidos para hapas de crescimento.



FIGURA 19 – Tanque circular de alvenaria utilizado para estocagem de alevinos após absorção total do saco vitelino.

4.8 – Hapas de crescimento e acompanhamento dos alevinos

Após o período de 23 dias de estocagem nos tanques circulares, os alevinos foram separados por famílias, pesados, contados, e estocados nas hapas de crescimento na densidade de 80 alevinos/m³. Foram utilizadas, inicialmente cinco hapas de crescimento com dimensões de 10x1x1m (FIGURA 20), confeccionadas da mesma forma como descrito anteriormente. Estas hapas foram distribuídas de forma eqüidistante no viveiro.

Cada hapa foi identificada, e na placa de identificação haviam as informações sobre cada prole: data de estocagem, família, número de alevinos. Depois de 42 dias foram montadas mais cinco hapas de crescimento e realizada uma repicagem dos peixes para diminuir a densidade, permanecendo uma densidade de 10 peixes/m³. Neste momento foi feita uma biometria (30%

do total estocado) e uma pré-seleção, e foram descartados os peixes defeituosos e de crescimento inferior à média do grupo.



FIGURA 20 – Hapas utilizadas para criação de alevinos.

Após o período de 63 dias de cultivo, os peixes de cada hapa de crescimento foram coletados e transferidos para o tanque de manejo e dos mesmos foram examinados a sobrevivência, o peso, o comprimento e foi também realizada a sexagem.

4.9 – Coleta de sangue para extração de DNA

Foi realizada a coleta de sangue de 30 exemplares de tilápia (*O. niloticus*) variedade chitralada para extração de DNA, sendo 10 indivíduos (5 machos e 5 fêmeas) provenientes do plantel introduzido em 2002, 10 indivíduos (5 machos e cinco fêmeas) provenientes do plantel de 2005 e 10

indivíduos (5 machos e cinco fêmeas) provenientes do plantel de 2007. Os animais selecionados de cada plantel foram estocados separadamente, de acordo com o sexo, em tanques de manejo. Sucedendo a esta transferência, grupos de dois peixes por vez (FIGURA 21) foram submetidos a anestesia com Eugenol, conforme citado anteriormente, por um período aproximadamente de 2 minutos, ou até que os animais mostrassem características próprias do efeito anestésico. Depois de anestesiados, os animais foram individualmente envolvidos em toalhas úmidas e colocados sobre a bancada para a realização de retirada do sangue, fazendo uso de seringa de 5 mL e agulhas descartáveis. O sangue foi coletado através de punção feita na base da nadadeira anal com a agulha sendo introduzida de forma transversal à linha lateral até a altura da coluna vertebral (FIGURA 22). De cada exemplar foi coletado 0,5 mL de sangue que foi imediatamente armazenado em tubos de microcentrífuga e congelados para uso posterior.



FIGURA 21 – Tilápias submetidas ao processo de anestesia utilizando o Eugenol.



FIGURA 22 – Coleta de sangue de tilápia *O. niloticus* para extração de DNA.

4.10 – Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado de amostras de sangue da espécie estudada através do uso do reagente CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) conforme descrito por MURRAY & THOMPSON, (1980) com adaptações. As amostras de sangue foram coletadas como descrito anteriormente, foram descongeladas naturalmente antes de serem utilizadas. Em seguida cada (0,5 mL) foi individualmente transferida para um tubo estéril contendo 6 mL do tampão de extração CTAB (Tris-HCl 100mM, CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM com pH 8.0 na solução final) acrescido de 2µL de 2-mercaptoetanol previamente aquecidos a 60°C em banho térmico úmido. Periodicamente os tubos foram invertidos para evitar formação de aglomerados de hemácias. Após um período de 12 horas de incubação, foi adicionado a cada tubo 6 mL de uma solução clorofórmio: álcool isoamílico (25:1 v/v) e após nova inversão do tubo, as fases aquosa (superior) e orgânica (inferior) foram separadas por centrifugação a 7.000 rpm durante 15 minutos usando uma centrífuga de bancada. A fase aquosa foi removida com auxílio de uma pipeta e transferida para um novo tubo. Os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de 2/3 do volume (2 mL) de isopropanol resfriado (FIGURA 23), e em seguida foi realizada nova centrifugação (7.000 rpm durante 10 minutos) para precipitação do pelete formado que foi ressuscitado em 3 mL de NaCl 1M e novamente precipitado pela adição de 2,5 volumes (7,5 mL) de etanol resfriado. O pelete foi submetido novamente à centrifugação a 7.000 rpm por 10 minutos, e coletado e lavado com 1 mL de etanol 70%. Os ácidos nucléicos foram então precipitados novamente por centrifugação (7.000 rpm durante 10 minutos) e ressuscitados em 2 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH

8.0), tendo sido então estocadas em tubos de microcentrífuga a 4°C para uso posterior.

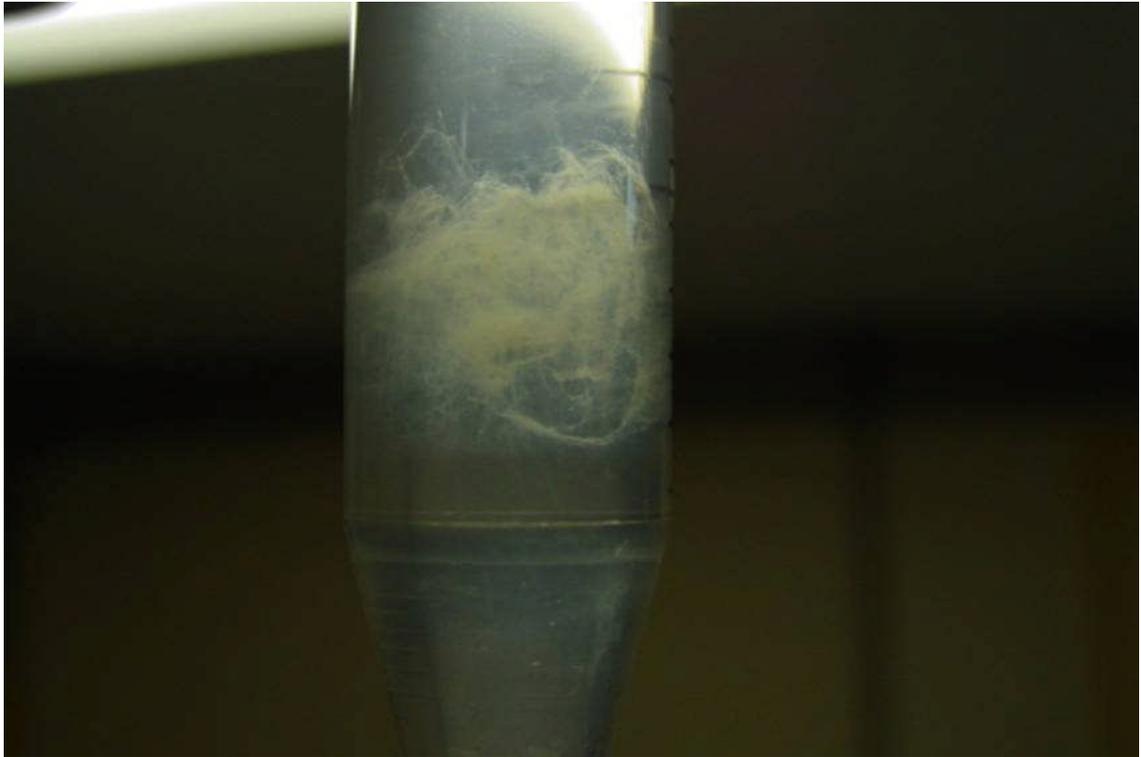


FIGURA 23 – Ácidos nucléicos precipitados por adição de isopropanol 100% resfriado.

A concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) de cada amostra foi estimada pela medida da absorbância a 260 nm de uma diluição de 1:3 da solução final, em TE pH 8.0. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV – 2000 A. A concentração de DNA em cada amostra foi calculada baseando-se no fato de que uma solução de DNA, numa concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, possui uma A_{260} de 1,0. A razão A_{260}/A_{280} de cada amostra foi usada como um indicativo da pureza das mesmas, como descrito em SAMBROOK *et al.*, (1989).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Protocolo de anestesia

Ao serem imersos na solução anestésica, os peixes apresentaram uma seqüência de estágios de sedação até atingir o estágio de anestesia profundo que é o ideal para os procedimentos (TABELA 5). Esta seqüência de estágios foi bastante semelhante à descrita por ROUBACH & GOMES (2001) ao testar o uso de anestésico durante o manejo de algumas espécies de peixes.

TABELA 5 – Seqüência de estágios de sedação de tilápia (*O.niloticus*) variedade chitralada submetidas a efeito anestésico do Eugenol.

| Estágio de anestesia | Descrição do comportamento |
|----------------------|--|
| Sedação inicial | Ausência de reação a movimentos visuais e ao toque. |
| Anestesia leve | Desequilíbrio parcial |
| Anestesia profunda | Perda total do equilíbrio |
| Anestesia cirúrgica | Diminuição dos movimentos operculares e das nadadeiras |

Neste teste as tilápias submetidas à anestesia com eugenol (óleo de cravo) entraram em estado de sedação em tempo médio de 120 segundos e o tempo médio de recuperação foi de $134 \pm 4,48$ segundos sem que tenha sido observada nenhuma reação aparente de irritabilidade ou de danos à sanidade dos peixes. Observou-se que para alguns indivíduos o efeito da anestesia, durante os mesmos intervalos de tempo, foi mais intenso, o que provavelmente

ocorreu devido à diferença de tamanho (peso) dos mesmos. O ICLARM (1998) utilizou MS-222 (Tricaína metano sulfonato) para anestésias tilápias (*O. niloticus*) e verificou que os peixes entraram em processo de sedação entre um e dois minutos, com tempo médio de recuperação de 2 a 3 minutos depois de estocados em água com aeração. Já LACERDA (2006) em seu trabalho com a tilápia-nilótica (*O. niloticus*) utilizou quinaldina como anestésico utilizado 5 minutos de período de sedação.

ROUBACH & GOMES (2001) afirmaram que o estágio normalmente utilizado durante este tipo de anestesia deve ser atingido entre 1 a 3 minutos e a recuperação dos animais deve ser rápida, sendo o tempo inferior a 5 minutos considerado adequado.

O procedimento de anestesia deve ser realizado de forma eficiente, tanto no ponto de vista biológico quanto econômico, isto é, sem causar prejuízos à sanidade dos peixes nem tornar o procedimento oneroso. Para tanto é necessário conhecer o produto adequado para a espécie e a quantidade ideal a ser aplicada na operação.

No presente trabalho, durante o tempo de observação e após recuperação dos espécimes, não foi detectado nenhuma reação atípica, comprovando que os animais estavam saudáveis e que o anestésico é adequado para utilização durante o manejo de tilápia. Existem inúmeros produtos anestésicos que são utilizados na aquicultura, mas de acordo com ROUBACH & GOMES (2001), no Brasil, os anestésicos mais utilizados são: MS-222 (Tricaína metano sulfonato), benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato), quinaldina (2-4-metilquinolina), fenoxietanol e mentol. De acordo com os mesmos autores estes produtos são bastante eficientes, embora a maioria

deles apresente efeitos indesejáveis como acidificação da água, baixa solubilidade, reações irritante aos peixes e ao operador, dentre outros.

5.2 – Protocolo de marcação de tilápia

Foram testados dois tipos de marcações, com o intuito de selecionar o mais apropriado e menos traumático para as tilápias do CPA/DNOCS. O método 1 que constou da fixação de uma marcação através de etiqueta tipo cânula no músculo do peixe mostrou-se mais traumática e menos eficiente uma vez que passados os 20 dias de estocagem, somente um animal permanecia com a marcação, enquanto que nos outros animais a marcação estava ausente e o local de inserção estava cicatrizado. Isso ocorreu, provavelmente, porque a etiqueta não foi inserida de forma a transpassar o peixe de um lado para o outro. O WORLD FISH CENTER (2004), ao testar esse tipo de marcação, inseriu a etiqueta de forma a atravessar a musculatura do peixe de um lado a outro, acima da linha lateral e na posição entre o sexto e sétimo espinho da nadadeira dorsal. FARIA *et al.*, (2003), testaram a inserção de etiquetas em diferentes posições na musculatura da tilápia e verificou perda de 13 a 33% das mesmas.

O método 2, realizado através da amputação de um espinho da nadadeira dorsal, além de aparentemente ser menos traumático para o peixe, foi mais eficiente uma vez que após os 20 dias de estocagem todos os peixes permaneciam com suas marcações bem visíveis, apesar de já ser observada uma regeneração do espinho, uma vez que o mesmo não foi completamente retirado.

O corte feito 0,5 cm acima da base do espinho foi muito positivo já que além de evitar sangramento tornou possível ao toque, mesmo que regenerado, a identificação do espinho amputado. Considerando que os peixes marcados estarão em manuseio periodicamente, e possibilitando a renovação da marca quando necessária, esse tipo de marcação mostrou-se o mais adequado uma vez que não gera custos e é menos traumático para o peixe. Técnica utilizada no ICLARM (1998) fez uso da total eliminação ou amputação do espinho através do uso de um bisturi ou manualmente com movimentos alternados de um lado para o outro até que o mesmo se desprenda. Este processo, embora não permita a regeneração, é bastante traumático para o peixe.

A partir dos resultados obtidos neste teste, o método escolhido para marcação dos peixes nos demais experimentos foi o método 2, salientando-se a necessidade de renovação periódica da marca uma vez que o peixe apresenta uma grande capacidade de recuperação. Foi extraído um espinho de cada peixe seguindo a ordem de disposição da nadadeira, evitando-se utilizar o primeiro espinho, pois o mesmo é muito pequeno e pode causar eventuais problemas de identificação posterior. Assim sendo foram utilizados os espinhos a partir do segundo até o décimo primeiro para marcação de fêmeas e machos. A marcação utilizando 16 espinhos da nadadeira dorsal e combinações da amputação de três destes possibilita marcar 560 peixes. Esta técnica é semelhante à utilizada pelo WORLDFISH CENTER (2004), que de cada reprodutor potencial elimina um ou uma combinação de espinhos a partir do segundo.

5.3 – Sexagem de tilápia

A sexagem das tilápias realizada através da observação da região urogenital de tilápia foi eficiente e possível ser realizada uma vez que esta espécie apresenta diferenciação de fácil percepção.

A técnica utilizada, baseada no método utilizado no ICLARM (1998) mostrou-se adequada para a realização da sexagem de tilápias e os resultados do experimento constam na TABELA 6. Porém, alguns peixes, de ambos os sexos, com pesos inferiores a 25g, apresentaram dificuldades para a realização da sexagem, fazendo-se necessário a utilização da uma lente de aumento. Em uma pequena parcela de indivíduos desta faixa de peso (25g), foi possível a visualização do sexo do indivíduo mesmo sem a necessidade do uso da lente de aumento.

Apesar dessa pequena dificuldade, a sexagem realizada através da observação da região urogenital da tilápia, fazendo uso de uma lente de aumento, foi eficiente e possível de realizar uma vez que esta espécie apresenta diferenciação de fácil percepção. Segundo relatos do ICLARM (1998) e do WORLD FISH CENTER (2004) a sexagem da tilápia é possível ser realizada em peixes acima de 15g.

TABELA 6 – Número de peixes por classe de peso de acordo com o sexo.

| SEXO | Número de indivíduos por classes de Peso | |
|------|--|----------------|
| | 15 – 25 gramas | 26 a 50 gramas |
| ♂ | 9 | 11 |
| ♀ | 6 | 4 |

Peixes acima de 25g apresentaram suas características diferenciais quanto ao sexo, facilmente identificáveis, sendo este um tamanho adequado para realização da sexagem de tilápia do Nilo (*O. niloticus*). O peso ideal para sexagem encontrado no presente trabalho foi inferior ao recomendado por LOVSHIN (1976) que afirma que o cultivo de monossexo da tilápia do Nilo inicia-se com a sexagem dos peixes, que pode ser feita manualmente quando os peixes alcançam 40g de peso.

5.4 – Protocolo de amostragem dos caracteres morfométricos e merísticos

5.4.1 – Caracteres morfométricos dos reprodutores

As características morfométricas dos 20 animais utilizados no experimento foram devidamente registradas em fichas de controle que serviram como modelo para acompanhamento individual dos espécimes possibilitando recompor cada hapa com os mesmos reprodutores após o período de descanso. (TABELA 7). O peso médio dos reprodutores variou de 620g \pm 170 a 740g \pm 34,6, os quais foram distribuídos nos hapas de reprodução mantendo o mínimo de diferenças de peso entre machos e fêmeas. O sucesso de um programa de reprodução depende em parte de uma bem organizada coleta de dados (WORLD FISH CENTER, 2004). Segundo o ICLARM (1998) o conhecimento dos espécimes que compõe cada hapa de reprodução é importante para seleção dos melhores reprodutores. O mesmo autor afirma que a distribuição dos animais nos hapas com pesos uniformes entre machos e fêmeas evita problemas de competição entre os mesmos.

TABELA 7 – Características morfométricas das tilápias (*O. niloticus*) variedade chitralada utilizadas no experimento de reprodução em hapas.

| Espécime | Marcação no. | Comprimento total (cm) | Altura do corpo (cm) | Peso (g) |
|---------------|--------------|---------------------------|-------------------------|----------|
| Hapa 01 | | | | |
| ♂ | 8 | 34,5 | 10,5 | 640 |
| ♀ | 3 | 35,0 | 10,6 | 760 |
| ♀ | 2 | 32,0 | 9,5 | 500 |
| Média | | 33,8 | 10,2 | 633 |
| Desvio Padrão | | ±1,61 | ±0,61 | ±130 |
| Hapa 02 | | | | |
| ♂ | 4 | 32,0 | 10,0 | 460 |
| ♀ | 4 | 33,0 | 9,5 | 800 |
| ♀ | 7 | 37,0 | 12,0 | 960 |
| Média | | 34,0 | 10,5 | 740 |
| Desvio Padrão | | ±2,6 | ±1,3 | ±255 |
| Hapa 03 | | | | |
| ♂ | 9 | 30,0 | 9,5 | 460 |
| ♀ | 5 | 36,5 | 11,0 | 800 |
| ♀ | 9 | 33,0 | 9,5 | 600 |
| Média | | 33,2 | 10,0 | 620 |
| Desvio Padrão | | ±3,3 | ±0,9 | ±170 |
| Hapa 04 | | | | |
| ♂ | 2 | 36,0 | 11,0 | 720 |
| ♀ | 6 | 34,5 | 10,5 | 720 |
| ♀ | 10 | 36,5 | 10,0 | 780 |
| Média | | 35,6 | 10,5 | 740 |
| Desvio Padrão | | ±1,0 | ±0,5 | ±34,6 |
| Hapa 05 | | | | |
| ♂ | 3 | 35,5 | 11,5 | 760 |
| ♀ | 8 | 34,0 | 10,0 | 720 |
| ♀ | 11 | 34,0 | 9,0 | 560 |
| Média | | 34,5 | 10,2 | 680 |
| Desvio Padrão | | ±0,9 | ±1,3 | ±105 |
| Reservas | | | | |
| ♂ | 5 | 34,5 | 10,5 | 640 |
| ♂ | 6 | 32,0 | 10,0 | 540 |
| ♂ | 7 | 32,5 | 10,0 | 580 |
| ♂ | 10 | 35,0 | 10,0 | 700 |
| ♂ | 11 | 40,0 | 13,0 | 1060 |
| Média | | 34,8 | 10,7 | 704 |
| Desvio Padrão | | ±3,2 | ±1,3 | ±208 |

Os trios de reprodutores foram estocados em hapas de reprodução enquanto que alguns animais foram mantidos em hapas de reposição, visando uma eventual substituição dos peixes em reprodução.

5.4.2 - Caracteres fenotípicos observados em tilápias fêmeas

O período de oito dias de descanso obedecido pelas fêmeas de tilápia *O. niloticus* possibilitou que a maioria delas estivesse em um estágio adequado para formação dos hapas de reprodução. De acordo com WORLD FISH CENTER (2004), a estratégia para sincronização de desova envolve a manutenção de estoques de reprodutores separados por sexo em hapas ou estrutura adequada, condicionamento para alimentação apropriada e evolução da condição da maturidade sexual da fêmea.

As características apresentadas pelas fêmeas envolvidas nesse teste foram as seguintes: poro genital totalmente ou parcialmente aberto, papila genital de amarelada a avermelhada e projetada para fora, com abdômen distendido. Estas características são observadas e recomendadas pelo ICLARM (1998) para selecionar fêmeas para formação de hapas de reprodução.

Com a formação das hapas de reprodução sob controle das condições da pré-disposição de cada fêmea a desovar, foi possível determinar um período exato para inspeção das hapas. As fêmeas que estavam no estágio "PD" desovaram entre 3 e 5 dias enquanto que as fêmeas "I" desovaram entre 6 e 10 dias, podendo-se promover assim um sincronismo de acordo com as condições observadas nas fêmeas. Estes períodos são semelhantes aos observados por ICLARM (1998) e por WORLD FISH CENTER (2004).

O peso dos ovos produzidos por quilo de peixe apresentou uma grande variação como mostra a TABELA 8. Esta variação ocorrida no peso dos ovos produzidos por fêmea ocorreu devido à quantidade de ovos coletados de cada animal e também devido à variação do estágio de desenvolvimento.

Segundo a SBRT (2007), o número de ovos pode variar de acordo com as espécies e tamanho das fêmeas e que uma fêmea de tilápia pode desovar de 1.500 a 5.000 ovos. Estes valores são semelhantes aos valores encontrados no presente trabalho, onde o número de ovos produzido por quilo de peixe variou de 759 a 5.194.

A fecundidade de uma fêmea é muitas vezes relacionada com seu tamanho e sua vida reprodutiva. Além disso, a realização da maturidade reprodutiva e, em algumas espécies, a expressão do envelhecimento reprodutivo são associados com o tamanho e idade da fêmea (RIDEOUT & BURTON, 2000; McINTYRE & HUTCHINGS, 2003). No presente trabalho, observou-se uma tendência às fêmeas de menor peso apresentar maior produção de ovos com redução desta produção à medida que o peso aumentou.

TABELA 08 – Número e peso de ovos produzidos por fêmea.

| Hapa | Marca | Peso da fêmea(g) | Número de Ovos | Peso dos ovos (g) | Nº de ovos/kg de peixe |
|------|--------------|------------------|----------------|-------------------|------------------------|
| 1 | ♀ 2 | 500 | 2.597 | 16,05 | 5.194 |
| | ♀ 3 | 760 | 2.367 | 19,38 | 3.114 |
| 2 | ♀ 4 | 800 | 2.896 | 19,86 | 3.620 |
| | ♀ 7 | 960 | 729 | 6,12 | 759 |
| 3 | ♀ 5 | 800 | 987 | 6,17 | 1.234 |
| | ♀ 9 | 600 | 2.489 | 14,11 | 4.148 |
| 4 | ♀ 6 | 720 | 2.319 | 12,77 | 3.221 |
| | ♀ 10 | 780 | 1.597 | 12,49 | 2.047 |
| 5 | ♀ 8 | 720 | 1.418 | 7,95 | 1.969 |
| | ♀ 11 | 560 | 1.265 | 8,41 | 2.259 |
| | Média | 720 | 1.866 | 12,33 | 2.756 |
| | Desv. padrão | ±134,99 | ±755,66 | ±5,11 | ±1.359,98 |

5.4.3 – Análise do sêmen de tilápia

Os animais doadores de sêmen apresentavam coloração avermelhada na papila urogenital e expeliam algumas gotas de sêmen ao sofrer leve compressão manual da cavidade abdominal. A coleta do sêmen foi realizada sem dificuldades, comprovando que o peixe estava no melhor período para reproduzir. A TABELA 9 mostra os resultados das análises do material coletado de cada espécime.

TABELA 9 – Taxa de motilidade, pH e volume de sêmen produzido por peixe.

| espécime | Peso (g) | Comprimento (cm) | Volume do sêmen (mL) | pH | Taxa de motilidade (%) |
|--------------|----------|------------------|----------------------|-------|------------------------|
| 2 | 720 | 36,0 | 0,8 | 8,0 | 100 |
| 3 | 760 | 35,5 | 1,0 | 7,8 | 99 |
| 4 | 460 | 32,0 | 0,6 | 6,9 | 100 |
| 5 | 640 | 34,5 | 0,8 | 8,0 | 100 |
| 6 | 540 | 32,0 | 0,7 | 7,9 | 100 |
| 7 | 580 | 32,5 | 1,0 | 8,2 | 98 |
| 8 | 640 | 34,5 | 1,2 | 7,8 | 97 |
| 9 | 460 | 30,0 | 0,5 | 6,8 | 95 |
| 10 | 700 | 35,0 | 1,3 | 8,1 | 100 |
| 11 | 1060 | 40,0 | 1,8 | 8,0 | 100 |
| Média | 656 | 34,2 | 0,97 | 7,75 | 98,9 |
| Desv. Padrão | ±175,32 | ±2,78 | ±0,39 | ±0,49 | ±1,73 |

Os resultados das análises do sêmen mostraram que os procedimentos de coleta foram bastante satisfatórios uma vez que não houve contaminação possibilitando assim a obtenção de um material de boa qualidade para todas as amostras. Esta qualidade foi comprovada através da observação em microscópio do sêmen antes de ativar, e verificou-se que estavam completamente imóveis e com a observação pós-ativação com motilidade bastante satisfatória, atingindo taxas acima de 95% para todos os espécimes.

Várias técnicas de coleta de sêmen de peixes já foram descritas (YAO *et al.*, 2000). No presente trabalho a coleta de sêmen com tubos de microcentrífuga de 2 mL foi bastante facilitada em razão do mesmo oferecer tamanho proporcional e uma conformação em relação a papila urogenital da

tilápia do Nilo (*O. niloticus*). A eficiência da técnica ficou comprovada através da ausência de contaminação do sêmen no momento da realização da coleta, não havendo necessidade de descartar nenhuma amostra. GODINHO *et al.* (2003) utilizaram seringa de 1 mL para coleta e embora tenham considerado o método adequado, houve a necessidade de descartar 7% de suas amostras por suspeita de contaminação. MURGAS *et al.* (2004) utilizaram tubos de ensaio para coletar sêmen de *Brycon orbignyianus* e não registrou contaminação das amostras quando observadas em microscópio.

O volume de sêmen produzido no presente trabalho variou de 0,5mL a 1,8mL e apresentou uma correlação positiva em relação ao comprimento do peixe. A correlação volume/comprimento também foi verificada para *Perca fluviatilis* por ALAVI *et al.* (2007). Os peixes de menor peso, 460 gramas, o volume de sêmen variou de 0,5 a 0,6 mL, o qual apresenta uma quantidade consideravelmente alta de células espermáticas, suficientes para fertilizar uma grande quantidade de ovos. De acordo com KOVÁCS (1990), a quantidade de células espermáticas em sêmen de peixes, varia de 5 a 20 milhões/cm³ dependendo da espécie e da época de propagação.

O pH do sêmen das tilápias variou de 6,9 a 8,2 sendo considerado neutro a levemente básico. Valores semelhantes aos encontrados, foram citados por ALAVI *et al.* (2005) para truta (*Parasalmo mykiss*). REDONDO-MULLER *et al.* (1991) e PERCHEC-POUPARD *et al.* (1997) afirmam que a motilidade do sêmen da carpa pode ser iniciada com um pH externo de 6.0 a 9.0. Possíveis efeitos do pH foram investigados em *Mugil capito* (HINES & YASHOV, 1971), *P. mykiss* (BILLARD, 1983), e *A. transmontanus* (INGERMANN *et al.*, 2002).

As taxas de motilidade do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variaram de 95% a 100% quando ativadas com solução de NaCl 25mM. Valores semelhantes foram encontrados para a Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) por MURGAS *et al.* (2004) enquanto que CRUZ (2001), trabalhando com *Prochilodus lineatus*, verificou taxa de motilidade espermática do sêmen em $90,00 \pm 0\%$.

5.5 – Teste de criopreservação de sêmen de tilápia

A coleta de sêmen realizada em tubos de microcentrífuga foi feita com sucesso uma vez que estes eram pequenos e graduados evitando assim perdas nas paredes do recipiente e oferecendo a possibilidade da leitura imediata aproximada do volume coletado. Além disso, o formato do tubo adequou-se à anatomia externa da papila urogenital dos peixes.

O volume total de sêmen obtido dos cinco peixes foi de 3,0 mL não tendo ocorrido contaminação no momento da coleta, comprovado através de exame microscópico realizado a fresco.

Os resultados da motilidade espermática pós-descongelamento do sêmen criopreservado nas quatro diferentes soluções diluidoras, com diferentes crioprotetores estão dispostos na TABELA 10.

TABELA 10 – Taxa de motilidade (%) pós-descongelamento e ativação de espermatozoides de tilápia (*O. niloticus*) criopreservados em quatro soluções diluidoras.

| SOLUÇÕES DILUIDORAS | MOTILIDADE (%) | | |
|------------------------|----------------|-----------|-----------|
| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
| Ringer + DMSO | 30 | 25 | 10 |
| Ringer + metanol | 20 | 18 | 8 |
| Glicose + DMSO | 40 | 15 | 30 |
| Glicose + Metanol | 25 | 12 | 18 |

As taxas de motilidade observadas com o uso de soluções contendo DMSO foram maiores que as taxas produzidas pelo Metanol, mostrando que a toxicidade do DMSO foi menor. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboraram dados de RIBEIRO & GODINHO (2003) utilizando DMSO, e metanol entre outros criopreservadores, que considerando a taxa de motilidade espermática como indicador de toxicidade, o DMSO foi o menos tóxico para o sêmen fresco de piau-açú *Leporimus macrocephalus*.

A motilidade espermática é utilizada para indicar a qualidade do sêmen (BILLARD *et al.*, 1995). No entanto, RANA (1989) sugere que se faça também o teste de fertilização para comprovar a eficiência do método de criopreservação. As taxas de motilidade espermática pós-descongelamento obtidas nesse trabalho foram inferiores aos de HORVÁTH *et al.* (2003) em carpa comum, superiores as de RIBEIRO & GODINHO (2003) em piau-açú *Leporimus macrocephalus* e semelhantes as de GODINHO *et al.* (2003) em tilápia *Oreochromis niloticus*. Segundo CHAO *et al.* (1987) motilidade espermática, em vez de taxa de fertilização, é o critério mais adequado para avaliar o sucesso da criopreservação do sêmen de tilápias.

O presente trabalho utilizou NaCl 25mM como solução ativadora para todas as amostras. Esta solução foi a mesma utilizada por RIBEIRO & GODINHO (2003) para sêmen de *Leporinus macrocephalus*. GODINHO *et al.*, (2003) afirmaram que NaCl 25 mM pode ser usado com igual sucesso de outras soluções na ativação da motilidade espermática do sêmen descongelado de tilápia.

A rapidez nos processos de descongelamento de sêmen é uma variável crítica para sua criopreservação (VIVEIROS, 2000). Esta mesma taxa foi verificada por GODINHO (2003) em criopreservação de sêmen de tilápia *O. niloticus*. Taxas de congelamento ideais foram obtidas a 30°C/min (HARVEY, 1983) e entre 10° e 80°C/min (HARVEY & KELLY, 1988) para sêmen de tilápia.

5.6 - Resfriamento de sêmen de tilápia

Os resultados desse trabalho revelaram que as amostras de sêmen utilizadas como controle, sem solução diluidora, mostraram maior tempo de conservação da qualidade sob refrigeração, que as demais, a qual foi comprovada com a observação pós-ativação. A solução diluidora a base de glicose foi mais eficiente para manutenção da qualidade do sêmen resfriado em todas as análises realizadas quando comparado com a solução contendo Ringer (TABELA 11). A taxa de motilidade do sêmen observada no presente trabalho, após 24 horas sob resfriamento a 4°C, foi semelhante à encontrada por SANTANA (1998) para o sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) resfriado a 4°C e inferior aos valores encontrados para sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C (MURGAS *et al.*, 2004). Sob refrigeração, os espermatozoides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou

dias, dependendo da espécie, desde que mantidos em temperaturas negativas podem ser estocados por muitos anos (BILLARD *et al.*, 2004).

CARNEIRO *et al.* (2006) afirmam que a refrigeração do sêmen possibilita sua estocagem por mais de 10 dias para algumas espécies nativas de interesse comercial, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples e de baixo custo que pode ser implementada nas pisciculturas voltadas à produção de alevinos. A técnica de refrigeração possibilita ainda a redução dos custos de manutenção do plantel de reprodutores e trocas de material genético entre laboratórios (CARNEIRO, 2007).

TABELA 11 - Taxa de motilidade dos espermatozóides de tilápia (*O. niloticus*) pós-resfriamento e observados em três diferentes intervalos de tempo utilizando NaCl como solução ativadora.

| PEIXE | MOTILIDADE (%) EM DIFERENTES PERÍODOS DE RESFRIAMENTO | | | | | | | | |
|-------|---|--------|---------|---------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | 2,5 horas | | | 5 horas | | | 24 horas | | |
| | Padrão | Ringer | Glicose | Padrão | Ringer | Glicose | Padrão | Ringer | Glicose |
| 1 | 100 | 80 | 100 | 80 | 50 | 60 | 70 | 40 | 50 |
| 2 | 100 | 80 | 100 | 80 | 70 | 70 | 50 | 30 | 20 |
| 3 | 100 | 60 | 100 | 70 | 40 | 80 | 30 | 00 | 10 |
| 4 | 100 | 100 | 100 | 90 | 80 | 60 | 60 | 10 | 30 |
| 5 | 100 | 80 | 90 | 90 | 70 | 80 | 50 | 40 | 40 |

A técnica de resfriamento de sêmen é pouco dispendiosa e permite que o sêmen preservado esteja apto à fertilização de ovócitos de fêmeas induzidas

hormonalmente, em vários intervalos de tempo, garantindo maior produtividade no processo de reprodução e o estudo das características do sêmen (CIERESZKO & DABROWSKI, 1994). A viabilidade da manutenção de sêmen resfriado de tilápia oferece grandes vantagens para estudos com reprodução induzida principalmente as direcionados a obtenção de machos YY.

5.7 – Experimento de reprodução em hapas

A proporção de estocagem de 1 macho para 2 fêmeas foi bem aceita pelos reprodutores, ocorrendo somente uma perda de peixe por óbito durante a reprodução. Esta proporção é mesma utilizada pela ICLARM (1998).

O sistema de reprodução em hapas com dimensões de 1,2x1x1m facilitou bastante o manejo dos reprodutores, e reduziu o estresse imposto por manejo de redes em caso de viveiros ou pelo tempo de manejo em caso de hapas de maiores dimensões geralmente utilizadas em cultivos comerciais. Este sistema vem sendo utilizado em países tais como Filipinas, Bangladesh, Vietnã, Egito e Tailândia, os quais estão envolvidos com o projeto GIFT (ASIAN DEVELOPMENT BANK, 2005).

Os ovos foram retirados somente de uma das fêmeas, e a hapa foi desfeita após a coleta dos ovos, Em seguida, as hapas de reprodução foram desmontadas, e as hapas de crescimento foram colocadas naquele local.

As fêmeas em estágio de maturação “pronta para desovar” (PD) foram as que desovaram primeiro, e as que apresentaram estágio de maturação intumescida (I) não colaboraram para formação das proles, sendo que uma destas, a fêmea de marcação n^o. 11 veio a óbito no terceiro dia de estocagem. Os espécimes que desovaram apresentaram uma perda aparente de peso

após a desova. O macho de marcação n^o 4 estava bastante machucado, com ferimentos na boca e na nadadeira caudal, provavelmente devido a agressões por parte das fêmeas que apresentavam maior tamanho em peso.

O sistema de incubadoras utilizado foi o mesmo já usado pelo Centro de Pesquisa em Aqüicultura, o que facilitou bastante os procedimentos de manejo. Os ovos incubados eclodiram entre dois e quatro dias e permaneceram nas bandejas das incubadoras até a total absorção do saco vitelino.

O número de larvas produzidas por fêmea variou de 892 a 2.690, com média de $1.780 \pm 728,9$ sendo que durante a coleta houve uma perda considerável de ovos no momento da captura das fêmeas, principalmente da fêmea n^o 8 que liberou grande parte dos ovos dentro da hapa.

A TABELA 12 mostra o acompanhamento da reprodução e mostra os dados dos reprodutores antes e depois da desova e apresenta um registro de coleta e incubação ovos e estocagem de larvas colaborando para facilitar o armazenamento de dados e informações importantes para comparações com gerações futuras.

O acompanhamento das taxas de sobrevivência de cada prole foi realizado a partir da transferência para as hapas de cultivo. A sobrevivência das proles foi bem semelhante variando de 80 a 96%, isto provavelmente ocorreu devido o ambiente ter sido o mesmo para todas já que foram transferidos para hapas montados no mesmo viveiro. A sobrevivência final foi de 93%, 90%, 87%, 80% e 96% para as proles 01, 02, 03, 04 e 05 respectivamente.

Os maiores índices de mortalidade ocorreram durante as transferências realizadas nas repicagens de hapas. Esta similaridade entre as proles em

relação à sobrevivência oferece a possibilidade de ser utilizado como indicador de ausência de interferência genética negativa como redução na variabilidade. Por outro lado foi observado para cada prole defeitos no opérculo, deformidade da coluna vertebral e boca sendo que estas deformidades foram mais elevadas nas proles 01 e 05. MELO *et al.* (2006) afirmam que a redução da variabilidade genética pode causar efeitos, tais como reduzir a capacidade que um estoque possui para se adaptar a diferentes condições ambientais como também causar a depressão por endogamia, o que limita o potencial de ganho genético em futuros trabalhos de seleção e melhoramento.

TABELA 12 - Descrição de reprodução, coleta de ovos e estocagem de larvas de tilápias.

| HAPA Nº | PEIXE Marca Nº | ANTES DE DESOVAR | | | | DEPOIS DE DESOVAR | | | COLETA DE OVOS E ESTOCAGEM DE LARVAS | | | | | |
|------------|----------------------|------------------|------------------------|----------------|----------------------|-------------------|-------------------------|----------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------|--------------------------|-------------------|
| | | Peso (g) | Comp. total (cm) | Altura (cm) | Estagio maturação | Peso (g) | Comp. Padrão (cm) | Altura (cm) | Nº de vezes de desova | Data da coleta | Dias de incubação | Nº de larvas | Tanque berçário Nº | Data estocagem |
| 1 | ♂3 | 760 | 35,5 | 11,5 | - | 780 | 35,5 | 11,5 | - | - | - | - | - | - |
| | ♀8 | 720 | 34 | 10 | PD | 700 | 34 | 10 | 2 | 19/01/06 | 4 | 892 | 1 | 27/01/06 |
| | ♀2 | 500 | 32 | 9,5 | I | 520 | 32 | 9,5 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | ♂8 | 640 | 34,5 | 10,5 | - | 640 | 34,5 | 10,5 | - | - | - | - | - | - |
| | ♀3 | 760 | 35 | 10,6 | PD | 740 | 35 | 10,6 | 2 | 23/01/06 | 2 | 2690 | 3 | 28/01/06 |
| | ♀7 | 960 | 37 | 12 | I | 940 | 37 | 12 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | ♂9 | 460 | 30 | 9,5 | - | 480 | 30 | 9,5 | - | - | - | - | - | - |
| | ♀5 | 800 | 36,5 | 11 | PD | 760 | 36,5 | 11 | 2 | 25/01/06 | 3 | 1200 | 4 | 31/01/06 |
| | ♀9 | 600 | 33 | 9,5 | I | 620 | 33 | 9,5 | - | - | - | - | - | - |
| 4 | ♂4 | 460 | 32 | 10 | - | 460 | 32 | 10 | - | - | - | - | - | - |
| | ♀4 | 800 | 33 | 9,5 | PD | 780 | 33 | 9,5 | 2 | 19/01/06 | 4 | 2151 | 5 | 27/01/06 |
| | ♀10 | 780 | 36,5 | 10 | I | 780 | 36,5 | 10 | - | - | - | - | - | - |
| 5 | ♂2 | 720 | 36 | 11 | - | 740 | 36 | 11 | - | - | - | - | - | - |
| | ♀6 | 720 | 34,5 | 10,5 | PD | 680 | 34,5 | 10,5 | 2 | 25/01/06 | 3 | 1967 | 8 | 31/01/06 |
| | ♀11 | 560 | 34 | 10 | I | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Média | 682,7 | 34,2 | 10,3 | - | 687,1 | 34,3 | 10,4 | - | - | - | 1780 | - | - |
| | Desv. Padrão | ±143,0 | ±2,0 | ±0,8 | - | ±133,0 | ±2,0 | ±0,8 | - | - | - | ±728,9 | - | - |

Os resultados de crescimento de cada prole depois de 128 dias de cultivo, desde o tanque berçário até as hapas de crescimento estão mostrados nas TABELAS 13 e 14.

No presente trabalho, sob as mesmas condições de cultivo, ocorreu um crescimento em peso diferenciado para as proles 02 e 04 em relação às demais. Este fato leva a acreditar em alguma interferência que não está relacionada a alimentação. A redução do crescimento pode ocorrer por vários motivos e entre estes estão as questões genéticas, ambiental e nutricional. De acordo com MOREIRA (1999), o aumento de alelos recessivos produz uma tendência geral de diminuir a viabilidade, a sobrevivência, o crescimento e a produção em geral, além de incrementar a taxa de anormalidades.

A variabilidade genética é um requisito inicial para a aplicação da seleção, e, portanto, o conhecimento desta nas populações é o primeiro passo para um programa de melhoramento (ASTOLPHI, 2003). Partindo desse princípio o mesmo autor sugere um estudo mais detalhado envolvendo herdabilidade e variabilidade genética para certificar a ausência de problemas de genéticos e fornecer base para um programa de seleção.

TABELA 13 - Peso médio dos alevinos de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) variedade chitralada, estocadas nas Hapas de crescimento durante 128 dias de cultivo, no Centro de Pesquisas em Aqüicultura – CPA/DNOCS.

| Dias de cultivo | Peso(g) | | | | |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Prole 1 | Prole 2 | Prole 3 | Prole 4 | Prole 5 |
| 23 | 0,5 | 0,4 | 0,2 | 2,3 | 0,2 |
| 65 | 4,8 | 12,4 | 3,7 | 39,6 | 5,0 |
| 128 | 80,0 | 154,1 | 65,5 | 103,4 | 72,7 |

TABELA 14 - Peso médio dos alevinos, machos e fêmeas, de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) variedade chitralada, estocadas nas hapas de crescimento durante 128 dias de cultivo, no Centro de Pesquisas em Aqüicultura – CPA/DNOCS.

| Prole | Peso (g) | |
|---------------|----------|-------|
| | ♂ | ♀ |
| 01 | 90,0 | 70,0 |
| 02 | 184,2 | 124,0 |
| 03 | 87,9 | 43,1 |
| 04 | 109,8 | 97,1 |
| 05 | 93,2 | 52,3 |
| Média | 113,0 | 77,3 |
| Desvio Padrão | ±40,7 | ±33,2 |

5.8 – Coleta de sangue e extração de DNA

O procedimento de coleta de sangue da base da nadadeira anal foi realizado de maneira fácil e rápida. De todos os espécimes foi coletada a quantidade de sangue desejável (5mL) para realização da extração de DNA. Após a coleta, o sangue foi colocado em tubos de microcentrífuga e congelado. Foi verificado, de forma não intencional, que depois de passar pelo processo de congelamento, a etapa de centrifugação, do protocolo de extração de DNA, foi facilitada quanto à com separação das fases aquosa (superior) e orgânica (inferior).

As concentrações de DNA das amostras obtidas para as tilápias das três gerações (2002, 2005, 2007) foram estimadas pela medida da absorbância a 260 nm. A razão das absorbâncias a 260nm e 280nm variou de 1,23 a 2,22 para o estoque de 2002 e de 1,22 a 2.29 para o estoque de 2005, já para o estoque de 2007 esta razão variou de 1,60 a 2,02. As concentrações médias de DNA variaram

de 6,00 a 23,10 $\mu\text{g/mL}$ para o estoque de 2002, enquanto que a geração de 2005 essa concentração variou de 9,45 a 39,00. A variação da concentração do estoque de 2007 foi de 6,75 a 17,40 (TABELA 15).

TABELA 15 – Concentrações de DNA genômico das gerações de reprodutores de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de 2002,2005 e 2007 do Departamento Nacional de Obras contra as Secas – DNOCS.

| Amostra | Sexo | Razão (A_{260}/A_{280}) | Concentração * (μg de DNA/mL) |
|---------------|------|-----------------------------|--|
| 01/02 | ♀ | 1,788 | 17,70 |
| 02/02 | ♀ | 1,980 | 15,45 |
| 03/02 | ♀ | 2,222 | 6,00 |
| 04/02 | ♀ | 1,670 | 22,05 |
| 05/02 | ♀ | 1,961 | 15,00 |
| Média | | 1,924 | 15,24 |
| Desvio Padrão | | $\pm 0,209$ | $\pm 5,87$ |
| 06/02 | ♂ | 2,133 | 9,60 |
| 07/02 | ♂ | 1,812 | 23,10 |
| 08/02 | ♂ | 1,689 | 11,40 |
| 09/02 | ♂ | 1,230 | 12,00 |
| 10/02 | ♂ | 1,674 | 11,55 |
| Média | | 1,707 | 13,53 |
| Desvio Padrão | | $\pm 0,325$ | $\pm 5,43$ |
| 01/05 | ♀ | 1,818 | 33,00 |
| 02/05 | ♀ | 1,554 | 38,70 |
| 03/05 | ♀ | 1,672 | 29,10 |
| 04/05 | ♀ | 1,870 | 12,90 |
| 05/05 | ♀ | 1,809 | 11,40 |
| Média | | 1,744 | 25,02 |
| Desvio Padrão | | $\pm 0,129$ | $\pm 12,25$ |
| 06/05 | ♂ | 1,811 | 14,40 |
| 07/05 | ♂ | 1,968 | 9,45 |
| 08/05 | ♂ | 2,286 | 16,80 |
| 09/05 | ♂ | 1,595 | 39,00 |
| 10/05 | ♂ | 1,218 | 27,90 |
| Média | | 1,776 | 21,51 |
| Desvio Padrão | | $\pm 0,401$ | $\pm 11,88$ |
| 01/07 | ♀ | 1,690 | 14,70 |
| 02/07 | ♀ | 1,737 | 9,90 |
| 03/07 | ♀ | 1,756 | 17,40 |
| 04/07 | ♀ | 1,759 | 7,80 |
| 05/07 | ♀ | 1,600 | 15,60 |
| Média | | 1,708 | 13,08 |
| Desvio Padrão | | $\pm 0,066$ | $\pm 4,05$ |
| 06/07 | ♂ | 1,597 | 14,85 |
| 07/07 | ♂ | 1,711 | 9,75 |
| 08/07 | ♂ | 1,870 | 17,40 |
| 09/07 | ♂ | 1,956 | 6,75 |
| 10/07 | ♂ | 2,018 | 16,95 |
| Média | | 1,830 | 13,14 |
| Desvio Padrão | | $\pm 0,174$ | $\pm 4,69$ |

As preparações de DNA das tilápias a partir de tecido sanguíneo apresentaram grau de pureza de acordo com a razão A_{260}/A_{280} , em geral, acima de 1,7 para as três gerações de reprodutores. SAMBROOK *et al.* (1998) afirmaram que a razão A_{260}/A_{280} de uma solução de DNA genômico deve ser maior que 1,75, indicando que a amostra está relativamente livre de contaminação com proteínas. Os valores da referida razão obtidos no presente trabalho foram semelhantes às encontradas por POVH *et al.* (2005) e LIMA (1999) para amostras de DNA de tilápias extraídas a partir tecidos das nadadeiras e de sangue e parâmetros de qualidade, indicando que não houve excesso de proteína que possa prejudicar possíveis ampliações em trabalhos futuros.

O rendimento de DNA obtido do sangue de todas as tilápias analisadas, estimadas pela medida de absorbância A_{260}/A_{280} foi bastante satisfatória demonstrando que a extração de DNA a partir de quantidades mínimas de sangue (0,5mL) é eficiente oferecendo a grande vantagem de não haver a necessidade de sacrificar o animal.

6. CONCLUSÕES

Para o objetivo I pode-se concluir que:

De acordo com testes realizados foi possível verificar a viabilidade de um conjunto de protocolos para tilápia *Oreochromis niloticus* e adaptá-los, quando necessário, às condições do Centro de Pesquisa em Aqüicultura – CPA/DNOCS. O conjunto de protocolos constatou que:

- O Eugenol é um anestésico eficiente no manejo de tilápias;
- O peso ideal para sexagem de tilápia sem oferecer riscos de erros é de no mínimo 25g;
- A amputação do espinho da nadadeira dorsal como método de marcação de tilápia é viável desde que seja realizada uma renovação periódica;

Para o objetivo II concluiu-se que:

- O acompanhamento de reprodutores com contagem de ovos e qualidade do sêmen pode ser determinante para alcançar uma boa produção de alevinos.
- O sêmen de tilápia pode permanecer por mais de 24 horas sob refrigeração e manter motilidade espermática adequada para fertilização.
- A criopreservação de sêmen de tilápia mostrou-se viável e pode ser realizado no Centro de Pesquisa em Aqüicultura mesmo que em curto prazo.
- Foi formado um banco de DNA de qualidade a partir de amostras dos plantéis de reprodutores de 2002, 2005 e 2007.
- Reprodução em hapas na proporção de 1 macho para 2 fêmeas é ideal quando se deseja ter um total controle dos reprodutores e das proles geradas.

As conclusões para o objetivo III foram:

Proposta da seguinte metodologia para implantação de um programa de melhoramento genético de tilápia *O. niloticus* no Centro de pesquisa em aqüicultura:

- a) Selecionar e preparar as instalações mínimas requeridas para um programa de melhoramento genético que consta de 1 viveiro de reprodução, 1 viveiro de criação, 1 viveiro de crescimento, 2 tanques raceway e 25 tanques circulares de alvenaria com capacidade para 2000 litros;
- b) Verificar a variabilidade genética do plantel atual, exigência primordial para implantação de um programa de seleção;
- c) Preparar as instalações (secar viveiros, fazer assepsia e fertilização) e montar 25 hapas (1,2x1x1m) de reprodução;
- d) Selecionar os reprodutores (25 machos e 50 fêmeas) com peso médio entre 150 a 250g de acordo com o estágio de maturação da fêmea e efetuar marcações individuais;
- e) Estocar os reprodutores na proporção de 1 macho para 2 fêmeas, com tamanhos e pesos proporcionais nas hapas de reprodução;
- f) Coletar ovos incubados e levar para o sistema de incubadoras já disponíveis no CPA e transferir os reprodutores para descanso em tanque raceway;
- g) Transferir as larvas para tanques de alvenaria onde permanecerão por 21 a 30 dias;
- h) Preparar viveiro e montar hapas de criação (25 hapas de 10x1x1m);
- i) Transferir alevinos dos tanques para hapas de crescimento;
- j) Realizar sexagem, marcação e seleção aleatória de reprodutores potenciais;
- k) Transferir esses reprodutores potenciais para viveiro de crescimento.

Todos esses passos devem ser seguidos de biometrias e coleta dos caracteres morfométricos e merísticos para comparação com gerações futuras e monitoramento genético dos plantéis.

7 - TRABALHOS FUTUROS

Diante do exposto, este estudo sugere as seguintes propostas para futuros trabalhos:

- Testar a eficiência do eugenol (óleo de cravo) como anestésico para tilápia e outras espécies, ampliando o número de animais testados. O Eugenol não apresenta efeitos negativos aparentes quando utilizado como anestésico para tilápias o que o torna um produto com potencial para ser utilizado durante o manejo.
- Avaliar a variabilidade genética das gerações de reprodutores de 2002, 2005 e 2007, uma vez que o conhecimento da variabilidade genética do plantel é fundamental para implantação de um programa de melhoramento genético. Este trabalho poderá fornecer dados de perdas ou ganhos genéticos entre as gerações e possibilitará ao Centro de Pesquisa – CPA/DNOCS conhecer a qualidade de seu plantel de reprodutores de tilápias.
- Executar o monitoramento genético, com uso de marcadores, dos plantéis de reprodutores do CPA/DNOCS, a fim de detectar possíveis problemas causados por consangüinidade, hibridação, heterose ou semelhança genética dentro dos plantéis de reprodutores.
- Estimar a variabilidade genética dos plantéis das diferentes fazendas que adquiriram reprodutores de tilápia (*Oreochromis niloticus*) através do Centro de Pesquisa em Aqüicultura-CPA/DNOCS, já que grande parte dos plantéis de reprodutores existentes no Ceará é proveniente do mesmo lote de tilápias Tailandesas importadas em 2002 pelo DNOCS. O resultado deste trabalho

fornecerá informações de grande utilidade para os produtores do estado para alertar à necessidade de programas de manejos genéticos do plantel;

- Pesquisar marcadores moleculares do tipo RAPD adequados para monitorar geneticamente os plantéis de reprodutores. O conhecimento de marcadores adequados para qualidades específicas da tilápia fornecerá valiosos subsídios para a manutenção da qualidade genética dos reprodutores;

- Implantar um programa de manejo genético do plantel de reprodutores de tilápia do Centro de Pesquisa em Aqüicultura tendo em vistas que, o monitoramento genético é muito importante para conservação da qualidade genética do plantel. A implantação de um programa de manejo genético contribuirá de forma efetiva para reduzir efeitos indesejáveis da consangüinidade;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIT. ASIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY. Procedimentos para produção de tilápias em hapas. **Bol. Tec.** Bangkok, Tailândia. 2003.
- ALAVI S, M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I. Effects of pH and temperature. **Cell Biology International**. v. 29, p. 101–110, 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I. Effects of ions and osmollaity. **Cell Biology International**. v. 30, p.1–14, 2006.
- ALAVI, S.M.H.; RODINA. M.; POLICAR, T.; KOZART, P.; PSENICKA, M.; LINHART, O. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**. v. 68, p. 276–283, 2007.
- APPLEYARD, S. A.; MATHER, P. B. Investigation into the mode of inheritance of alloenzyme and Tandom Amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Aquac. Res.**, Oxford, v. 31, p. 435-445, 2000.
- ADB - ASIAN DEVELOPMENT BANK. Impact Evaluation Study on the Development of Genetically Improved Farmed Tilapia and Their Dissemination in Selected Countries. February 2005.
- ASTOLPHI, J. L. L. Avaliação da diversidade genética entre a geração parental e sua progênie selecionada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada com uso de marcador de RAPD. 2003. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Departamento de Zootecnia Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- BARAS, E. Functional implications of early sexual growth dimorphism in vundu. **Journal of Fish Biology**, v. 54 (1): p. 119-124, 1999.
- BASIAO Z. U. & DOYLE R. W. Test of size-specific mass selection for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., cage farming in the Philippines. **Aquaculture Research**. v. 30, p.373-378, 1999.
- BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R. Peixes de importância para a piscicultura brasileira. Disponível em:
< www.nucleoestudo.ufla.br/naqua/publicações/boletins > acessado em 02/07/07.
- BILLARD, R. Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **J Reprod Fert**. v. 68: p. 77e 84, 1983.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v. 236, p.1-9, 2004.

- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. et al. Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. London: **Blackwell Science**. p. 25-52, 1995.
- BOLIVAR R. B. & NEWKIRK G. F. 2002. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. **Aquaculture**. v. 204, p. 371-381.
- CAJADO, F. J. L. Avaliação dos procedimentos de introdução de tilápias tailandesas (*Oreochromis niloticus* var chitralada) no Estado do Ceará. 2004. p. 3. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia de Pesca – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2004.
- CARNEIRO, P.C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS-FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. 2006. In: Paulo César Falanghe Carneiro Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes.. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007. Disponível em www.cbra.org.br. Acessado em 09/04/07.
- CHAO, N-H.; CHAO, W-C.; LIU, K-C. et al. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. **Journal of Fish Biology**, v.30, p.107-118, 1987.
- CHARO-KARISA, H.; KOMEN H.; REYNOLDS, S.; REZK, M.; PONZONIR, R. W.; BOVENHUIS, H. Genetic and environmental factors affecting growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles: Modelling spatial correlations between hapas. **Aquaculture**. v. 255, 586–596, 2006.
- CIEREZKO, A.; DABROWSKI, K. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.12, n.5, p.357-367, 1994.
- COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA C.S.; SAMPAIO, B. M.; RODRIGUES, S. G.; ALVES, C. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.56 no.1 Belo Horizonte. feb. 2004
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aqua Int**. v. 12: p. 69–85, 2004.
- CRUZ, V.L.B. Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*). 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte 2001.

- DAVID, R.E., WIRATANEN, L.J., TERNES, M.A. Cryopreservation of sperm of apache trout. 2000. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic Species. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, p. 104–107.
- DEY, M. M.; GUPTA, M.V. Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Ásia: an introduction. **Aquac. Econ. Manag.**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 5 – 11, 2000.
- DNOCS. Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. **Relatório Interno da Importação de Tilápias tailandesas**. 2003.
- EKNATH A. E., TAYAMEN M. M., PALADA-VERA M. S., DANTING J. C., REYES R. A., DIONISIO E. E., CAPILI J. B., BOLIVAR H. L., ABELLA T. A., CIRCA A. V., BENTSEN H. B., GJERDE B., GJEDREM T. & PULLIN R. W. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. 1993. In: ROMANA-EGUIA et al. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. *Aquaculture Research*, p. 36, 69-78, 2005.
- EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v. 179, p. 149-168. 1999.
- FALCONER D. S. & MACKAY T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**, 4 ed. Longman, Harlow, UK. 1996.
- FAO - State of World Aquaculture - Rome, 2006. 14 p.
- FAOSTAT. 2004. Fisheries Data. disponível em: < <http://faostat.external.fao.org/faostat/collections?subset=fisheries> > acessado em: 09/03/ 07. Rome, FAO.
- FARIA, R. H. S.; SOUZA, M. L. R.; RIBEIRO, R. P.; FÜLBE, V. M. Avaliação de diferentes posições de marcação externa em juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. Maringá, v. 25, no. 2, p. 273-276, 2003.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; ZONNO, V.; MENU B. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. **Aquatic Liv Res**, v.11, p.387-394, 1998.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, pp220.
- FISHBASE: Catalogue of life: 2007. Disponível em < <http://www.fishbase.org/> > Acessado em 05/08/07.

- FLETCHER, D. E. Male ontogeny and size-related variation in mass allocation of bluenose tright shiners (*Pteronotropis welaka*). **Copeia**, v. 2: p. 479-486. 1999.
- FRYER, G. & ILES, T. D. 1972. The cichlid fishes of the Great Lakes of África: Their biology and evolution. Oliver and Boyd, Edingurgh. p. 642. 1972.
- GJOEN H. M. GIFT program continues. Distribution of fast-growing tilapia to expand. 2001. In: ROMANA-EGUIA et al. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsateletes. **Aquaculture Research**,. v. 36, p. 69-78. 2005.
- GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico **R. Bras. Zootec.** v. 32 no.6 Viçosa Nov./Dec. 2003.
- GRAEFF A.; AMARAL H. Produção de juvenis de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) em tanque-rede como opção economica para regiões de clima desfavoravel para engorda anual. III Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Comunicación Científica *CIVA 2004 Disponível em: <http://www.civa2004.org>* p. 190-196. Acessado em: 02/07/07.
- GRAMITTO, M. E.; COEN, B. New records of *Bellottia apoda*(Bythitidae) in the Adriatic Sea with notes on morphology and biology. **Cybium**, v. 21 (2): p. 163 - 172. 1997.
- GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology** v. 57, p. 1453 – 1464. 2000.
- GUÉNETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON; P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Aquaculture**. v. 266, p. 262 – 265, 2007.
- GURGEL, J. J. S. Potencialidade do cultivo de tilápia no Brasil. In: Congresso **nordestino de Produção Animal**, 1. *Anais...* Fortaleza, 06-11 de dezembro. p. 345 - 352. 1998.
- HARPER, C., Status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish. **Aquaculture Magazine**. v. 29 (6), p. 41– 42, 2003.
- HARVEY, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture**. v.32, p.313 - 320, 1983.
- HARVEY, B.J.; KELLEY, R.N. Practical methods for chilled and frozen storage of tilapia spermatozoa. In: Internacional Symposium on Tilapia Aquaculture, 1988, Bangkok, Manila. Proceedings... Bangkok: Departament of Fisheries and International Center for Living Aquatic Resources Management, 1988. p.623.

- HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge, Louisiana: **World Aquaculture Society**, p.332 - 337. 2000.
- HARVEY, B; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. 1993. In: CARNEIRO, P. C. F. *Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes*. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007. Disponível em: < www.cbra.org.br >. Acessado em 03/07/07.
- HASTINGS, P. A. Ontogeny of sexual dimorphism in the angel blenny, *Coralliozetus angelica* (Blennioidei: Chaenopsidae). **Copeia**, v. 4, p. 969 - 978, 1991.
- HEDRICK, P.W., MILLER, P.S., Conservation genetics: techniques and fundamentals. 1992. In: HEDRICK, P.W. *Recent developments in conservation genetics*. **Forest Ecology and Management**. v. 197 p. 3 – 19. 2004.
- HEDRICK, P.W. *Recent developments in conservation genetics*. **Forest Ecology and Management**. v. 197, p. 3 – 19. 2004.
- HINES, R.; YASHOV, A. Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil cephalus* Cuvier, a grey mullet. **Aquaculture**. v. 3:p. 123 - 32. 1971
- HORVÁTH, A.; MISKOLCZI, E.; URBANIA B. Cryopreservation of common carp sperm *Aquat*. **Living Resour**. v. 16 p. 457 – 460. 2003.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Estatística da pesca 2005*. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 98 p., 2007.
- ICLARM . International Center for Living Aquatic Resources Management. *Manual on: Genetic Improvement of Farmed Tilapia (GIFT) Research Methodologies*. vol. 1. Revised version. Filipinas. 1998.
- INGERMANN, R.L.; HOLCOMB, M., ROBINSON, M. L.; CLOUD, J. G. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **J Exp Biol**; v. 205, p. 2885e90. 2002.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R.S.; ALIASSEN, R.A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aquistm and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**. v. 221, p. 549–556. 2003.
- KILDEA, M.A.; ALLAN, G.L.; KEARNEY, R.E., Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUIS from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**. v. 232 p. 265 – 277. 2003.

- KOH, T. L.; KHOO, G.; FAN, K. Q.; PHANG, V. P. E. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of *Discus* (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 173, p. 485-497, 1999.
- KONG, L.; KOHNO, H.; FUJITA, K. Reproductive biology of konoshiro gizzard shad, *Konosirus punctatus*, in Tokyo Bay. **Journal of the Tokyo University of Fisheries**, v. 85, p. 97-107. 1998.
- KORNFELD, I. 1984. Descriptive genetics of Cochlid fishes. In: LIMA, F. M. Estudo da variabilidade genética através de marcadores moleculares do tipo RAPD em algumas espécies e híbridos de tilápias (pisces, Cichlidae). 1999. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.
- KOVÁCS, G. Tecnologia da criopreservação do sêmen de peixes. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Obras contra as Secas – DNOCS/AGROBER. Fortaleza. 1990.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí. F. Kubitza, 2000. 285p.
- LACERDA, S. M. S. N. Transplante de espermatogônias: A tilápia – nilótica (*oreochromis niloticus*) como modelo experimental. 2006. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biológicas . UFMG. Belo Horizonte. 2006.
- LAHAV, E., RA'NAN, Z. Salinity tolerance of genetically produced tilapia (*Oreochromis*) hybrids. **Isr. J. Aquac.** v. 4 p.160 -165. 1997.
- LAND, D.; CUNNINGHAM, M.; LOTZ, M.; SHINDLE, D. 2001. In: Hedrick, P.W. Recent developments in conservation genetics. **Forest Ecology and Management** . v. 197. p. 3 – 19. 2004.
- LAZARD, J., ROGNON, X. Genetic diversity of tilapia and aquaculture development in Côte 'Ivoire and Niger. **Isr. J. Aquac.**, v. 49. p. 90-98. 1997.
- LEBOUTE, E. M. *et al.* Técnica simples de marcação externa de reprodutores de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n. 1, p.1-5, 2002.
- LEE, K.G., SHIBAMOTO, T., Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds (*Syzygium aromaticum* L.). **Food Chemistry**. v. 74, p. 443 – 448. 2001.
- LIMA, F. M., Estudo da variabilidade genética através de marcadores moleculares do tipo RAPD em algumas espécies e híbridos de tilápias (pisces, Cichlidae). 1999. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

- LINHART, O.; RODINA, M.; FLAISHANS, M.; GELA, D.; KOCOUR, M. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**. v. 51 p. 250–261. 2005.
- LITTLE, D.C.; BHUJEL, R.C.; PHAM, T.A., Advanced nursing of mixed-sex and mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry, and its impact on subsequent growth in fertilized ponds. **Aquaculture** v. 221, p. 265 – 276. 2003.
- LITTLE, D.C., LIN, C.K., TURNER, W.A. Commercial scale tilapia fry production in Thailand. **World Aquac.** v. 26 p. 20–24. 1995.
- LITTLE, D.C. K. Coward b, R.C. Bhujel a, T.A. Pham a,c, N.R. Bromage Effect of broodfish exchange strategy on the spawning performance and sex steroid hormone levels of *Oreochromis niloticus* broodfish in hapas. **Aquaculture** v. 186. p. 77 – 88. 2000.
- LOVSHIN, L.L. Sumário dos métodos para cultivo de tilápias. Fortaleza, DNOCS, 1976. 5p.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In: **Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes**. Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: v. 1. 1997, p.137-164.
- LOVISHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P 1998. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: **Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes**. Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: v. 2. CBNA, 1998. p. 1 - 20.
- MADSEN, T.; SHINE, R.; OLSSON, M.; WITTELL, H. Restoration of an inbred adder population. **Nature**. v. 402, p. 34–35. 1999.
- MAIR G. C., ABUCAY J. S., BEARDMORE J. A. & SKIBISNKI D. O.F. Growth performance trials of genetically male (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L. On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. **Aquaculture**. v. 137, p. 313 -322. 1995.
- MAIR G. C., ABUCAY J. S., BEARDMORE J. A. & SKIBISNKI D. O.F., ABELLA T. A. & BEARDMORE J. A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* L. in: In: ROMANA-EGUIA et al. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatelites. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 69-78. 2005.
- MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. P.; LOGATO, P. V.R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887), **Ciênc. agrotec.**, v. 28, n. 1, p. 191-194, jan./fev., 2004.

- MARTINI, H.; WEIDENBÖRNER, M.; ADAMS, S.; KUNZ, B. Eugenol and carvacol: the main fungicidal compounds in clove. **Italian Journal of Food Science**. v. 1, p. 63–67. 1996.
- MATHER, P. B. 2001. Overview of fish genetics research at Queensland University of Technology, In: POVH, J. A. et al Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v. 27. no. 1. Jan/March, 2005.
- MAUGER, P. E.; LE BAIL, P.Y.; LABBÉ, C. Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation Comparative Biochemistry and Physiology. **Part B** v. 144, p. 29–37. 2006.
- McCONNELL, S.K.J.; BEYNON, C.; LEAMON, J. et al. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. **Anim. Gen.** v.31, p.214-218, 2000.
- McINTYRE, T.M.; HUTCHINGS, J.A. Small-scale temporal and spatial variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) life history. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 60, p. 1111 –1121. 2003.
- MELO D. C., OLIVEIRA D. A. A., RIBEIRO L. P., TEIXEIRA C. S., SOUSA A. B. COELHO E.G.A., CREPALDI D. V. TEIXEIRA E. A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arq. Bras. Med. Vet. zootec.** v. 58 no. 1 Belo Horizonte Feb. 2006.
- MONGKONPUNYA, K.; PUPIPAT, T.; TIERSCH, T.R. Cryopreservation of sperm of asian catfishes including the endangered mekong giant catfish. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic Species. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, pp. 108–116. 2000.
- MOREIRA, H. L. M. Genética e melhoramento de peixes In: MOREIRA; H. L. M. et al. Maringá. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: ULBRA, 2001. p. 135 – 147.
- MOREIRA, H. L. M. Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites. 1999, 112f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1999.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.
- MURRAY, M. G. & THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 8. p. 4321 – 4325, 1980.

- MUTR, J.F.; ROBERTS, R.J. Recent advances in aquaculture IV. Cambridge: **Blackwell Scientific Publications**, 1993. p.15-18.
- NEAT, F. C.; HUNTINGFORD F. A.; BEVERIDGE, M. M. C. Fighting and assessment in male cichlid fish: the effects of asymmetries in gonadal state and body size. **Anim. Behav.** v. 55, p. 883-891.1998.
- OHTA, H.; IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, v.142, p.107-118, 1996.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; PEDINI, M. Situação atual da aquicultura brasileira e mundial. In: *Aqüicultura no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília. CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia. 2000. Cap. 12. p.353-381.
- PALIC D.; HEROLT, D. M.; ANDRASEN, C. B.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**. v. 254 p 675–685, 2006.
- PANAMÁ MAPAS. Disponível em: <
www.webpanama.net/geografia/mapamundi.htm> acessado em: 08/07/07.
- PERCHEC-POUPARD, G, GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **J Reprod Fétil.** v. 110, p. 315e27. 1997
- POPMA, T.J., GREEN, B.W. Sex Reversal of Tilapia in Earthen Ponds. International Center for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. **Research and Development Series** n. 35, 1990.
- POPMA, T.J., PHELPS, R.P. 1998. Status report to commercial tilapia producers on monosex x fingerling production techniques. In: *Anais do Aquaculture'98*, 1:127-145. 1998.
- POVH, J. A. et al. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. V. 27. no. 1. Jan/March, 2005.
- RAPP PY-DANIEL L.; COX FERNANDES, C. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. **Acta Amazônica** v. 35, p. 97 – 110, 2005.
- RANA, K.J.; McANDREW, B.J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture**, v.76, p.335-345, 1989.

- REDONDO- MULLER, C.; COSSON, M. P.; COSSON, J.; BILLARD, R. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. **Mol Reprod Dev.** v. 29, p. 259 e 70. 1991;
- RIBEIRO, R.I.M.A.; GODINHO, H.P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus* **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55 no.1 Belo Horizonte Feb. 2003.
- RIDEOUT, R.M.; BURTON, M.P.M. Peculiarities in ovarian structure leading to multiple-year delays in oogenesis and possible senescence in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Can. J. Zool.** v. 78, p. 1840– 1844. 2000.
- ROMANA-EGUIA M. R. R., IKEDA M., BASIAO Z. & TANIGUCHI N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 69-78. 2005,
- ROSS, G.L., ROSS, B.R., 1999. Stress in aquatic animals, In: Ross, G.L. (Ed.), 2nd edition. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals, vol. 77. **Blackwell Science**, Ltd., Bodmin, Cornwall, pp. 5–21.1999.
- ROUBACH, R., GOMES, L. C. O uso de anestésico durante o manejo de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v, 11. p. 37-40. 2001
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTANA, G.M. Avaliação do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após 6, 18 e 24 horas de resfriamento à temperatura de 4°C. In: Congresso de Iniciação Científica da UFLA. - CICESAL, 9., 1998, Lavras. Resumos... Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1998. 272p.
- SAVENIJE, B.; SCHREURS, F.J.; WINKELMAN-GOEDHART, H.A.; GERRITZEN, M.A.; KORF, J.; LAMBOOII, E., 2002. Effects of feed deprivation and electrical, gas, and captive needle stunning on early postmortem muscle metabolism and subsequent meat quality. **Poultry Science.** v.. 81 p. 561–571. 2002.
- SBRT – Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. disponível em: < <http://sbrt.ibicit.br/upload/sbit1615>. > Acessado em: 10/06/07.
- SCHIAFFINO-MACHADO G., DOPICO E., VAZQUEZ-GARCIA E. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. **Aquaculture.** v. 264, p. 59-65. 2007,
- SEAGRI. 2004. Secretaria de Agricultura e Irrigação do Estado do Ceará. <http://www.seagri.ce.gov.br/>. Acessado em Janeiro dezembro de fevereiro de 2005.

- SWIFT, D. R. Aquaculture Training Manual. Fishing News Books, London. 1993, p. 158.
- SMALL, C.B. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulphonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**. v. 218, p.177–185. 2003.
- STOSS, J.; DONALDSON, E.M. Preservation of fish gametes. In: Luis David Solis Murgas, Aléssio Batista Miliorini, Renan Toledo Franciscatto, Alexandre Nízio. Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.
- TACHIBANA, L. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.
- TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; CALCAGNOTTO, D; FONTELES SANTOS, S. B. A. & Benardino g. Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. Cadernos de Ictiogenética, CCS/usp. v. 4, p. 56, 1998.
- TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESCPO, S.; PADRÓS, F., 2002. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **AquacultureResearch** v. 33, p. 907–910.2002.
- VILÁ, C.; SUNDGVIST, A.K.; FLAGSTAD, O.; SEDDON, J.M.; BJORNERFELDT, S.; KOJOLA, I.; SAND, H.; WABAKKEN, P.; ELLEGREN, H., 2003. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. Proc. Roy. Soc. London B 270, 91–97. In:Hedrick, P.W. Recent developments in conservation genetics. **Forest Ecology and Management** v. 197 p. 3–19. 2004.
- VIVEIROS, A.T.M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology** v. 54, p. 1395 – 1408, 2000.
- WEISING, K. NYBOM, H,; WOLFF, K. & MEYER, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC press, Boca Raton.
- WESTEMEIER, R.L.; BROWN, J.D.; SIMPSON, S.A.; ESKER, T.L.; JANSEN, R.W.; WALK, J.W.; KERSHNER, E.L.; BOUZAT, J.L.; PAIGE, K.N. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. **Science** v.282, 1695–1698. 1998.
- WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**. v. 60, p. 340–347. 2002.

WORLD FISH CENTER. GIFT Thecnology MANUAL: An aid to tilapia selective breeding. 2004. WORLD FISH CENTER. Penang, Malasia. 56 p.

YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G.P. et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquacultures**. v. 181. p. 361 – 375. 2000.

ZIMMERMANN, S. Incubação Artificial. Técnica permite a produção de Tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p. 15-21, julho/agosto 1999.

ZIMMERMANN, S. Bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Revista Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.10 n.60 p.15-19, 2000.