

MODELO DE MANEJO E MONITORAMENTO PARA PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO DE ESPÉCIES DE PEIXES NATIVAS MIGRADORAS

Ricardo P. Ribeiro; Danilo P. Streit Jr.*; Jayme A. Povh; Rodolfo, N. Sirol; Ligia Uribe; Lauro D. M. Vargas; Nelson M. Lopeira-Bareiro; Patrícia Gomes; Melanie Digmayer

*Dep. Zootecnia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Av. Bento Gonçalves, 7712 - Porto Alegre, RS. - danilo.streit@ufrgs.br

Resumo

Experimentos foram conduzidos com o objetivo de propor um modelo que possa ser empregado na recuperação de populações de peixes migradoras, através do repovoamento, em bacias hidrográficas impactadas, utilizando como espécie modelo o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Comparou-se a taxa de fertilização, a mortalidade de reprodutores durante e após o manejo reprodutivo e a variabilidade genética dos parietais e da progênie provenientes de dois sistemas reprodutivos. Avaliou-se o sêmen congelado quanto a sua qualidade pré e pós-criopreservação. O sistema semi-natural mostrou ser mais eficiente quando da fertilização dos ovócitos, na recuperação de matrizes e na manutenção da variabilidade genética do *P. mesopotamicus*. O sêmen pós-descongelamento mostrou sensível perda de qualidade, quanto aos parâmetros seminais avaliados.

Introdução

Inúmeros fatores provocam impacto de alguma maneira nas populações de peixes migradores nativos no Brasil, como; poluição crescente, desmatamento ciliar, assoreamento de lagoas marginais e os processos erosivos decorrentes da exploração agrícola comercial (Torloni, 1986). Ainda podem ser somados pressão das populações humanas ao entorno de uma bacia hidrográfica, pesca amadora e profissional (Sirol & Britto, 2005) e a construção de hidroelétricas (Martins, 2000).

De um modo geral os impactos mais expressivos sobre as populações de espécies migradoras estritamente fluvial, de acordo com Lowe-McConnel (1994) estão relacionados com a construção de barragens. Soluções mitigadoras para estes problemas são utilizados, como por exemplo, o repovoamento. Com relação ao repovoamento, Sirol e Brito (2005) reforçaram a necessidade desta ação, contemplar dentre outros estudos, da manutenção da variabilidade genética. Fato este reforçado por Gorman (2000) que sugere além da manutenção de reprodutores selvagens em cativeiro conservar a diversidade genética da população trabalhada durante a reprodução destes animais. Ou seja, o ideal é que todos reprodutores estejam representados para compor o “pool” genético da população trabalhada (Gorman, 2000; Mongkonpunya et al., 2000). Assim, a metodologia implementada para a reprodução de peixes nativos migradores utilizada em um programa de repovoamento é preponderante para o sucesso do programa.

O objetivo deste trabalho foi propor um modelo que possam ser empregado na reprodução de peixes migradores, para serem utilizados em repovoamento, e que permita a manutenção e recuperação da biodiversidade de espécies de peixes migradores, em bacias hidrográficas impactadas, utilizando como espécie modelo, o pacu (*P. mesopotamicus*).

Material e Métodos

A série de experimentos foi desenvolvida pelo grupo PeixeGen do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) em conjunto com a Estação de Hidrologia e Piscicultura da DUKE ENERGY - *Geração Paranapanema S.A* em Salto Grande, SP.

Reprodutores: Do plantel de reprodutores de *P. mesopotamicus* ($n=800$) estocado em um tanque de concreto de 1000 m² recebendo ração com 32% de proteína bruta *ad libitum*, selecionou-se, durante todo o período reprodutivo 204 animais (155 machos e 80 fêmeas). Os machos apresentavam como características sexuais reprodutivas; liberação de sêmen após leve compressão ventral e as fêmeas, ventre abaulado e orifício urogenital hiperêmico.

Sistema reprodutivo extrusado X semi-natural: Para avaliação do sistema reprodutivo, cento e sessenta ($n=160$) animais foram selecionados (80 machos e 80 fêmeas). Onde dois sistemas reprodutivos foram testados, extrusado e semi-natural, 40 casais, em cada um dos sistemas. Em cada uma das quatro semanas foram selecionados 20 casais (20 fêmeas e 20 machos), distribuídos para os dois sistemas reprodutivos 10 casais em cada sistema (extrusado e semi-natural). Após a seleção, colheu-se um fragmento de 2X2 cm da nadadeira caudal de cada um dos 160 reprodutores para posterior análise da variabilidade genética do plantel através do marcador molecular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

Nos animais submetidos a sistema de extrusão, após 240 horas grau, extrusou-se individualmente cada fêmea colhendo-se os ovócitos em bacias individuais secas e fertilizando-se em seguida com sêmen extrusado. Após acrescentar a água deixou-se em repouso por 10 minutos para em seguida encaminhar para incubadoras individuais de 7 L/d'água, cada combinação. Para cada fêmea foi utilizado um único macho.

No sistema semi-natural, após a indução hormonal colocou-se os animais em um tanque circular com 51 cm de raio e com profundidade média de 185 cm. O tanque foi abastecido por um fluxo de água contínuo de 131 L/s. Um cano de seis polegadas (fluxo de 7L/s), com registro de gaveta que funcionou escoando a água (e os ovos quando presente) para uma incubadora cilindro-cônica de 200 L/d'água. Em seguida, os ovos foram levados para as incubadoras de 7L no laboratório.

Após 18,5 horas de incubação dos ovos iniciou-se a eclosão das larvas, aonde colheu-se 90 amostras (larvas) aleatoriamente das incubadoras cônicas de 7L de cada um dos sistemas, extrusado e semi natural. As larvas foram colocadas em recipientes com álcool 70% para depois serem avaliadas quanto a variabilidade genética da progênie por RAPD. Também avaliou-se a *taxa de fertilização* e a *mortalidade durante e pós-reprodução*, registrando-se os reprodutores que porventura morreram em até 144 horas para ambos sistemas reprodutivos.

Caracterização genética: Utilizando RAPD foi obtido o quadro de similaridade genética entre todos reprodutores. A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo *loci*), foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando "1" como a presença da banda no gel e "0" como sua ausência. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, a matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average). Para esta análise

foi utilizado o programa NTSYS 1.7 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).

O status de variabilidade genética, da prole em relação ao plantel de reprodutores, foi obtido com o emprego da técnica de RAPD pelo índice de Shannon e pela porcentagem de *Loci* polimórficos, calculados pelo programa Popgen 1.31.

Banco de germoplasma. Identificação dos reprodutores - Setenta e cinco ($n=75$) reprodutores selecionados foram identificados utilizando-se um “transponder” (ID 100-A), com dimensões de 11,5mm comprimento x 2,2 mm diâmetro e frequência de operação de 128Khz. A implantação do “transponder” foi subcutânea no dorso dos reprodutores, próximo a nadadeira dorsal.

Análise do sêmen pré e pós congelação -Uma alíquota de 2 ml do sêmen foi diluída na proporção de 1:3 (sêmen/solução + crioprotetor) no diluidor gema de ovo (sem a camada perivitelínica) (20%), dimetil-sulfóxido (10%), glicose (5%) e completado para 100 ml com água destilada. As amostras homogeneizadas foram envasadas em “pallets” de 0,25 ml, produzindo-se em média, 32 “pailletts”/animal. Os “pailletts” foram estocados em um botijão com vapor de nitrogênio do tipo “dry shipper”, a -16°C . Após 18 horas no botijão “dry shipper”, as “racks” contendo as amostras de sêmen congeladas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido para estocagem, a uma temperatura de -196°C .

Onze ($n=11$) animais identificados do lote utilizado na avaliação dos sistemas reprodutivo foram utilizados. Uma amostra de sêmen de 0,50 mL de cada animal foi colhida e avaliada. Sessenta dias após a congelação os dois “paillettes” foram descongelados através da imersão em um banho-maria, à temperatura de 45°C por cinco segundos, para em seguida serem analisados. Os procedimentos realizados para análise do sêmen foram: *Motilidade progressiva e vigor espermático, espermatozóides e morfologia dos espermatozóides*.

Delineamento estatístico: Os delineamentos experimentais foram inteiramente ao acaso. Para a avaliação da taxa de fertilização no sistema reprodutivo, considerou-se uma unidade de amostra a média de cada repetição (uma por semana). Já para o sêmen avaliado pré e pós-congelação cada um dos onze animais foi considerado uma unidade de amostra. O modelo utilizado está descrito a seguir:

$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, Onde: Y_{ij} = observação do animal (j) submetido ao tratamento (i); μ = constante geral; T_i = tratamento (i); e_{ij} = erro aleatório associado ao animal (j) submetido ao tratamento (i);

Para as análises estatísticas utilizou-se o procedimento GENMOD do SAS (1992) que implementou a metodologia de MODELOS LINEARES GENERALIZADOS. Considerou-se que os erros possuíam distribuição de probabilidade de POISSON, com função de ligação logarítmica.

Resultados e Discussão

Sistema extrusado X semi-natural: A obtenção de gametas no sistema semi-natural também mostrou ser menos agressivo. Pois, em média, apenas 12,5% dos animais que liberam gametas morreram durante ou após o tratamento, enquanto no sistema em que utilizou-se a extrusão a mortalidade foi de 41,0% (Tab. 1).

Tabela 1. Número de reprodutores, machos e fêmeas de *P. mesopotamicus* que morreram em até 144 horas (48 horas durante o processo de reprodução e 96 horas após o processo de reprodução).

Semana	Sistema reprodutivo	
	Extrusado	Semi-natural
Primeira	9	2
Segunda	0	1
Terceira	7	2
Quarta	0	0
TOTAL*	16 (80)	5 (80)

*Entre parênteses significa o número de peixes por tratamento.

Ao avaliar-se a taxa de fertilização dos ovos provenientes de ambos sistemas reprodutivos ao longo do período de reprodução do *P. mesopotamicus*, notou-se um comportamento semelhante nos três primeiros períodos (semanas), com exceção da última semana. Todavia, no sistema semi-natural, a taxa de fertilização foi sempre mais elevada em relação à obtida por extrusão, no laboratório (Fig. 1).

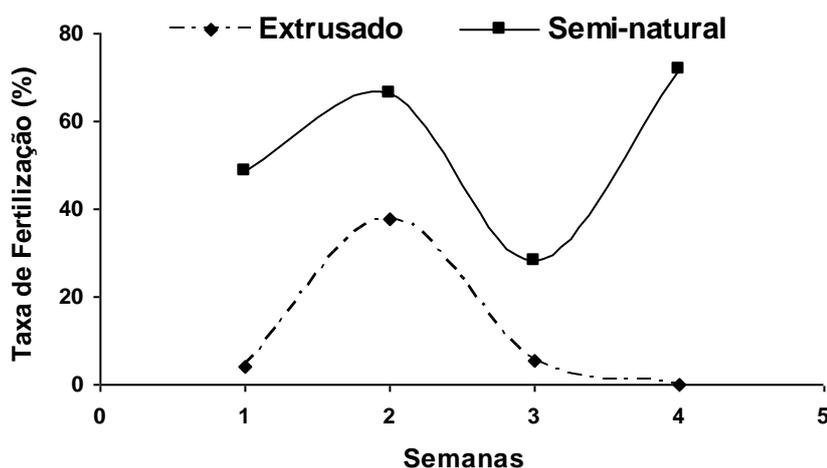


Figura 1. Taxa de fertilização observado em *P. mesopotamicus* oriundos dos sistemas reprodutivos extrusados e semi-natural, ao longo de quatro semanas (período reprodutivo). Equações das curvas, onde (S) significa semana: Extrusão: $\exp^{-4,9219+8,4243(S)-2,0753(S*S)}$; Semi-natural: $\exp^{-0,5487+7,4904(S)-3,5475(S*S)+0,4941(S*S*S)}$

A taxa de fertilização, de acordo com Brooks et al. (1997), seguramente é um parâmetro de mensuração final de avaliação da qualidade do ovo produzido. Então, neste experimento, no sistema semi-natural, a taxa média de fertilização foi 77,63 % superior em relação aos ovos proveniente dos animais extrusados. Não muito diferente comparando-se com a diferença verificada por Reynaldo-Tataje et al. (2002) de 73,03%, para a espécie *Leporinus macrocephalus* em favor da reprodução semi-natural em relação da reprodução induzida.

Para Schreck et al. (2001) a redução na sobrevivência dos reprodutores e falhas na reprodução são manifestações diretas do estresse sofrido pelo animal. Esta afirmação pode ser reforçada pelos 41,02% de reprodutores que morreram, no presente estudo durante a processo reprodutivo que se utilizou da extrusão, contra os 12,5% observados nos peixes submetidos ao processo reprodutivo semi-natural. Coincidentemente, nas duas semanas (primeira e terceira)

em que ocorreram o maior número de perdas de reprodutores somando-se o sistema semi-natural (11 animais) e o extrusado (9 animais) a taxa de fertilização foi a menor para ambos tratamentos. Porém, na última semana, em que não ocorreram perdas de reprodutores em nenhum dos sistemas, a taxa de fertilização dos ovos obtidos na extrusão foi próximo à zero.

Caracterização genética: Quanto a manutenção da variabilidade genética, mensurada pelo índice de Shannon e pelo percentual de locos polimórficos avaliada na progênie obtida no sistema reprodutivo semi-natural foi observada maior eficiência em relação ao sistema extrusado (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativa da variabilidade genética dos reprodutores e das larvas de pacu (*P. mesopotamicus*) obtidas pelo sistema de reprodução extrusado e semi-natural mensuradas pelo índice de Shannon e o percentual de locos polimórficos.

Parâmetros	Reprodutores	Origem das larvas	
		Extrusadas	Semi-natural
Índice de Shannon	0,289	0,231	0,415
Locos Polimórficos	56,16	42,7	72,40

O sistema de reprodução adotado para a produção de peixes migradores pode levar a redução da variabilidade genética. O presente trabalho demonstra como diferentes sistemas reprodutivos influenciam a variabilidade genética, em que se encontrou maior variação, estimada pela porcentagem de locos polimórficos e Índice de diversidade genética de Shannon, na progênie do sistema de reprodução seminatural (72,4% de polimorfismo e 0,415 de Índice de Shannon) em relação à progênie do sistema extrusado (42,7% de polimorfismo e 0,231 de Índice de Shannon).

Alguns autores avaliaram o sistema semi-natural na manutenção da variabilidade genética, entre eles Sekino et al. (2002) para *Paralichthys olivaceus* e Ortega-Villaizán Romo et al. (2005) para *Verasper variegatus*. Estes autores constaram que o sistema semi natural para estas espécies de linguado promoveu uma redução da variabilidade genética devido principalmente à dominância de alguns reprodutores, o que proporcionou uma redução no o número efetivo de reprodutores, sendo que, para *P. olivaceus* foi observado que apenas um macho, de um total de seis, foi responsável por 99% de toda progênie. Contudo, os dados obtidos para *Piaractus mesopotamicus* têm mostrando que a variabilidade genética da progênie obtida por este sistema tem sido bastante alta, inclusive superior aos parentais (60,5% de polomórfimo e 0,365 de Índice de Shannon).

Banco de germoplasma: Na análise do sêmen após a descongelação foi observada uma redução ($P < 0,05$) de 21,64% dos espermatozoides normais, 66,45% da motilidade progressiva e 34,20% do vigor espermático em relação ao sêmen pré-congelação. Porém, houve um aumento ($P < 0,05$) de 14,46% das patologias primárias no sêmen pós-descongelação. Já as patologias secundárias encontradas no sêmen descongelado em relação ao pré-congelação não houve diferença (Tabela 3).

A redução do percentual de espermatozoides normais e o aumento das patologias primárias observadas nas análises do sêmen de *P. mesopotamicus* do presente estudo, pode estar intimamente relacionado com os processos de criopreservação. De acordo com Fabbrocini et al. (2000), a toxidez dos crioprotetores e o processo de criopreservação são os principais responsáveis pelas crio-injúrias que são provocadas nas células espermáticas. O

principal prejuízo causado pelas injúrias que os espermatozóides de peixes sofrem devido a criopreservação está relacionado à redução da motilidade e do vigor espermático e por consequência, a redução na capacidade de fertilização (Lahnesteiner et al., 1996; Cosson et al., 1999).

Tabela 3: Médias e desvio padrão da motilidade progressiva, vigor espermático, espermatozóides normais, patologias primárias e secundárias observados nas análises de sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) realizados antes da congelação e após descongelação.

Parâmetros	Tratamentos	
	Pré-congelação	Pós-descongelação
Espermatozóides normais (%)	40,21±15,28a	31,50±12,30b
Espermatozóides com patologias primárias (%)	46,73±12,48b	54,60±7,59a
Espermatozóides com patologias secundárias (%)	13,14±6,18	13,91±6,13
Motilidade progressiva (%)	69,09±7,48a	23,18±15,04b
Vigor (pontos)	3,45±0,58a	2,27±0,70b

Médias com letra diferente, na mesma linha ($P < 0.05$).

As metodologias de conservação da biodiversidade das espécies migradoras, aqui testadas, mostraram resultados que apontam para um modelo (Fig. 2), que deva contemplar ações que permitam produzir alevinos com segurança, especialmente no que diz respeito a metodologia de reprodução de peixes aqui empregada.

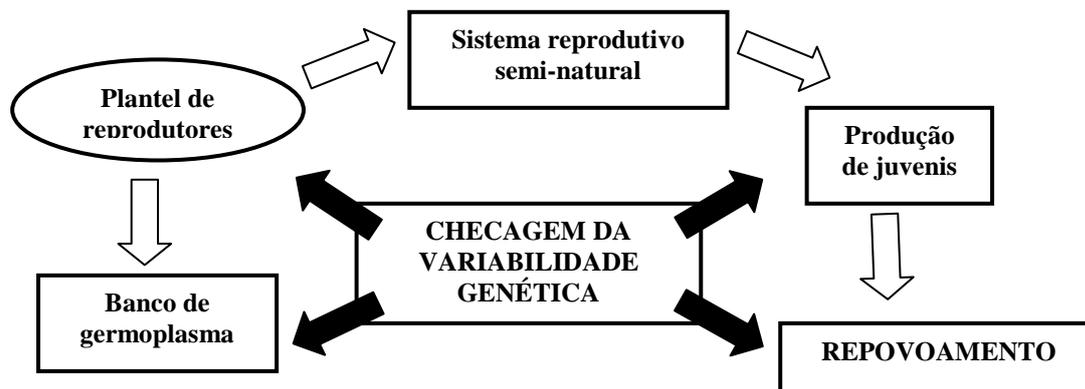


Figura 2. Modelo de produção de alevinos para o repovoamento a ser desenvolvido, obtidos de resultados no presente trabalho a ser complementado com a montagem de um banco de germoplasma proveniente de animais e que possuam a mesma diversidade genética da população original.

Conclusão

O sistema de reprodução semi-natural mostrou ser o mais apropriado para a reprodução de espécies migradoras, como é o caso do *P. mesopotamicus*, tanto quanto na produção de alevinos e na recuperação de matrizes, como na manutenção da variabilidade genética da progênie. Além disso, a qualidade do sêmen não se alterou após a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa.

Referências

BROOKS, S.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in fish biology and fisheries*, v.7, n.4, p.387-416. 1997.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (ed.). *The male gamete: From basic knowledge to clinical applications*. Paris: Cache River, 1999. p.161-186.

FABBROCINI, A. *et al.* Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, v.40, n.1, p.46-53, 2000.

GORMAN, O.T. Ecological and genetic considerations for collection of gametes from wild fishes. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (eds.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.319-322.

LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture*, v.144, n.1-3, p.265-274, 1996.

LOWE-McCONNELL, R. Threats to, and conservation of, tropical freshwater fishes. *Meeting International Verein Limnology*, v.24, n.1, p.47-52, 1994.

MARTINS, S.L. *Sistemas para a transposição de peixes*. (Dissertação de Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000, 170p.

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*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.108-116.

ORTEGA-VILLAIZÁN ROMO, M.M.; ARITAKI, M.; TANIGUCHI, N. Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fisheries Science*, v.72, n.1, p.48-52, 2006.

REYNALTE-TATAJE, D.A.; ESQUIVEL, B.M.; ESQUIVEL, J.R.; ZANIBONI FILHO, E. Reproducción inducida del piaçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Boletim do Instituto da Pesca*, v.28, n.1, p.11-18. 2002.

SAS INSTITUTE INC. SAS technical report. Release 6.07. Cary: NC, 1992. 229p.

SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, v.197, n.1, p.3-24. 2001.

SEKINO, M.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v.213, n.1, p.101-122, 2002.

SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: *Ecologia de reservatórios*. NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (eds.). São Paulo: RiMA, p.275-284. 2005.

TORLONI, C.E.C. *Reprodução de peixes autóctones reofílicos no reservatório de Promissão*, São Paulo: CESP, 1986. 14p.