



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NA
PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES MONOSSEXO
DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
DA LINHAGEM CHITRALADA**

ADALMYR MORAIS BORGES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
ABRIL/2004**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE
POPULAÇÕES MONOSSEXO DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DA LINHAGEM CHITRALADA**

ADALMYR MORAIS BORGES

ORIENTADOR: ARTHUR DA SILVA MARIANTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 154/2004

BRASÍLIA/DF
ABRIL/2004

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE
POPULAÇÕES MONOSSEXO DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DA LINHAGEM CHITRALADA**

ADALMYR MORAIS BORGES

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA
E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE
PRODUÇÃO ANIMAL.**

APROVADA POR:

**Arthur da Silva Mariante, PhD – Pesquisador Embrapa Cenargen
(ORIENTADOR) CPF: 123.483.920-20 E-mail: mariante@cenargen.embrapa.br**

**Concepta McManus Pimentel, PhD – Universidade de Brasília
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 688.272.881-04 E-mail: concepta@unb.br**

**Fernando Luis do Rego Monteiro Starling, PhD – Universidade Católica de Brasília
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 239.401.581-00 E-mail: starling@brturbo.com**

BRASÍLIA/DF, 28 de ABRIL de 2004.

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Adalmyr Moraes

Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada. / Adalmyr Moraes Borges; orientação de Arthur da Silva Mariante. – Brasília, 2004.

65p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2004.

1. Proporção de Sexos 2. Temperatura 3. *Oreochromis niloticus* 4. Tilápia do Nilo. I. Mariante, A. da S. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BORGES, A. M. Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2004, 65p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Adalmyr Moraes Borges

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada.

GRAU: Mestre ANO: 2004

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Adalmyr Moraes Borges
CPF: 485.046.456-49
QE 02 Bloco B-12 302
71.100-077 - Brasília/DF - Brasil
(61) 382-0143 adalmyr@bsbtecnologia.com.br

**Aos meus avós, Adalberto e Divina Myr,
pelo apoio no início de minha vida acadêmica**

dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha existência.

Aos meus pais Vicente e Vera, que sempre me ensinaram o caminho a seguir, com carinho e dedicação.

À minha querida esposa Andréa, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos, o meu carinho e o meu amor.

Às minhas filhas Raquel e Rebeca, pela paciência exercitada comigo ao longo desse período.

Ao meu orientador e professor, Dr. Mariante, pela confiança, pelo auxílio e pela disposição durante todo o processo.

À professora Connie, pelas aulas e por todo o apoio nas análises estatísticas.

À professora Natália, por acreditar e se dispor, orientando o início dos trabalhos.

À professora Lucrécia, pelo imprescindível apoio instrumental.

Ao pesquisador Jean François Baroiller, pelo despertamento sobre o tema.

Ao pesquisador Lionel Dabbadie, pela obtenção de importantes artigos e livros.

Ao médico veterinário Marco Túlio, por disponibilizar as larvas utilizadas.

Aos colegas Júlio Moretti e Absalão Neto, pela grande amizade e importante auxílio na condução dos experimentos.

Aos funcionários, do Centro de Tecnologia em Piscicultura e do Viveiro de Mudas da Granja do Ipê, em especial ao colega Cláudio Silva.

À EMATER-DF, pela oportunidade concedida, em especial aos colegas de extensão, José Carlos, Germano e Mário Pascoal, que auxiliaram com importante apoio inicial.

À Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do DF, pela disponibilidade de uso de sua infra-estrutura, necessária à realização dos trabalhos.

Ao meu diretor Eduardo Leonel de Paiva, pelo estímulo nas horas decisivas.

À UnB e à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sem as quais não seria possível concretizar esse projeto.

Aos meus familiares e amigos que oraram por mim e estão contentes pela conclusão de mais uma etapa.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO	5
MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES MONOSSEXO	8
Sexagem Manual	9
Hibridação Interespecífica	10
Manipulação Cromossômica	11
Reversão Hormonal	12
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DA ÁGUA	14
OBJETIVOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO ÚNICO	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
Local	29
Animais	29
Tratamentos	30
Unidades Experimentais	31
Procedimentos Experimentais	32
Análise Estatística	38

RESULTADOS	39
Temperatura e Qualidade da Água	39
Efeito na Proporção de Sexos e Estruturas Gonadais	40
Efeito na Sobrevivência	46
Efeito no Peso Corporal e no Comprimento total	48
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Valores médios semanais da temperatura da água nos experimentos 1 e 2.	40
Tabela 2 - Efeito do tratamento de temperatura, aplicados a partir do 10º dia após a eclosão, na proporção dos sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, no experimento 1.	44
Tabela 3 - Efeito do tratamento de temperatura, aplicados a partir do 10º dia após a eclosão, na proporção dos sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, no experimento 2.	45
Tabela 4 - Efeito do tratamento de temperatura, aplicados a partir do 10º dia após a eclosão, na proporção dos sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, nos experimentos 1 e 2.	46
Tabela 5 - Valores das taxas de mortalidade, sobrevivência e canibalismo, registrados no período de aplicação dos tratamentos (Fase 1) para os experimentos 1 e 2.	47
Tabela 6 - Valores das taxas de mortalidade, sobrevivência e canibalismo, registrados na fase de crescimento (Fase 2) para os experimentos 1 e 2.	47
Tabela 7 - Valores médios do comprimento total e peso corporal das larvas e alevinos, ao final da aplicação dos tratamentos (Fase 1), e ao final da fase de crescimento (Fase 2) para os diferentes tratamentos dos experimentos 1 e 2.	49
Tabela 8 - Valores médios do comprimento total e peso corporal dos alevinos, ao final da fase de crescimento (Fase 2), distribuído entre os sexos nos experimentos 1 e 2.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Visão geral dos experimentos.	37
Figura 2 - Análise microscópica das gônadas coradas pelo corante aceto-carmim em diferentes aumentos.	42
Figura 3 - Análise macroscópica das gônadas.	43
Figura 4 - Curvas de regressão para peso corporal e comprimento total, ao final do período experimental, para os diferentes tratamentos nos dois experimentos.	51
Figura 5 - Valores médios de sobrevivência, canibalismo e coeficiente de variação para peso corporal, para os diferentes tratamentos do experimento 1.	52
Figura 6 - Valores médios de sobrevivência, canibalismo e coeficiente de variação para peso corporal, para os diferentes tratamentos do experimento 2.	53

Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada

RESUMO GERAL

As tilápias vêm tomando uma posição de destaque na aquicultura mundial. No Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é o principal peixe cultivado, principalmente depois da introdução da linhagem tailandesa Chitralada. Para o sucesso da criação de tilápias, é necessária a produção de populações monossexo macho. O método mais utilizado na reversão sexual de larvas de tilápia é o tratamento com hormônios esteróides, o que vem levantando sérias questões éticas e ambientais. Felizmente, em algumas linhagens e espécies de tilápias, variações na temperatura da água provocam resultados semelhantes aos dos tratamentos de reversão sexual com hormônios, sendo portanto uma nova opção na produção de animais monossexo. Com esta finalidade, foram conduzidos 2 experimentos para testar o efeito da temperatura na proporção de sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada. No primeiro experimento, foram analisados os efeitos dos tratamentos de temperatura alta (35°C) e de temperatura controle (27°C), cuja aplicação iniciou 10 dias após a eclosão, por um período de 28 dias. Após 60 dias, os animais foram analisados microscopicamente, sendo encontrada diferença significativa ($p < 0,01$) na proporção dos sexos. O maior percentual de machos foi encontrado para o tratamento de temperatura alta (72,39%) em comparação com o tratamento controle (62,27%). Quanto ao crescimento, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, tanto para peso corporal, como para comprimento total. No segundo experimento, foram analisados os efeitos de tratamentos com diferentes períodos de exposição a uma temperatura constante de 35°C, considerada alta. Os períodos de 7, 14, 21 e 28 dias foram contados a partir do 10º dia após a eclosão, o que coincidiu com o final da reabsorção do saco vitelínico. Neste experimento, os animais também foram analisados microscopicamente após 60 dias, não havendo diferença significativa entre os diferentes períodos de exposição. Quanto ao crescimento, na Fase 1, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, tanto para peso corporal, como para comprimento total, com maiores médias para os tratamentos com período de exposição de 28 e 21 dias. Embora na Fase 2, também tenha havido diferença significativa ($p < 0,05$) para esses mesmos parâmetros entre os tratamentos, as maiores médias ocorreram no tratamento com período de exposição de 28 dias. Como era de se esperar, as taxas de sobrevivência tiveram relação direta com a presença de canibalismo, e este foi significativamente maior nos tratamentos com temperatura alta. Nos dois experimentos não foram observados animais intersexo, sendo verificados efeitos significativos da temperatura na proporção de sexos, o que indica a presença da característica de termo-sensibilidade na linhagem Chitralada. O período mais curto de exposição, de sete dias, manteve os efeitos masculinizantes, com maiores taxas de sobrevivência.

Palavras-chave: proporção de sexos, aquicultura, reversão sexual em peixes

Effect of water temperature on the production of monosex populations in the Chitralada strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

Tilapias are becoming an important production source in world aquaculture. In Brazil, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the main cultivated fish, especially following the introduction of the Thai Chitralada strain. For the successful rearing of this fish, the production of male monosex populations is necessary. The most popular method is sexual reversal of larvae using steroid hormones. This practice raises serious ethical and environmental questions. In some species and strains of tilapia, variations in water temperature can cause similar results, thereby becoming a new option for the production of monosex animals. To test the effect of water temperature on sex ratio in Nile tilapia, two experiments were carried out. Primarily, the effect of high (35°C) and control (27°C) water temperature were tested beginning 10 days post hatching, for 28 days. After a further 60 days, the animals were analyzed under a microscope and a significant difference in sex ratio was found ($p < 0.01$). The highest proportion of males was in the high temperature group (72.39%), compared with the control group (62.27%). In terms of growth, no significant differences were found for total length or body weight between the groups. In the second experiment, the effect of different exposure times at a constant temperature of 35°C was tested. Periods of 7, 14, 21 and 28 days were tested, starting 10 days post hatching, when the reabsorption of the yolk sac ended. The animals were again evaluated under the microscope after 60 days. No significant differences were found in sex ratio between groups. In phase 1, a significant difference was found between treatments for body weight and total length, the highest means for exposure periods of 21 and 28 days. In phase 2, a significant difference between treatments was also found ($p < 0.05$) for these parameters, the highest means being for 28 day exposure. As expected, survival rate had a direct relationship with the presence of cannibalism, which was higher in high temperature groups. No intersex individuals were found in either experiment, but significant temperature effects on sex ratio was found in both experiments, indicating the thermo-sensitivity of the Chitralada strain. The shortest exposure period (7 days) maintained masculinizing effects with higher survival rates.

Key words: sex ratio, aquaculture, fish sex inversion

INTRODUÇÃO GERAL

A criação de peixes vem sendo apresentada como uma alternativa aos tradicionais sistemas de produção de proteína animal, sendo que no Brasil vem sendo observada uma alta taxa de crescimento, de 30 a 40% nos últimos anos, o que mostra que a atividade vem se consolidando em nosso país (Kubitza, 2000; Lovshin, 2000).

Dentre os peixes de água doce criados em cativeiro, a tilápia é considerada a espécie mais importante do século XXI, uma vez que é produzida em mais de 100 países, com produção comercial anual estimada em 800.000 toneladas (Fitzsimmons, 2000). No Brasil é o peixe mais cultivado, devido à rusticidade, rápido crescimento e carne de ótima qualidade, com produção anual superior a 75.000 toneladas (Lovshin, 2000; Zimmermann & Little, 2003). Devido à grande demanda interna existente, a produção de tilápias é destinada ao abastecimento do mercado doméstico. No entanto, com o ritmo de desenvolvimento que esta atividade vem apresentando nos últimos anos, o Brasil poderá se tornar um dos maiores produtores e exportadores de tilápias cultivadas (Kubitza, 2000).

Dentre mais de 70 espécies de tilápias, sendo a maioria delas oriundas da África, segundo Kubitza (2000), apenas quatro conquistaram destaque na aquicultura mundial: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*); a tilápia azul (*Oreochromis aureus*); a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) e a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis hornorum*). Além destas quatro espécies, somam-se os seus mutantes e híbridos, com cores variando do branco ao vermelho, genericamente chamados de tilápias vermelhas (Lovshin, 1998).

No Brasil, a tilápia do Nilo da linhagem Bouaké, proveniente da Costa do Marfim, foi introduzida na Região Nordeste em 1971 e, a partir daí, distribuiu-se pelo país, sendo cultivada desde a bacia do rio Amazonas até o extremo sul. Em 1996, com o objetivo de melhorar geneticamente o plantel existente no Paraná, a Associação Paranaense dos Produtores de Alevinos (ALEVINOPAR), com o apoio da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) e de outros órgãos governamentais, importaram da Tailândia matrizes de tilápias do Nilo da linhagem Chitralada (Lovshin, 2000; Boscolo *et al.*, 2001). Zimmermann & Little (2003) realizaram estudo para analisar os impactos gerados pela introdução dessa linhagem no Brasil. Esses mesmos autores citam que em 1996, a produção nacional de tilápias era de 10.000 toneladas (17% do total da aquicultura), sendo que em 2002, já alcançava 75.000 toneladas (38% do total da aquicultura). Dessa produção, foi estimado que 50.000 toneladas sejam da linhagem Chitralada, ou seja, 67% da produção nacional de tilápias cultivadas. Em 2002 foram produzidos no Brasil, 200.000.000 de alevinos de tilápia da linhagem Chitralada (Zimmermann & Little, 2003).

As tilápias constituem ótima fonte de proteína animal de qualidade. Dentre suas características, destacam-se excelente conversão de proteína vegetal em animal, baixo custo comparativo de produção, desova ao longo do ano, bem como sua resistências às doenças, às altas temperaturas, à baixa concentração de oxigênio dissolvido e à alta concentração de amônia na água. A grande aceitação no mercado, por sua qualidade da carne e rendimento em filés, é um indicativo de seu potencial para a criação e industrialização comercial (Macintosh & Little, 1995; Phelps & Popma, 2000).

Por outro lado, as suas características reprodutivas como: alta capacidade de reprodução, maturidade sexual precoce, fecundidade relativa elevada e desova freqüente, têm levado a uma das principais dificuldades encontradas pelos criadores de tilápias, que é a superpopulação dentro dos viveiros de cultivo, prejudicando a taxa de crescimento dos indivíduos (Popma & Green, 1990; Borges, 2002).

Os machos de tilápia apresentam melhor crescimento e desempenho na engorda, uma vez que as fêmeas, além de utilizarem grande parte de suas reservas para as atividades reprodutivas, não se alimentam durante o período da incubação oral dos ovos (Phelps & Popma, 2000; Beardmore *et al.*, 2001). Desta forma, o desenvolvimento e a intensificação da criação de tilápias são dependentes do sucesso no controle e manipulação de algumas funções fisiológicas, entre elas a reprodução (Donaldson, 1996).

Uma das práticas mais utilizadas para o controle da reprodução em tilápias tem sido a criação de populações com indivíduos monossexo. Vários métodos têm sido empregados neste processo, como a hibridação, a manipulação cromossômica e a reversão sexual com a utilização de hormônios (Popma & Green, 1990; Macintosh & Little, 1995; Phelps & Popma, 2000).

O método de criação de populações com indivíduos monossexo que vem sendo mais utilizado em tilápias, por ser considerado mais eficiente e economicamente viável, tem sido a reversão sexual de larvas, com a utilização de hormônios esteróides sexuais sintéticos, seja pela incorporação de hormônio na ração ou por meio de banhos de imersão (Popma & Green, 1990; Gale *et al.*, 1999; Phelps & Popma, 2000; Wassermann & Afonso, 2003).

Apesar de ter sido demonstrado em estudos específicos (Rothbard *et al.*, 1990; Curtis *et al.*, 1991), que os tecidos dos peixes tratados não apresentam resíduos de hormônios, existem ainda preocupações quanto à sua liberação no ambiente e a reação dos consumidores (Beardmore *et al.*, 2001; Karayücel *et al.*, 2003). Estas preocupações têm levado a busca de alternativas que reduzam o impacto ambiental, aliadas a uma melhor qualidade e eficiência e, uma diminuição nos custos (Pandian & Sheela, 1995; Baras *et al.*, 2001).

Estudos recentes em tilápia do Nilo, demonstraram que as altas temperaturas da água podem causar efeitos semelhantes aos provocados pelos hormônios esteróides na reversão sexual, com variações nas proporções macho:fêmea de acordo com a termo-sensibilidade das linhagens e famílias dos peixes estudados (Baroiller *et al.*, 1995; Abucay *et al.*, 1999; Baras *et al.*, 2001; Altena e Höst-Schwark, 2002; Müller-Belecke *et al.*, 2003).

Os efeitos da interação genótipo-ambiente-fenótipo precisam ser melhor avaliados nas diversas linhagens, visando à sua aplicação prática, através do uso da temperatura na produção de populações monossexo, principalmente em regiões onde as questões ambientais têm prevalecido, levando à proibição do uso de hormônios, e também onde o mercado consumidor apresenta reações negativas a produtos com tratamento hormonal (Baras *et al.*, 2001; Karayücel *et al.*, 2003).

O presente estudo pretende investigar os efeitos da temperatura da água na produção de populações masculinizadas de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO

Nos peixes, a expressão do sexo é muito diversificada, podendo os mesmos serem classificados como: gonocóricos (quando os sexos ocorrem separadamente nos indivíduos), hermafroditas (quando ambos os sexos estão presentes no mesmo indivíduo) e unissexuados (espécies com indivíduos de apenas um sexo). As espécies cultivadas que, em sua maioria, são do tipo gonocórico, podem ser divididas em indiferenciadas e diferenciadas. Nas indiferenciadas, a gônada inicialmente se desenvolve em tecido semelhante ao ovário e, mais tarde, na metade dos indivíduos transforma-se em testículos enquanto que na outra metade, transforma-se em ovários. Nas espécies diferenciadas, entre as quais se incluem as tilápias, a gônada sofre diferenciação direta para testículo ou ovário (Yamazaki, 1983; Devlin & Nagahama, 2002).

A expressão do sexo depende de dois eventos: da determinação sexual e da diferenciação sexual. A distinção entre a determinação e diferenciação sexual é sempre difícil, tendo em conta os vários critérios utilizados para determinar a diferenciação sexual (morfológicos, celulares e moleculares). De uma maneira geral, a determinação sexual é utilizada para descrever os processos genéticos (genótipo) e ambientais, e as variáveis que influenciam na diferenciação sexual, enquanto que a diferenciação sexual é utilizada para descrever os resultados desses processos, no desenvolvimento testicular ou ovariano (sexo gonadal ou fenotípico). A interação desses dois eventos origina os dois fenótipos: macho ou fêmea, nos aspectos morfológicos, comportamentais e funcionais (Piferrer, 2001; Devlin & Nagahama, 2002).

O sexo genético é determinado na fertilização, pela combinação dos cromossomos provenientes dos gametas, sendo definido como a soma de genes responsáveis pela formação das gônadas e de suas características. Esses genes podem estar espalhados pelo genoma ou concentrados nos cromossomos sexuais. Existem três formas de determinação sexual que podem ser aplicados em peixes: cromossômica, poligênica e interação genótipo-ambiente (Yamazaki, 1983; Piferrer, 2001; Baroiller *et al.*, 1999).

Segundo Devlin & Nagahama (2002), uma grande quantidade de informações já é conhecida em relação ao processo de diferenciação sexual em peixes, sendo que os mecanismos envolvidos na determinação sexual começam a ser definidos. A determinação sexual em peixes é um processo muito flexível, tendo em vista a importância das modificações causadas por vários fatores externos. Essas influências podem afetar tanto as células somáticas como as células germinativas das gônadas primordiais e incluem a ação de fatores genéticos, ambientais (temperatura), comportamentais e fisiológicos.

A diferenciação sexual envolve os eventos que ocorrem desde a gônada primordial até a diferenciação completa em testículos ou ovários. Nas espécies gonocóricas diferenciadas, a diferenciação sexual acontece primeiro nas fêmeas e depois nos machos. Os primeiros sinais nas fêmeas incluem a entrada das oogônias na meiose e/ou a proliferação das células somáticas, formando a cavidade ovariana. Nos machos, a diferenciação sexual é caracterizada pelo surgimento da espermatogônia, pelo arranjo das células germinativas e somáticas em lóbulos e pela diferenciação dos dutos espermáticos (Piferrer, 2001; Devlin & Nagahama, 2002).

Nas tilápias, o período crítico para diferenciação celular das gônadas compreende de 10 a 20 dias após a eclosão, iniciando com o final da reabsorção do saco vitelínico, sendo que a diferenciação histológica das gônadas pode ser notada a partir de 23 a 26 dias após a eclosão (Baroiller *et al.* 1995; Baroiller *et al.* 1999; Devlin & Nagahama, 2002).

A natureza do indutor endógeno da diferenciação sexual nos peixes, ainda não está totalmente definida, mas muitas evidências apontam para o papel dos esteróides sexuais endógenos, principalmente para a importância das enzimas esteroidogênicas, entre elas a aromatase (Piferrer, 2001; Kwon *et al.*, 2002).

Recentes avaliações da proporção do sexo de tilápia do Nilo de diferentes linhagens, sugerem que há influência de genes autossômicos ou mesmo multigenes na determinação do sexo desta espécie (Tuan *et al.*, 1999).

Embora a determinação sexual ocorra principalmente sob controle genético, nos peixes, fatores ambientais, tais como: temperatura, fotoperíodo, salinidade, assim como altas densidades de estocagem, podem ter influência nesse processo (Devlin & Nagahama, 2002).

Entretanto, Baroiller & D'Cotta (2001) citam que entre os fatores já estudados, a temperatura aparece como principal fator ambiental na determinação sexual. Sendo que nas tilápias, foram considerados ineficientes os fatores ambientais: densidade de estocagem, taxas de alimentação e salinidade; e confirmando também a temperatura como principal fator ambiental.

A determinação sexual pela interação genótipo-ambiente, está se tornando evidente em um número cada vez maior de espécies, mostrando que é possível controlar o sexo pela manipulação ambiental (Baroiller & D'Cotta, 2001; Müller-Belecke *et al.*, 2003; Karayücel *et al.*, 2003).

Conhecer e entender os mecanismos responsáveis pela determinação do sexo em peixes é fundamental para que se obtenha sucesso nas práticas de controle do sexo (Donaldson, 1996).

MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES MONOSSEXO

Nos últimos 20 anos, os esforços da pesquisa têm se voltado para a procura de métodos confiáveis de produzir progênes de indivíduos somente de um determinado sexo. No caso das tilápias, o que se busca são populações com monossexo masculino, já que os machos apresentam melhor desenvolvimento do que as fêmeas (Phelps & Popma, 2000).

De acordo com Beardmore *et al.* (2001), o uso de populações monossexo em peixes apresenta vantagens que podem incluir uma ou mais das seguintes situações: (a) obtenção de maior taxa de crescimento; (b) eliminação da reprodução, evitando gastos de energia e controlando a superpopulação; (c) redução do comportamento sexual/territorial; (d) redução nas variações do tamanho, levando à maior uniformidade na despesca; e (e) redução do risco de impactos ambientais, resultantes da fuga indesejável de espécies exóticas.

Segundo Piferrer (2001) e Phelps & Popma (2000), é desejável que as espécies de peixes, utilizadas na piscicultura, não se reproduzam nos ambientes de criação, antes de alcançarem o tamanho apropriado para a comercialização.

Levando em conta os aspectos práticos e comerciais, a técnica mais eficiente é aquela que maximiza o sexo gonadal desejado, ao mesmo tempo em que minimiza o tempo de intervenção sobre os animais (Donaldson, 1996).

Considerando os sistemas de produção mais intensificados e um maior mercado consumidor, a presença de mais de cinco por cento de fêmeas de tilápias nos cultivos, pode começar a trazer problemas (Popma & Green, 1990; Phelps & Popma, 2000).

Várias são as opções para se conseguir populações monossexo, incluindo métodos genéticos, não genéticos e mesmo uma combinação entre eles. Dentre os principais métodos utilizados destacam-se a sexagem manual, a hibridação interespecífica, a manipulação cromossômica e a reversão hormonal.

Sexagem Manual

Um dos primeiros métodos utilizados, a sexagem manual consiste na separação de machos e fêmeas através da observação da papila urogenital e de outras características auxiliares, como a maior altura do corpo e a pigmentação mais intensa nos machos. As principais desvantagens deste método são as seguintes: necessidade de produzir juvenis com idade entre 60 e 90 dias, o que demanda maior espaço físico e uso de insumos; pequena disponibilidade de mão-de-obra bem treinada; grande demanda de tempo para a seleção; mortalidade após o manejo; descarte das fêmeas; margem de erro considerável, principalmente quando a

sexagem é feita com alevinos pouco desenvolvidos ou por pessoas sem muita experiência, alcançando percentuais de machos inferiores a 90% (Mair *et al.*, 1997b; Beardmore *et al.*, 2001; Kubitza, 2000).

Hibridação Interespecífica

A produção de populações híbridas masculinas é fundamentada na base genética de determinação do sexo em tilápias. Tanto os sistemas heterogaméticos masculinos (XY) ou femininos (ZW) têm sido descritos nas espécies de tilápia (Devlin & Nagahama, 2002).

Na tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e na tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*), o sexo é determinado por cromossomos X e Y, como nos mamíferos. As fêmeas são XX (homogaméticas possuindo apenas cromossomos X) e os machos são XY (heterogaméticos possuindo um cromossomo X e um Y). Na tilápia azul (*O. aureus*) e na tilápia de Zanzibar (*O. hornorum*), ocorre como nas aves, os machos ZZ são homogaméticos e as fêmeas ZW são heterogaméticas. Portanto, quando é realizado o cruzamento entre fêmeas puras homogaméticas XX (*O. niloticus* ou *O. mossambicus*) e machos puros homogaméticos ZZ (*O. aureus* ou *O. hornorum*), os híbridos resultantes seriam heterogaméticos (XZ) e todos machos, com a condição de que ambas as espécies pertençam a linhagens puras (Beardmore *et al.*, 2001; Kubitza, 2000).

Os principais problemas encontrados na hibridação, como a incompatibilidade comportamental entre as espécies, levando à morte de reprodutores no acasalamento; as dificuldades na manutenção de linhagens geneticamente puras das espécies parentais; a necessidade de espaço físico para o isolamento dos

reprodutores. Junto com essas dificuldades, a influência dos cromossomos autossômicos e de fatores ambientais (temperatura), fazendo com que os percentuais de machos variem de 70 a 100%, contribuiu para o declínio desta prática (Kubitza, 2000; Phelps & Popma, 2000).

Manipulação Cromossômica

Através da manipulação genética, pesquisadores da Universidade do País de Gales (Reino Unido) e da Universidade Central de Luzon (Filipinas) desenvolveram linhagens de tilápias “supermachos”, também conhecidas como GMT-YY (genetic modified tilapia). Baseados na hipótese de determinação sexual monofatorial com os machos heterogaméticos (XY) em *O. niloticus* e *O. mossambicus*, Mair *et al.* (1997a) propuseram modelos para a produção em larga escala de machos de tilápia através do cruzamento de indivíduos com genótipo YY (YY x YY), mostrando as vantagens e desvantagens desse método ainda pouco utilizado, mas que vem impulsionando o desenvolvimento da criação de tilápias nas Filipinas.

Nesses estudos, foi utilizada apenas a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) da linhagem Egypt-Swansea (Manzala), sendo que os resultados com outras linhagens têm demonstrado uma grande variação na proporção de sexos (Tuan *et al.*, 1999), com clara influência da temperatura na diferenciação sexual (Baroiller *et al.*, 1995; Baroiller *et al.* 1999). Toguyeni *et al.* (2002) mostraram que os indivíduos com genótipo YY devem ser utilizados para a produção comercial de machos com genótipo XY, já que o genótipo XY apresenta melhores desempenhos de crescimento do que o genótipo YY.

Além dos problemas com as influências autossômicas e ambientais, a tecnologia de produção de machos com genótipo YY é espécie-específica e possivelmente linhagem-específica, podendo não produzir altas proporções de machos em todas as linhagens de tilápia (Tuan *et al.*, 1999).

Outras dificuldades, são que esse processo demanda pessoal especializado, grande número de instalações para a manutenção isolada das progênies, bom sistema de marcação dos peixes, a duração do processo de produção demora de quatro a cinco anos e o percentual de machos pode variar de 70 a 100% (Mair *et al.*, 1997b; Kubitza, 2000; Baras *et al.*, 2001).

Reversão Hormonal

O método mais utilizado, atualmente, na produção de populações monossexo de tilápias, é a manipulação do sexo fenotípico dos peixes, o que pode ser obtido pelo tratamento com hormônios esteróides sexuais sintéticos incorporados na ração (Popma & Green, 1990; Phelps & Popma), ou pelo uso de banhos de imersão (Gale *et al.*, 1999, Wassermann & Afonso, 2003). A administração de esteróides sexuais exógenos, no período da diferenciação sexual em peixes, pode influenciar fortemente a sua direção, indicando que esses hormônios desempenham papel fundamental no processo (Devlin & Nagahama, 2002).

Apesar disso, os processos de reversão sexual a partir da utilização de hormônios nem sempre são muito efetivos, devido à influência de vários fatores, como a qualidade do hormônio, tipo de ração administrada e variações de fatores ambientais (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e outros). Isto pode ocasionar a variação nos percentuais de machos de 80 a 100% (Popma & Green, 1990).

Durante a reversão sexual, todas as larvas devem receber doses diárias de hormônios, do período anterior ao início da diferenciação das gônadas, até o final do processo (Phelps & Popma, 2000).

Nesse método, a reversão pode ocorrer através da coleta de nuvens de larvas nos viveiros onde estão estocados os reprodutores, ou através da coleta direta dos ovos nas bocas das fêmeas em reprodução (Kubitza, 2000). A tecnologia da coleta dos ovos e incubação artificial (Macintosh & Little, 1995), desenvolvida pelo *Asian Institute of Technology* (AIT), localizado na Tailândia, apresenta a vantagem de produzir larvas recém-eclodidas que poderão sofrer reversão sexual de forma mais eficaz.

Pandian & Sheela (1995) relacionaram as vantagens e desvantagens da utilização de hormônios na reversão sexual em peixes. Dentre as vantagens do tratamento hormonal podem ser citadas: (a) a maximização do crescimento; (b) o aumento no valor comercial de peixes destinados ao consumo; (c) a eliminação da maturidade sexual precoce; (d) a formação de matrizes para a produção de populações 100% machos, 100% fêmeas ou 100% estéreis; e (e) a viabilização de estudos para melhor compreensão nos processos de determinação e diferenciação sexual. Como desvantagens foram relacionadas: (a) os resíduos dos esteróides administrados são carcinogênicos e podem afetar os consumidores; (b) a indução hormonal da reversão sexual pode causar situação estressante e reduzir as taxas de sobrevivência; (c) a reversão sexual pode retardar a maturidade sexual e reduzir a fecundidade dos peixes; (d) altas dosagens podem levar à esterilidade, reversão sexual paradoxal e supressão do crescimento; (e) o fato de mais de 99% dos hormônios administrados serem metabolizados e liberados dentro de poucas horas ou dias na água.

Apesar de alguns estudos demonstrarem que os peixes tratados não apresentam resíduos dos hormônios esteróides (Rothbard *et al.*, 1990; Curtis *et al.*, 1991), preocupações ainda persistem sobre a segurança dos tratamentos comerciais de reversão sexual utilizando esses produtos. As preocupações manifestam-se tanto em relação à segurança dos piscicultores, que mantêm contato direto com os produtos, quanto dos próprios consumidores, que irão se alimentar com peixes tratados, assim como de ambientalistas preocupados com os possíveis impactos ambientais (Baras *et al.*, 2001; D’Cotta *et al.*, 2001).

O uso de hormônios esteróides sintéticos levanta questões éticas e legais com respeito à presença desses produtos nos tecidos dos peixes e ao impacto de sua eliminação no meio ambiente (Baras *et al.*, 2001; Müller-Belecke *et al.*, 2003).

Essas preocupações sobre saúde e meio ambiente não têm sido abordadas de maneira adequada. Atualmente, nas fazendas comerciais de produção de alevinos, o hormônio 17α -metilttestosterona é aplicado em grandes quantidades, exigindo uma abordagem responsável do tema (Beardmore *et al.*, 2001; Karayücel *et al.*, 2003).

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DA ÁGUA

Nas aves e nos mamíferos, o desenvolvimento embrionário no período da determinação sexual acontece sob condições de temperatura controlada. Entretanto, os peixes são animais pecilotérmicos, e o desenvolvimento embrionário ocorre em condições de exposição total aos fatores ambientais externos, onde alterações relativamente grandes de temperatura podem acontecer (Devlin & Nagahama, 2002).

Apesar da determinação sexual nas espécies de tilápia ser controlada poligenicamente, por fatores genéticos maiores e menores, respectivamente nos cromossomos sexuais e autossômicos, as influências da temperatura nas proporções do sexo também têm sido demonstradas como sendo muito importantes neste processo (Baroiller & D’Cotta, 2001; Kwon *et al.*, 2002).

A determinação do sexo é controlada pela ação de uma variedade de sinalizações bioquímicas, envolvendo diferentes proteínas (fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, sistemas de receptores e mensageiros secundários). Como a grande influência que a temperatura pode ter na estrutura e função de proteínas e outras macromoléculas já é bem conhecida, supõe-se que as flutuações de temperatura encontradas pelos peixes em seus locais naturais de vida, possam alterar as sinalizações envolvidas na determinação do sexo e influenciar as proporções de machos e fêmeas (Devlin & Nagahama, 2002).

Estudos mais específicos, buscando decifrar os mecanismos de ação das temperaturas altas na determinação do sexo, têm sido direcionados para uma enzima esteroidogênica, a aromatase citocromo P450, que converte andrógenos em estrógenos (D’Cotta *et al.*, 2001).

Tratamentos com um inibidor da aromatase fizeram com que fêmeas genotípicas de tilápia do Nilo se transformassem em machos fenotípicos (Kwon *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que a expressão do gene ovariano da aromatase é reprimida em machos genotípicos, mas estimulada em fêmeas genotípicas, principalmente durante o período crítico da diferenciação sexual (Kwon 2001).

Baroiller *et al.* (1995) iniciaram os estudos da influência da temperatura na determinação e diferenciação sexual em tilápias (*O. niloticus*), utilizando tratamentos com temperaturas da água ao redor de 36°C, durante o mesmo período sensível aos tratamentos com hormônios. Estes tratamentos aumentaram a proporção de machos de 33 a 81%. Esses autores demonstraram ainda, a existência de um efeito parental, ou seja, a resposta ao tratamento com temperatura é altamente influenciada pelos casais que originaram a progênie.

Altas temperaturas da água podem causar efeitos semelhantes aos causados pelos hormônios na reversão sexual de tilápias, com variações na proporção macho:fêmea, de acordo com a termo-sensibilidade das linhagens e famílias dos peixes, com percentuais de machos entre 55 e 100% (Baroiller *et al.*, 1999; Baras *et al.*, 2001).

No entanto, para que os tratamentos com temperatura possam afetar a proporção de sexos, devem começar antes do início da diferenciação sexual das gônadas, e no mínimo, sobrepor parcialmente esse período crítico (D'Cotta *et al.*, 2001).

O período sensível a temperaturas parece ter o mesmo momento e duração do período sensível aos tratamentos hormonais em tilápia. Essa coincidência de períodos sensíveis de temperatura e hormônios, poderia resultar do efeito das temperaturas altas na ação de hormônios ou enzimas durante a diferenciação sexual (Baroiller *et al.*, 1999; Guiguen *et al.*, 1999).

Tratamentos com altas temperaturas (acima de 32 a 34°C) durante o período sensível aos hormônios, podem induzir a diferenciação das gônadas para testículos funcionais, aumentando o percentual de machos em algumas progênies da mesma linhagem (Baroiller *et al.*, 1999).

Populações com até 100% machos têm sido alcançadas em progênes com maior termo-sensibilidade, enquanto que em outras progênes a proporção de machos não foi influenciada pelo tratamento com altas temperaturas (Baroiller *et al.*, 1999).

Em estudos similares na tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*), populações expostas à faixa de temperatura de 20 a 32°C, no período de desenvolvimento inicial, mostraram uma elevada proporção de machos nas temperaturas mais altas (Wang & Tsai, 2000).

Na tilápia azul (*O. aureus*), que possuem sistema genético ZW, foram encontrados maiores proporções de machos (chegando a 98%), na temperatura de 34°C do que nas temperaturas de 21 e 27°C (Desprez & Mélard, 1998), inclusive com melhores desempenhos e sobrevivências nas temperaturas altas (Baras *et al.*, 2002). Regimes de temperaturas flutuantes, altas durante o dia e baixas durante a noite, também podem induzir à masculinização, mas de maneira menos eficiente do que em temperatura alta e constante de 35°C (Baras *et al.*, 2000).

Em estudos na tilápia do Nilo (*O. niloticus*), foi demonstrado que temperaturas altas geralmente têm um efeito masculinizante, que pode chegar a sobrepôr as influências genéticas na determinação sexual de indivíduos com genótipos XX e XY (Baroiller *et al.*, 1995; Baras *et al.*, 2001). Por outro lado, Abucay *et al.* (1999) e Karayücel *et al.* (2003) também relataram efeito da temperatura alta no sentido oposto, com a feminilização em indivíduos com genótipo manipulado YY (super macho), particularmente em linhagens com maior consangüinidade.

Para Baroiller *et al.* (1999), as condições ambientais podem ter efeitos variáveis na diferenciação sexual, dependendo da carga genética das linhagens estudadas. Essas observações mostram que a determinação sexual das diferentes espécies de tilápia sofre muitas influências, dependendo de combinações exatas da presença de fatores genéticos nas diferentes linhagens; e ainda, que as interações entre os efeitos genéticos e ambientais na determinação sexual podem variar em força e direção. Estas interações na determinação sexual, também podem ser influenciadas pelos níveis de consangüinidade e de estabilidade dentro de uma linhagem (Abucay *et al.*, 1999).

A termo-sensibilidade e as proporções dos sexos são estáveis dentro de progênes sucessivas, geradas pelo mesmo casal de reprodutores. Assim, os efeitos parentais (paternal e maternal) influenciam fortemente a determinação sexual em tilápias (Baroiller *et al.*, 1995; Baroiller *et al.*, 1999).

A característica da termo-sensibilidade parece apresentar grande herdabilidade, necessitando de trabalhos de seleção de famílias e indivíduos que expressem melhor essa característica. Os efeitos da interação genótipo-ambiente-fenótipo também precisam ser melhor estudados, principalmente visando à aplicação prática na produção de populações monossexo (Altena e Höst-Schwark, 2002).

Baras *et al.* (2001) indicam novos rumos para a realização de pesquisas futuras: a seleção de reprodutores e linhagens com maior termo-sensibilidade; o teste das características de termo-sensibilidade, associadas com a sobrevivência das progênes; e a avaliação do período de termo-sensibilidade, procurando obter a masculinização com períodos mais curtos de exposições a altas temperaturas.

OBJETIVOS

- Analisar o efeito da temperatura da água na produção de populações masculinas em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada.
- Avaliar diferentes períodos de exposição a altas temperaturas e seus efeitos na masculinização.
- Analisar o potencial do uso da temperatura na reversão sexual, como técnica alternativa ao emprego de hormônios esteróides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v.173, p.219-234, 1999.

ALTENA, A., HÖRST-SCHWARK, G. Effects of rearing temperatures on sex ratios in tilapia, *Oreochromis niloticus* L., investigations on a local population from the lake Victoria in Kenya. In: DEUTSCHER TROPENTAG: Challenges to organic farming and sustainable land use in the tropics and subtropics, Witzenhausen, 2002. **Proceedings...** Witzenhausen, 2002. p.184.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.192, p.187-199, 2001.

BARAS, E.; MPO'N'TCHA, A.; DRIOUCH, H.; PRIGNON, C.; MÉLARD, C. Ontogenic variations of thermal optimum for growth, and its implication on thermolabile sex determination in blue tilapia. **Journal of Fish Biology**, v.61, p.645-660, 2002.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptative and evolutionary implications. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.210-223, 2000.

BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern sex-ratios of mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Journal of Experimental Zoology**, v.273, p.216-223, 1995.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, C, v.130, p.399-409, 2001.

BAROILLER, J. F.; GUIGEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular Molecular Life Sciences**, v.55, p.910-931, 1999.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v.197, p.283-301, 2001.

BORGES, A. M. **Piscicultura**. 2.ed. Brasília: EMATER, 2002. 36p.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, 5, p.1391-1396, 2001.

CURTIS, L.R.; DIREN, F.T.; HURLEY, M.D.; SEIM, W.K.; TUBB, R.A.. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia. **Aquaculture**, v.99, p.193-201, 1991.

D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J. F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.265-276, 2001.

DESPREZ, D.; MÉLARD, C. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v.162, p.1-2, 1998.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v.208, p.191-364, 2002.

DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.381-392, 1996.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21st Century. In: SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., Rio de Janeiro, 2000. **Anais...** Rio de Janeiro: 2000. p.3-8.

GALE, W. L.; FITZPATRICK, M. S.; LUCERO, M.; CONTRERAS-SANCHES, W. M.; SCHRECK, C. B. Masculization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. **Aquaculture**, v.178, p. 349-357, 1999.

GUIGUEN, Y.; BAROILLER, J. F.; RICORDEL, M. J.; ISEKI, K.; McMEEL, O. M.; MARTIN, S. A. M.; FOSTIER, A. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development**, v.54, p.154-162, 1999.

KARAYÜCEL, I.; PENMAN, D.; KARAYÜCEL, S.; McANDREW, B. Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. . **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, v.55, 2, p.114-122, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285p.

KWON, J. Y.; HAGNAPANAH, V.; KOGSON-HURTADO, L. M.; McANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.359-370, 2001.

KWON, J. Y.; McANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.625-636, 2002.

LOVSHIN, L.L. Red tilapia or Nile tilapia: Which is the best culture fish? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., Piracicaba/SP, 1998. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998. p.179-198.

LOVSHIN L.L. Tilapia culture in Brazil. In: B.A. COSTA-PIERCE & J.E. RAKOCY(eds.). **Tilapia Aquaculture in the Americas**, v. 2. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. p.133-140.

MACINTOSH, D. J.; LITTLE, D. C. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: N.R. BROMAGE & R. J. ROBERTS (eds.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.277-320.

MAIR, G. C.; ABUCAY, J. S.; SKIBINSKI, D. O. F.; ABELLA, T. A.; BEARDMORE, J. A. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.54, p.396-404, 1997a.

MAIR, G. C.; DAHILIG, L. R.; MORALES, J. A.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of genetic techniques for the production of monosex male tilapia in aquaculture: early experiences from the Philippines. In: Central America Symposium on Aquaculture, 4., Tegucigalpa, 1997. **Proceedings...** Tegucigalpa, 1997b. p.225-227.

MÜLLER-BELECKE, A.; LEMMA, M. T.; HÖRST-SCHWARK, G. The effect of fry rearing temperatures on sex ratios in Nile tilapia – interactions between genotype and temperature. In: DEUTSCHER TROPENTAG: Technological and institutional innovations for sustainable rural development, Göttingen, 2003. **Proceedings...** Göttingen, 2003. p.156.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v.138, p.1-22, 1995.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex Reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J. E. (eds.). **Tilapia Aquaculture in the Americas**, v.2. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. p.34-59.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229-281, 2001.

POPMA, T.J.; GREEN, B. W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds**: Aquaculture Production Manual. Research and Development Series n° 35. Alabama: Auburn University, 1990. 15p.

ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B.L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17 α -ethnyltosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. **Aquaculture**, v.89, p.365-376, 1990.

TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; FOSTIER, A.; ABUCAY, J.; MAIR, G.; BAROILLER, J. F. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.207, p.249-261, 2002.

TUAN, P. A.; MAIR, G. C.; LITTLE, D. C.; BEARDMORE, J. A. Sex determination and the feasibility of genetically male tilapia production in the Thai-Chitralada strain of *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v.173, p.257-269, 1999.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v.286, p.534-537, 2000.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. **Aquaculture Research** v.34, n.1, p.65-71, 2003.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, v.33, p.329-354, 1983.

ZIMMERMAN, S.; LITTLE, D. C. Regional and national impacts of the introduction of the Chitralada strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to Brazil. In: WAS: Realizing the potential: responsible aquaculture for a secure future, Salvador, 2003. **Proceedings...** Salvador: The World Aquaculture Society, 2003. p.854.

CAPÍTULO ÚNICO

EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE POPULAÇÕES MONOSSEXO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) DA LINHAGEM CHITRALADA

Adalmyr Moraes Borges, Concepta McManus, Arthur da Silva Mariante

RESUMO

As tilápias vêm tomando uma posição de destaque na aquicultura mundial. No Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é o principal peixe cultivado, principalmente depois da introdução da linhagem tailandesa Chitralada. Para o sucesso da criação de tilápias, é necessária a produção de populações monossexo macho. O método mais utilizado na reversão sexual de larvas de tilápia é o tratamento com hormônios esteróides, o que vem levantando sérias questões éticas e ambientais. Felizmente, em algumas linhagens e espécies de tilápias, variações na temperatura da água provocam resultados semelhantes aos dos tratamentos de reversão sexual com hormônios, sendo portanto uma nova opção na produção de animais monossexo. Com esta finalidade, foram conduzidos 2 experimentos para testar o efeito da temperatura na proporção de sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada. No primeiro experimento, foram analisados os efeitos dos tratamentos de temperatura alta (35°C) e de temperatura controle (27°C), cuja aplicação iniciou 10 dias após a eclosão, por um período de 28 dias. Após 60 dias, os animais foram analisados microscopicamente, sendo encontrada diferença significativa ($p < 0,01$) na proporção dos sexos. O maior percentual de machos foi encontrado para o tratamento de temperatura alta (72,39%) em comparação com o tratamento controle (62,27%). Quanto ao crescimento, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, tanto para peso corporal, como para comprimento total. No segundo experimento, foram analisados os efeitos de tratamentos com diferentes períodos de exposição a uma temperatura constante de 35°C, considerada alta. Os períodos de 7, 14, 21 e 28 dias foram contados a partir do 10º dia após a eclosão, o que coincidiu com o final da reabsorção do saco vitelínico. Neste experimento, os animais também foram analisados microscopicamente após 60 dias, não havendo diferença significativa entre os diferentes períodos de exposição. Quanto ao crescimento, na Fase 1, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, tanto para peso corporal, como para comprimento total, com maiores médias para os tratamentos com período de exposição de 28 e 21 dias. Embora na Fase 2, também tenha havido diferença significativa ($p < 0,05$) para esses mesmos parâmetros entre os tratamentos, as maiores médias ocorreram no tratamento com período de exposição de 28 dias. Como era de se esperar, as taxas de sobrevivência tiveram relação direta com a presença de canibalismo, e este foi significativamente maior nos tratamentos com temperatura alta. Nos dois experimentos não foram observados animais intersexo, sendo verificados efeitos significativos da temperatura na proporção de sexos, o que indica a presença da característica de termo-sensibilidade na linhagem Chitralada. O período mais curto de exposição, de sete dias, manteve os efeitos masculinizantes, com maiores taxas de sobrevivência.

Palavras-chave: proporção de sexos, aquicultura, reversão sexual em peixes

Effect of water temperature on the production of monosex populations in the Chitralada strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

Tilapias are becoming an important production source in world aquaculture. In Brazil, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the main cultivated fish, especially following the introduction of the Thai Chitralada strain. For the successful rearing of this fish, the production of male monosex populations is necessary. The most popular method is sexual reversal of larvae using steroid hormones. This practice raises serious ethical and environmental questions. In some species and strains of tilapia, variations in water temperature can cause similar results, thereby becoming a new option for the production of monosex animals. To test the effect of water temperature on sex ratio in Nile tilapia, two experiments were carried out. Primarily, the effect of high (35°C) and control (27°C) water temperature were tested beginning 10 days post hatching, for 28 days. After a further 60 days, the animals were analyzed under a microscope and a significant difference in sex ratio was found ($p < 0.01$). The highest proportion of males was in the high temperature group (72.39%), compared with the control group (62.27%). In terms of growth, no significant differences were found for total length or body weight between the groups. In the second experiment, the effect of different exposure times at a constant temperature of 35°C was tested. Periods of 7, 14, 21 and 28 days were tested, starting 10 days post hatching, when the reabsorption of the yolk sac ended. The animals were again evaluated under the microscope after 60 days. No significant differences were found in sex ratio between groups. In phase 1, a significant difference was found between treatments for body weight and total length, the highest means for exposure periods of 21 and 28 days. In phase 2, a significant difference between treatments was also found ($p < 0.05$) for these parameters, the highest means being for 28 day exposure. As expected, survival rate had a direct relationship with the presence of cannibalism, which was higher in high temperature groups. No intersex individuals were found in either experiment, but significant temperature effects on sex ratio was found in both experiments, indicating the thermo-sensitivity of the Chitralada strain. The shortest exposure period (7 days) maintained masculinizing effects with higher survival rates.

Key words: sex ratio, aquaculture, fish sex inversion

INTRODUÇÃO

A tilápia é considerada o peixe mais importante do século XXI, uma vez que é criada em mais de 100 países, com uma produção anual estimada em 800.000 toneladas (Fitzsimmons, 2000). No Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais utilizada nos cultivos comerciais, devido a sua rusticidade, rápido crescimento, carne de ótima qualidade e boa aceitação pelo mercado consumidor, com seu cultivo crescendo rapidamente, com taxas de 30 a 40% nos últimos anos (Lovshin, 2000; Kubitza, 2000).

Zimmermann & Little (2003) realizaram estudo para analisar os impactos gerados pela introdução no Brasil, em 1996, da tilápia do Nilo da linhagem tailandesa Chitralada. Nesse ano, a produção nacional de tilápias era de 10.000 toneladas (17% do total da aquicultura), sendo que em 2002, já alcançava 75.000 toneladas (38% do total da aquicultura). Dessa produção, foi estimado que 50.000 toneladas sejam da linhagem tailandesa Chitralada, ou seja, 67% da produção nacional de tilápias cultivadas. Estes mesmos autores indicaram que no ano de 2002, foram produzidos no Brasil, 200.000.000 de alevinos de tilápia da linhagem tailandesa Chitralada, mostrando a importância dessa linhagem para a tilapicultura nacional (Zimmermann & Little, 2003).

Por outro lado, as características reprodutivas da tilápia do Nilo como: alta capacidade de reprodução, maturidade sexual precoce, fecundidade relativa elevada e desova freqüente, têm levado a uma das principais dificuldades encontradas pelos piscicultores, que é a superpopulação dentro dos viveiros de cultivo, prejudicando a taxa de crescimento dos indivíduos (Popma & Green, 1990; Kubitza, 2000; Borges, 2002).

A prática mais utilizada para o controle da reprodução, é a criação de populações monossexo. Na tilápia do Nilo, os machos apresentam melhor crescimento e desempenho na engorda, uma vez que as fêmeas, além de utilizarem grande parte de suas reservas para as atividades reprodutivas, não se alimentam durante o período da incubação oral dos ovos, sendo indicada a criação de populações monossexo macho (Beardmore *et al.*, 2001; Phelps & Popma, 2000).

Um dos métodos mais comuns atualmente é a reversão sexual de larvas com a utilização de rações contendo hormônios esteróides sexuais sintéticos (Popma & Green, 1990; Macintosh & Little, 1995). Apesar de ter sido demonstrado em estudos específicos (Rothbard *et al.*, 1990; Curtis *et al.*, 1991) que o hormônio não apresenta resíduos nos tecidos dos peixes tratados, existe ainda as preocupações quanto a sua liberação no ambiente e a reação dos consumidores (Beardmore *et al.*, 2001; Karayücel *et al.*, 2003).

Estas preocupações têm feito com que se busque uma melhor qualidade e eficiência no processo, com a diminuição dos custos e riscos, e principalmente a redução dos impactos ambientais (Pandian & Sheela, 1995; Baras *et al.*, 2001).

Na tilápia do Nilo, estudos recentes, demonstraram que as altas temperaturas da água podem causar efeitos semelhantes aos provocados pelos hormônios esteróides na reversão sexual, com variações nas proporções macho:fêmea de acordo com a termo-sensibilidade das linhagens e famílias dos peixes estudados (Baroiller *et al.*, 1995; Abucay *et al.*, 1999; Baras *et al.*, 2001; Altena & Hörst-Schwark, 2002; Müller-Belecke *et al.*, 2003).

O presente estudo pretende investigar os efeitos da temperatura da água na produção de populações monossexo macho de tilápia do Nilo da linhagem tailandesa Chitralada.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, para testar os efeitos da temperatura e de diferentes períodos de exposição, na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem tailandesa Chitralada.

Local

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Reprodução e Reversão Sexual de Peixes, do Centro de Tecnologia em Piscicultura (CTP), pertencente à Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Distrito Federal (SEAPA-DF), localizado na Granja Modelo do Ipê, em Brasília. O período experimental foi de 12/04/2003 a 17/07/2003, sendo que cada um dos dois experimentos teve a duração de 60 dias.

Animais

Os animais utilizados nos experimentos, foram originários do plantel de reprodutores de tilápia do Nilo da linhagem tailandesa Chitralada, de uma empresa comercial de produção de alevinos, localizada no Estado de Minas Gerais. O lote de reprodutores foi composto de 800 fêmeas e 260 machos, criados em gaiolas de reprodução, também conhecidas como hapas, colocadas em viveiros cobertos com um filme de polietileno. O sistema de reprodução adotado foi o descrito por Peixoto

& Pereira Júnior (2003), e consistia das seguintes etapas: reprodução semanal sincronizada, coleta de ovos na boca das fêmeas e incubação artificial.

Para obter uma amostra representativa de uma população normal de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, em reprodução comercial, os lotes foram amostrados de um total semanal produzido de aproximadamente 200.000 larvas. Foram utilizados lotes de 2.500 animais para o experimento 1 e de 3.000 animais para o experimento 2.

As larvas chegaram ao CTP com idade entre oito e nove dias após a eclosão (DAE), sendo que com esta idade os animais ainda não haviam iniciado a receber a alimentação exógena e ainda não tinham completado a reabsorção do saco vitelínico. Foram ainda avaliadas quanto à vitalidade e à ausência de ectoparasitas.

Tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado para os dois experimentos, sendo o experimento 1 constituído de dois tratamentos com oito repetições cada, e o experimento 2 de quatro tratamentos com quatro repetições cada.

Buscando verificar a existência da característica da termo-sensibilidade, no experimento 1, foram aplicados dois tratamentos: manutenção constante da temperatura da água a 27°C (temperatura controle) ou manutenção constante da temperatura da água a 35°C (temperatura alta). Em ambos os tratamentos, o período de exposição foi de 28 dias.

A fim de testar os efeitos de diferentes períodos de exposição a temperaturas altas, no experimento 2, foram aplicados quatro tratamentos. No primeiro, a temperatura da água foi mantida constante a 35°C durante 28 dias (período controle), enquanto que nos demais, a temperatura da água foi mantida constante a 35°C, por períodos que variaram entre 7, 14 e 21 dias. Após estes períodos, a temperatura foi reduzida a 27°C, até que se completasse 28 dias.

Unidades Experimentais

As unidades experimentais foram constituídas por caixas térmicas de poliestireno expandido, com medidas internas de 54 cm x 33,5 cm x 29 cm, de comprimento, largura e altura, respectivamente. As caixas eram revestidas com pintura acrílica, na cor branca, com volume útil de 40 litros, e possuíam um sistema de recirculação de água com temperatura constante. A temperatura foi mantida através de controladores digitais (Full Gauge MT-511R e MT-516R), com registro de memória de temperatura máxima e mínima, conectados a aquecedores elétricos de 1.000 Watts de potência.

Nas caixas, o fluxo de água foi mantido contínuo a 0,8 litros por minuto, através de bombas submersas (Sarlo Better 550), o que possibilitava uma renovação completa a cada 50 minutos, bem como o funcionamento dos filtros biológicos.

Para a oxigenação da água, cada caixa foi equipada com uma pedra porosa ligada, através de mangueiras plásticas e tubos de PVC, ao compressor de ar com 1,5 hp de potência.

Para reduzir as perdas de temperatura e, ao mesmo tempo, facilitar a visualização dos animais, as caixas foram cobertas com tampas de vidro liso incolor de 8mm de espessura. Também foi realizada uma adequação do fotoperíodo para 12 horas de luz e 12 horas de escuro (12:12), através de quatro lâmpadas incandescentes de 100 Watts cada, localizadas um metro acima dos conjuntos de caixas, ligadas a um dos controladores digitais de temperatura (Full Gauge MT-516R) que possuía função de timer cíclico.

Procedimentos Experimentais

Nos experimentos 1 e 2, nove dias após a eclosão (9 DAE) as larvas foram subdivididas, aleatoriamente, em 16 lotes de 130 animais cada, sendo os mesmos distribuídos entre as unidades experimentais. Inicialmente, todas as caixas apresentavam temperatura constante de 27°C. Nas caixas onde foram aplicados os tratamentos com temperatura alta (35°C), a água foi aquecida gradativamente, elevando-se 4°C a cada 12 horas, até que se alcançasse a temperatura desejada.

Dez dias após a eclosão (10 DAE), os tratamentos foram efetivamente iniciados, sendo chamado de dia 1 dos experimentos, com todas as temperaturas estabilizadas e mantidas constantes.

Na fase de aplicação dos tratamentos (Fase 1), que teve uma duração de 28 dias, os lotes de larvas foram mantidos nas unidades experimentais, expostos a temperaturas constantes, de acordo com cada tratamento. Ao final do período de exposição aos tratamentos com temperatura alta, a água foi também resfriada gradativamente, reduzindo-se 4°C a cada 12 horas, até retornar à temperatura de 27°C.

No dia 29, após o término da Fase 1, a temperatura de todas as caixas foi mantida em 27°C, e os lotes, devidamente identificados, foram transferidos para a fase de crescimento (Fase 2). Nessa fase, os animais foram mantidos em tanques circulares de fibrocimento com volume útil de 400 litros, revestidos com pintura acrílica na cor branca, que estavam em sistema de recirculação de água com temperatura parcialmente controlada. Na Fase 2, os animais permaneceram por mais 32 dias, até o final do período experimental, possibilitando a identificação e a sexagem das gônadas.

A temperatura da água era verificada uma vez ao dia, pela manhã (8:00h), pela leitura direta do visor dos controladores digitais, e pelo registro das temperaturas máximas e mínimas, sendo confirmada através do registro individual das unidades experimentais, com termômetro digital portátil de vareta (Minipa MV-363). Na Fase 2, a temperatura da água dos tanques circulares foi verificada duas vezes ao dia, pela manhã (8:00h) e pela tarde (16:00h), com o mesmo termômetro digital.

Para a alimentação dos animais, a partir do nono dia após a eclosão (9 DAE), os mesmos receberam uma ração comercial para peixes, extrusada e finamente moída, com 42% de proteína bruta e enriquecida com vitaminas C (400mg/kg) e E (150mg/kg), fornecida *ad libitum*, com frequência de seis vezes ao dia.

A qualidade da água foi mantida através de filtros biológicos e da sifonagem diária dos restos de ração e fezes, sendo feita a renovação diária de água, entre 10 e 15 % do volume total, de forma a repor as perdas, tanto pela evaporação como pela sifonagem.

A água utilizada na reposição era aquecida ou resfriada de acordo com as temperaturas de cada caixa. As operações de limpeza e sifonagem foram realizadas pela manhã após a verificação das temperaturas. Os tanques também foram sifonados diariamente, com renovação de água entre 2,5 a 5% do volume total.

Os parâmetros da qualidade da água observados foram os seguintes: oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade total e amônia total. Procurou-se manter os níveis de oxigênio dissolvido acima de 4ppm; o do pH entre 6,0 e 8,5; o da alcalinidade acima de 50 mg/l; e o de amônia ionizada abaixo de 0,02mg/l.

O oxigênio dissolvido foi monitorado, semanalmente, com oxímetro digital (YSI F-1550), enquanto que os demais parâmetros foram com um kit colorimétrico (Alfa-tecnoquímica), com a mesma frequência.

A mortalidade foi verificada e registrada diariamente, a partir da observação direta das unidades experimentais, principalmente no momento da sifonagem, determinando a sobrevivência aparente, sendo que a sobrevivência real foi determinada pela diferença entre a contagem inicial e final dos animais, tanto para a Fase 1 como para a Fase 2.

Para as medidas de peso corporal e comprimento total, retirou-se, aleatoriamente, uma amostra de dez animais de cada unidade experimental, que foram medidos e pesados, no início da Fase 1 para os dois experimentos, e no final da Fase 1 do experimento 2. O peso corporal foi determinado utilizando uma balança com precisão de 0,0001g (Bosh 2000), retirando o excesso de água dos animais com papel absorvente, enquanto que o comprimento total foi medido com um paquímetro com precisão de 0,05 mm (Mitutoyo). Os animais amostrados no início dos experimentos 1 e 2 (dia 1) foram descartados, reduzindo o número inicial de animais por lote para 120 larvas. Os animais amostrados no final da aplicação

dos tratamentos (Fase 1) do experimento 2 (dia 29), retornaram para os respectivos tanques, dando continuidade à fase de crescimento (Fase 2).

Ao final da Fase 2, dos experimentos 1 e 2, quando os animais encontravam-se com idade de 69 dias após eclosão (69 DAE), todos foram sacrificados por choque térmico, em recipientes com água e gelo com temperatura de 0,5°C, sendo pesados e medidos.

Todos os animais foram identificados individualmente com etiquetas numeradas, fixadas com fio de nylon, possibilitando a comparação das estruturas gonadais entre animais de mesmo peso e tamanho.

Em seguida, os animais divididos pelos seus lotes de tratamentos, foram acondicionados em recipientes plásticos com solução do fixador de Bouin, para estabilização dos tecidos, e armazenados sob refrigeração para posterior análise da proporção de sexos.

A proporção de sexos foi determinada pela análise das gônadas, utilizando a técnica do aceto-carmim, inicialmente descrita por Guerrero & Shelton (1974), como instrumento para sexagem de alevinos de tilápia azul (*Oreochromis aureus*) e bluegill (*Lepomis macrochirus*), sendo adaptada e validada para alevinos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) por Wassermann & Afonso (2002).

Para o preparo da solução do corante aceto-carmim, adicionaram-se 0,5g de corante índigo carmim em pó, a 100ml de ácido acético a 45%, fervendo por 4 minutos. Após esfriar, a solução foi filtrada para a remoção de partículas grosseiras, e armazenada em frasco escuro, para evitar a decomposição do corante pela luz.

Os animais foram retirados da solução do fixador de Bouin, e dissecados com auxílio de tesoura pequena, realizando uma incisão ventral para evisceração e exposição das gônadas, já que na tilápia do Nilo, as mesmas encontram-se

dispostas no sentido longitudinal, em contato com a parte ventral da bexiga natatória.

Para a remoção das gônadas, foram rompidos os ligamentos de sustentação com o uso de pinça de ponta fina. Após a retirada das duas gônadas de cada animal, as mesmas foram colocadas sobre lâmina de vidro, com a adição de algumas gotas do corante aceto-carmim, cobertas com lamínula, levemente pressionada, com o objetivo de romper a estrutura externa das gônadas.

A visualização das estruturas gonadais foi feita com microscópio binocular óptico (Coleman) nos aumentos de 40, 100 e 400 vezes. As lâminas foram fotografadas, adaptando uma máquina fotográfica digital (Sony DSC P-52) junto à ocular.

Para determinação do sexo gonadal dos animais, foram adotados os seguintes critérios: nos machos, presença de cistos e de espermatogônias e espermatócitos, e nas fêmeas, presença de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento (cromatina-nucléolo e perinucleolar) e proliferação das células do estroma.

A morfologia externa da gônada, a sua localização e inserção na cavidade abdominal, assim como a sua afinidade na presença da solução do corante de aceto-carmim, foram observações de menor importância, mas também úteis para a determinação do sexo gonadal.

Na Figura 1, é possível a visualização de algumas etapas dos experimentos.

Os efeitos dos tratamentos de temperatura da água na masculinização foram estimados, levando-se em consideração as proporções de sexos, as taxas de sobrevivência e canibalismo, e as medidas de peso corporal e comprimento total, entre o grupo controle e demais tratamentos.

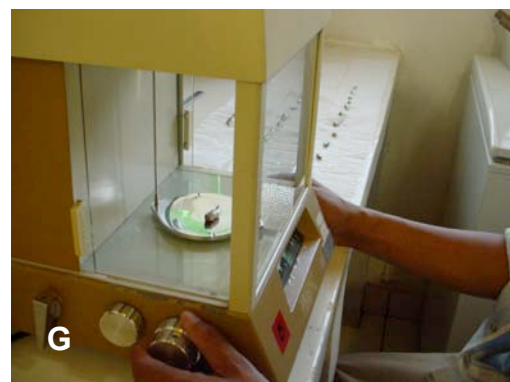


Figura 1 – Visão geral dos experimentos: larvas com saco vitelínico 8 DAE (A); alevinos 38 DAE (B); unidades experimentais, Fase 1 (C) e Fase 2 (D); medição oxigênio (E); alimentação (F); pesagem (G); alevinos 69 DAE com etiquetas na solução de Bouin (H)

Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados, a estimativa para proporção de sexos foi feita utilizando o teste de Qui-Quadrado (χ^2), com nível de significância de 0,01. Para os parâmetros peso corporal, comprimento total, mortalidade, sobrevivência e canibalismo, foi feita a análise de variância (PROC GLM) com teste de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de 0,05, sendo feita também, análise de regressão (PROC REG) para os dados de peso corporal e comprimento total. Para os valores apresentados em percentagem, os dados dos parâmetros analisados foram transformados pela expressão $y = \arcsen \sqrt{x/100}$, onde y = valor transformado e x = valor em percentagem do parâmetro. Na análise estatística foi utilizado o software *Statistical Analysis System* (SAS, 2001).

RESULTADOS

Temperatura e Qualidade da Água

Os parâmetros de qualidade de água monitorados durante os experimentos, encontram-se dentro do recomendado para a aqüicultura por Tavares (1995).

Durante a condução dos experimentos, os valores medidos para a temperatura da água, utilizada nos tratamentos, mantiveram-se constantes pelo período correspondente, do início da alimentação exógena das larvas (10 DAE) até o final da aplicação de cada tratamento nas caixas (Fase 1), conforme mostrado na Tabela 1. As oscilações diárias nas temperaturas foram obtidas através da leitura direta dos controladores digitais, pelos registros das temperaturas máximas e mínimas, mostrando pequenas oscilações durante o período de aplicação dos tratamentos de temperatura.

Como pode ser visto na Tabela 1, os valores da temperatura da água, medidos nos tanques na fase de crescimento (Fase 2), mostraram variações maiores do que as observadas para Fase 1.

Nos dois experimentos, os valores médios para oxigênio dissolvido na Fase 1, foram de 5,6 e 4,8 ppm, respectivamente para os caixas com temperaturas de 27 e 35°C, sendo que na Fase 2, os tanques apresentaram valores médios de 6,2ppm.

Os valores médios para pH e alcalinidade total, mantiveram-se constantes ao longo dos dois experimentos, sendo encontrado pH de 7,5 e, alcalinidade total de 60mg/l. Todas as medições para amônia total mantiveram-se abaixo do valor de 0,5ppm, limite mínimo de sensibilidade do teste colorimétrico empregado.

Tabela 1 – Valores médios semanais da temperatura da água nos experimentos 1 e 2.

Tratamento	Fase 1 Semanas (°C)				Fase 2 Semanas (°C)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Experimento 1									
27_{28d}	27,2±0,1	27,2±0,1	27,3±0,2	27,2±0,1	27,1±0,6	25,5±1,9	25,8±1,5	26,9±1,9	25,3±2,4
35_{28d}	35,1±0,3	35,2±0,2	35,2±0,1	35,0±0,1	28,8±3,1	25,2±1,8	25,8±1,6	26,8±1,9	25,2±2,2
Experimento 2									
35_{07d}	35,4±0,1	28,4±2,8	27,2±0,1	27,1±0,1	26,9±2,4	27,8±2,3	26,5±2,6	27,4±3,2	27,4±1,7
35_{14d}	35,3±0,1	35,2±0,2	28,4±2,7	27,1±0,1	26,4±2,2	26,5±2,2	26,5±2,0	27,2±2,5	27,0±1,4
35_{21d}	35,0±0,1	35,1±0,1	35,2±0,1	28,5±2,9	26,2±2,1	26,9±2,3	26,1±2,3	26,7±2,8	26,8±1,4
35_{28d}	35,0±0,1	35,1±0,1	35,1±0,1	35,1±0,1	27,3±2,3	28,1±5,0	26,7±2,5	27,4±2,9	27,3±1,4

27_{28d}: temperatura de 27°C com período de exposição de 28 dias

35_{07d}; **35_{14d}**; **35_{21d}**; **35_{28d}**: temperatura de 35°C com períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

Efeito na Proporção de Sexos e Estruturas Gonadais

Para a determinação da proporção de sexos, nos dois experimentos foram analisadas, através da técnica de aceto-carmim, as gônadas de um total de 1.225 animais.

Para a identificação microscópica de gônadas de machos e fêmeas através da técnica de aceto-carmim, foram utilizados os seguintes critérios: presença de cistos com quantidade de células germinativas (espermatogônias e espermatócitos) em machos, e presença de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento nas fêmeas. A figura 2 mostra as estruturas que foram utilizadas para diferenciar os testículos dos ovários.

Nas observações feitas no aumento de 40 vezes (Figuras 2A e 2B) o menor tamanho da estrutura testicular se tornou evidente. Não foi possível a definição de estruturas celulares nos machos, muito embora, os cistos utilizados na definição do sexo, tenham sido visualizados com relativa facilidade. Com relação aos ovários, o maior tamanho da estrutura gonadal foi observado, sendo possível identificar a presença de ovócitos.

Utilizando o aumento de 100 vezes (Figuras 2C e 2D), a identificação dos cistos nos testículos tornou-se mais evidente, embora, ainda não fosse possível, identificar o estágio de desenvolvimento das células germinativas. Nos ovários, a definição do estágio de desenvolvimento dos ovócitos foi mais evidente.

A visualização das gônadas no aumento de 400 vezes (Figuras 2E e 2F), possibilitou identificar estruturas celulares nos testículos. Além dos cistos estarem bem definidos, foi possível em alguns casos identificar espermatogônias. Nos ovários, o aumento de 400 vezes permitiu a confirmação das definições anteriores utilizando aumentos menores.

Em ambos os sexos, a presença, o tamanho e a quantidade de células germinativas foram fatores importantes na classificação, sendo células germinativas pequenas e em número reduzido nos machos, e em maior número e tamanho nas fêmeas.

Antes de sua retirada para a realização da técnica de aceto-carmim, as gônadas eram expostas e, em muitos casos já permitiam que se fizesse uma distinção macroscópica entre machos e fêmeas (Figuras 3A e 3B).

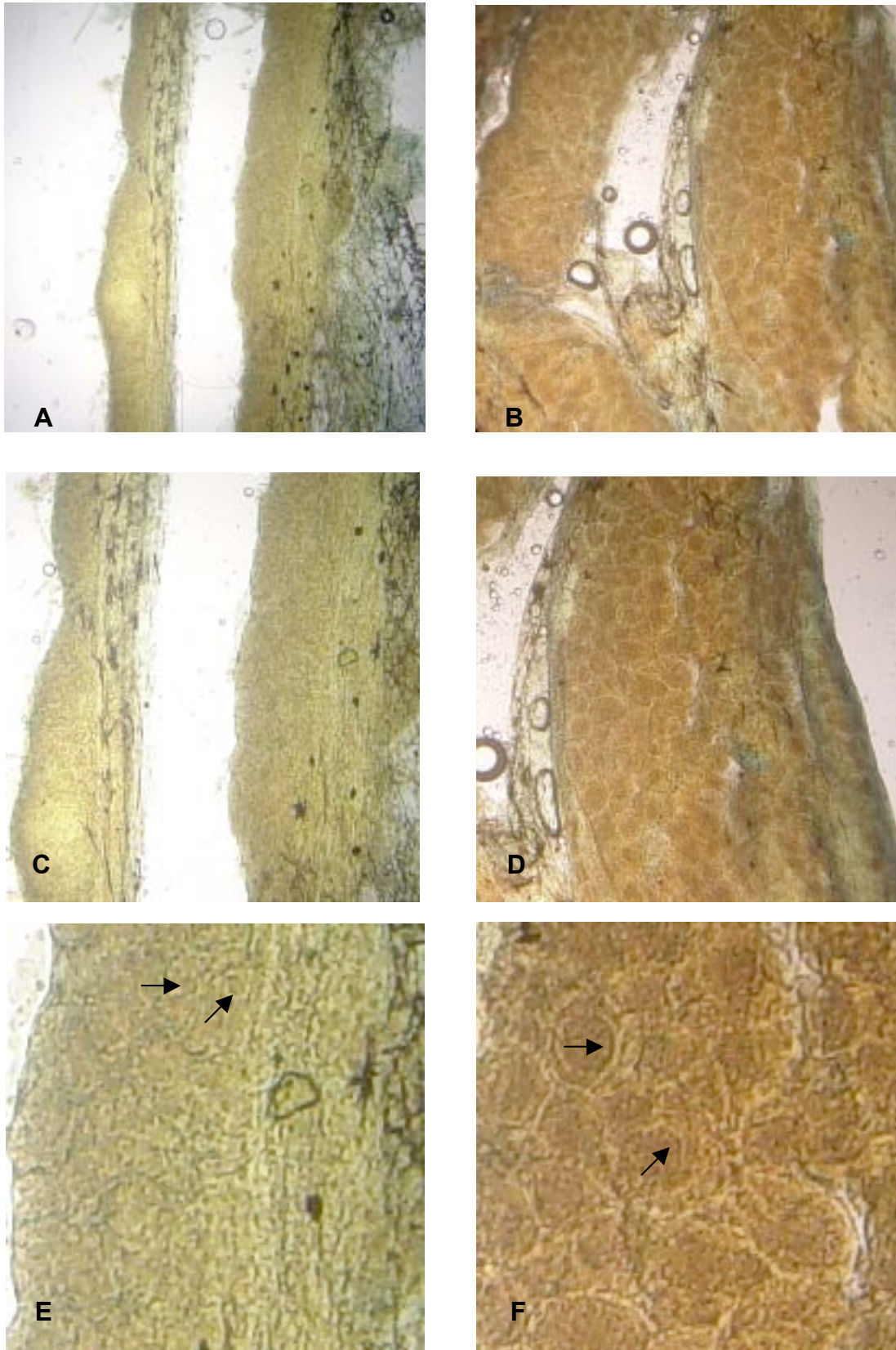


Figura 2 – Análise microscópica das gônadas coradas pelo corante aceto-carmim em diferentes aumentos (40, 100 e 400X): testículos (A, C e E) setas indicando espermatogônias; ovários (B, D e E) setas indicando ovócitos com nucléolo evidente.

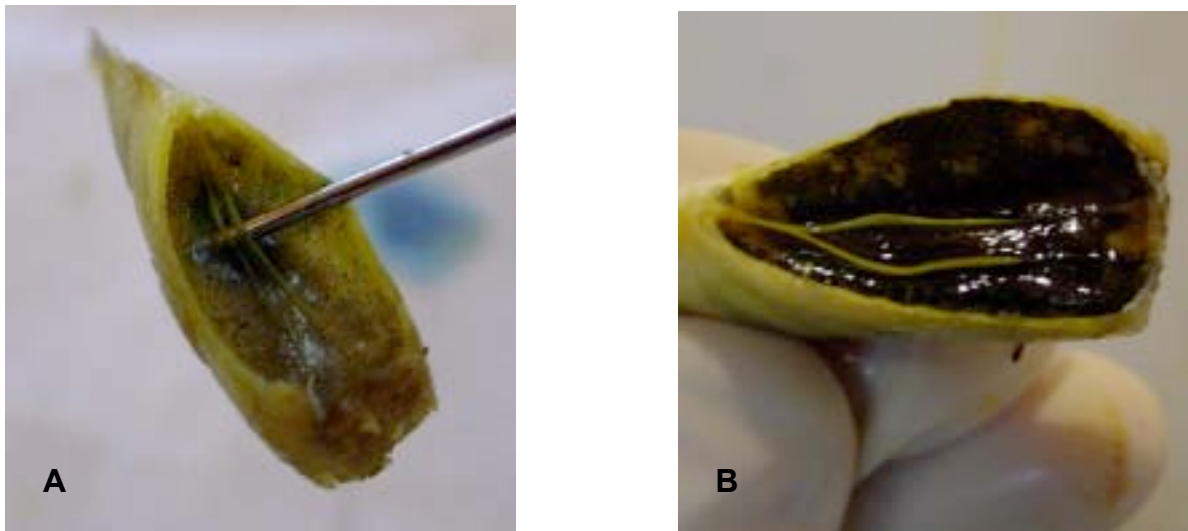


Figura 3 – Análise macroscópica das gônadas: testículos (A) e ovários (B).

Os machos foram caracterizados por apresentar um par de gônadas finas, esbranquiçadas e ocupando a parede dorsal no sentido longitudinal, estendendo-se posteriormente da cabeça até a inserção junto a papila genital. A adição da solução de Bouin, facilitou a visualização e a retirada dos testículos e, proporcionou firmeza e integridade aos tecidos.

Após a retirada das gônadas da cavidade abdominal e colocação das mesmas na lâmina, verificou-se que os testículos apresentaram maior afinidade e absorveram mais rapidamente a solução do corante aceto-carmim e, quando em contato com esta, se enovelaram.

Nas fêmeas, o par de gônadas se caracterizava por ser mais espesso, arredondado e opaco, ocupando a parede dorsal no sentido longitudinal, porém a parte mais anterior da gônada iniciava-se mais posteriormente quando comparada aos machos e era possível visualizar ligamentos que mantinham as gônadas ligadas à parede dorsal. A adição da solução de Bouin também deu mais firmeza ao tecido dos ovários, facilitando a retirada dos mesmos.

Os ovários mostraram menor afinidade e permaneceram com sua estrutura retilínea quando em contato com a solução do corante aceto-carmim. Foi possível constatar também que os ovários apresentaram-se mais largos e curtos quando comparados a testículos de animais de mesmo peso e comprimento.

Os resultados das proporções do sexo encontrados na análise microscópica dos animais após 60 dias (69 DAE), nos experimentos 1 e 2, foram analisados pelo teste Qui-quadrado, comparando os tratamentos entre si.

No experimento 1, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre as proporções de sexo dos animais dos tratamentos de temperatura controle (27°C) e de temperatura alta (35°C), com maior proporção de machos no tratamento de temperatura alta ($\chi^2 = 8,45$; $gl = 1$; $p = 0,0035$). A percentagem de machos foi de 62,27% e 72,39%, respectivamente, para os tratamentos de temperatura controle e alta como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2 – Efeito do tratamento de temperatura, aplicados a partir do 10º dia após a eclosão, na proporção dos sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, no experimento 1.

Tratamento	Machos (n)	Fêmeas (n)	Total (n)	Machos (%)
27_{28d}	203 ^b	123 ^b	326 ^b	62,27
35_{28d}	291 ^a	111 ^a	402 ^a	72,39

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($P > 0,01$) pelo Teste χ^2

27_{28d}: temperatura de 27°C com período de exposição de 28 dias

35_{28d}: temperatura de 35°C com período de exposição de 28 dias

No experimento 2, não houve diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as proporções do sexo dos animais dos tratamentos mantidos à temperatura alta (35°C) por diferentes períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias ($\chi^2 = 2,90$; $gl = 3$; $p = 0,4072$). A percentagem de machos foi de 75,86%, 69,39%, 68,60% e 66,67%, respectivamente, para 7, 14, 21 e 28 dias de período de exposição como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Efeito do tratamento de temperatura, aplicados a partir do 10º dia após a eclosão, na proporção dos sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, no experimento 2.

Tratamento	Machos (n)	Fêmeas (n)	Total (n)	Machos (%)
35_{07d}	110 ^a	35 ^a	145 ^a	75,86
35_{14d}	102 ^a	45 ^a	147 ^a	69,39
35_{21d}	83 ^a	38 ^a	121 ^a	68,60
35_{28d}	56 ^a	28 ^a	84 ^a	66,67

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($P > 0,01$) pelo Teste χ^2
35_{07d}; **35_{14d}**; **35_{21d}**; **35_{28d}**: temperatura de 35°C com períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

Para aumentar o poder do teste e melhor esclarecer os resultados, os dados dos tratamentos de temperatura alta (35°C) dos experimentos 1 e 2 foram agrupados, e da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,01$) na comparação entre diferentes períodos de exposição ($\chi^2 = 2,17$; $gl = 3$; $p = 0,5374$), como pode ser visto na Tabela 4, alterando a percentagem de machos para 71,40%, no tratamento com período de exposição de 28 dias.

Tabela 4 – Efeito do tratamento de temperatura, aplicados a partir do 10º dia após a eclosão, na proporção dos sexos da tilápia do Nilo da linhagem Chitralada, nos experimentos 1 e 2.

Tratamento (C°)	Machos (n)	Fêmeas (n)	Total (n)	Machos (%)
35 _{07d}	110 ^a	35 ^a	145 ^a	75,86
35 _{14d}	102 ^a	45 ^a	147 ^a	69,39
35 _{21d}	83 ^a	38 ^a	121 ^a	68,60
35 _{28d}	347 ^a	139 ^a	486 ^a	71,40

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($P>0,01$) pelo Teste χ^2
35_{07d}; **35**_{14d}; **35**_{21d}; **35**_{28d}: temperatura de 35°C com períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

Na análise das gônadas dos animais dos dois experimentos, não foram identificados indivíduos intersexo, onde em um animal ou gônada são observadas células ovarianas e testiculares ao mesmo tempo. Da mesma forma, não foram observadas alterações nas estruturas gonadais, entre os animais dos diferentes tratamentos.

Efeito na Sobrevivência

Para os cálculos das taxas de sobrevivência, foram consideradas as mortes registradas diariamente pela observação dos corpos presentes nas unidades experimentais, chamada de sobrevivência aparente, e a diferença entre os números iniciais e finais de cada fase, chamada de sobrevivência real. Quando os valores da sobrevivência aparente e real foram diferentes, a diferença foi atribuída ao canibalismo.

As taxas de sobrevivência real e de canibalismo dos dois experimentos, assim como a distribuição da mortalidade ao longo das semanas nas Fases 1 e 2 podem ser vistas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Valores das taxas de mortalidade, sobrevivência e canibalismo, registrados no período de aplicação dos tratamentos (Fase 1) para os experimentos 1 e 2.

Tratamento	Mortalidade (%)				Sobrevivência (%)		Canibalismo (%)
	Semanas						
Experimento	1	2	3	4	Aparente	Real	
1							
27_{28d}	51,46 ^a	2,40 ^a	0,52 ^a	0,73 ^a	44,90 ^b	42,40 ^b	2,50 ^b
35_{28d}	12,50 ^b	0,10 ^b	0,31 ^a	1,15 ^a	85,94 ^a	66,56 ^a	19,38 ^a
Experimento							
2							
35_{07d}	15,42 ^b	8,54 ^a	5,00 ^{ab}	4,17 ^a	66,88 ^a	62,08 ^a	4,80 ^b
35_{14d}	17,50 ^b	6,67 ^a	12,08 ^a	6,46 ^a	57,29 ^{ab}	53,96 ^a	3,33 ^b
35_{21d}	25,83 ^b	1,25 ^b	3,54 ^{ab}	4,38 ^a	65,00 ^a	40,83 ^b	24,17 ^a
35_{28d}	40,21 ^a	1,04 ^b	2,50 ^b	3,96 ^a	52,29 ^b	32,50 ^b	19,79 ^a

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($P>0,05$) pelos Testes F e Tukey

27_{28d}: temperatura de 27°C com período de exposição de 28 dias

35_{07d}; **35_{14d}**; **35_{21d}**; **35_{28d}**: temperatura de 35°C com períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

Tabela 6 – Valores das taxas de mortalidade, sobrevivência e canibalismo, registrados na fase de crescimento (Fase 2) para os experimentos 1 e 2.

Tratamento	Mortalidade (%)					Sobrevivência (%)		Canibalismo (%)
	Semanas							
Experimento	5	6	7	8	9	Aparente	Real	
1								
27_{28d}	0,10 ^b	0,00 ^b	0,42 ^b	0,42 ^b	1,46 ^a	94,35 ^a	85,01 ^a	9,34 ^a
35_{28d}	1,35 ^a	2,60 ^a	4,58 ^a	4,27 ^a	0,94 ^a	79,34 ^b	63,85 ^b	15,49 ^a
Experimento								
2								
35_{07d}	3,75 ^b	4,38 ^a	2,92 ^a	1,25 ^a	1,67 ^a	77,52 ^a	49,66 ^a	27,86 ^a
35_{14d}	4,58 ^{ab}	1,88 ^a	2,71 ^a	0,63 ^a	1,46 ^a	79,15 ^a	61,39 ^a	17,76 ^{ab}
35_{21d}	7,29 ^a	1,88 ^a	0,63 ^a	1,25 ^a	0,63 ^a	71,43 ^a	62,24 ^a	9,19 ^b
35_{28d}	5,83 ^a	2,08 ^a	1,04 ^a	0,63 ^a	0,63 ^a	68,59 ^a	53,85 ^a	14,74 ^{ab}

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($P>0,05$) pelos Testes F e Tukey

27_{28d}: temperatura de 27°C com período de exposição de 28 dias

35_{07d}; **35_{14d}**; **35_{21d}**; **35_{28d}**: temperatura de 35°C com períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

No experimento 1, as taxas de sobrevivência real diferiram significativamente ($p<0,05$), com uma maior sobrevivência na Fase 1 para o tratamento de temperatura alta (66,56%), ocorrendo o inverso na Fase 2, na qual houve uma maior sobrevivência para o tratamento de temperatura controle (85,01%). As taxas de canibalismo, no experimento 1, apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$)

apenas na Fase 1, com maiores percentuais para o tratamento de temperatura alta (19,38%), na Fase 2 não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$).

No experimento 2 foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) apenas para a Fase 1, com maiores taxas de sobrevivência apresentadas nos tratamentos com períodos de exposição mais curtos (7 dias= 62,08% e 14 dias= 53,96%), sendo que na Fase 2 não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos. As taxas de canibalismo, no experimento 2, apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) na Fase 1, com maiores percentuais para os tratamentos com maiores períodos de exposição (21 dias= 24,17% e 28 dias= 19,79%), na Fase 2 também houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos, com taxa de canibalismo mais alta no tratamento com menor período de exposição (27,86%).

Nos dois experimentos, os maiores valores de mortalidade foram observados na primeira semana da Fase 1, com concentração da mortalidade no segundo e terceiro dia do experimento 1, e no terceiro e quarto dia do experimento 2.

Efeito no Peso Corporal e no Comprimento Total

Os valores médios encontrados no dia 1, para peso corporal e comprimento total para as larvas iniciais (10 DAE), foram respectivamente, de $9,2\pm 1,1$ mg e $9,27\pm 0,46$ mm para o experimento 1 e, de $9,2\pm 1,4$ mg e $9,63\pm 0,69$ mm para o experimento 2. A tabela 7 mostra os valores médios de peso corporal e comprimento total, encontrados no final da Fase 2, para os experimentos 1 e 2, no final da Fase 1 para o experimento 2.

Tabela 7 – Valores médios do comprimento total e peso corporal das larvas e alevinos, ao final da aplicação dos tratamentos (Fase 1), e ao final da fase de crescimento (Fase 2) para os diferentes tratamentos dos experimentos 1 e 2.

Tratamento		Fase 1		Fase 2		
Experimento	n	Comprimento Total (mm)	Peso Corporal (g)	n	Comprimento Total (mm)	Peso Corporal (g)
Experimento 1						
27 _{28d}	NA	NA	NA	326	38,08 ± 7,66 ^a	1,0467 ± 0,7528 ^a
35 _{28d}	NA	NA	NA	402	36,84 ± 8,89 ^a	1,0450 ± 0,9482 ^a
Experimento 2						
35 _{07d}	10	17,42 ± 2,72 ^b	0,0893 ± 0,0326 ^b	145	31,91 ± 8,78 ^b	0,7105 ± 1,0416 ^{ab}
35 _{14d}	10	17,60 ± 2,88 ^b	0,0913 ± 0,0513 ^b	147	29,48 ± 6,56 ^c	0,5237 ± 0,4053 ^b
35 _{21d}	10	20,83 ± 4,32 ^a	0,1827 ± 0,1531 ^a	121	31,98 ± 7,36 ^b	0,6750 ± 0,5354 ^{ab}
35 _{28d}	10	22,50 ± 4,09 ^a	0,2229 ± 0,1350 ^a	84	35,30 ± 8,81 ^a	0,9226 ± 0,8438 ^a

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo Teste F e Tukey

27_{28d}: temperatura de 27°C com período de exposição de 28 dias

35_{07d}; **35**_{14d}; **35**_{21d}; **35**_{28d}: temperatura de 35°C com períodos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente.

NA não anotado

No experimento 1, foram analisadas as medições para peso corporal e comprimento total, apenas ao final da fase 2, sendo que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos de temperatura controle (27°C) e alta (35°C), nem para peso corporal, como para comprimento total.

No experimento 2, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, para os valores de peso corporal e comprimento total, tanto no final da Fase 1 quanto da Fase 2. Os maiores valores para peso corporal e comprimento total, foram encontrados na Fase 1, nos animais dos tratamentos com período de exposição mais longos (21 e 28 dias), sendo que na Fase 2, o tratamento com período de exposição mais longo (28 dias), apresentou o melhor resultado para peso corporal e comprimento total, quando comparado com os demais tratamentos.

Ao verificar a distribuição de pesos corporais e comprimentos totais entre os sexos (Tabela 8), foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no experimento 1, sendo as médias de peso corporal e comprimento total das fêmeas maiores que a dos machos. No experimento 2 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre machos e fêmeas, tanto em relação ao peso corporal quanto em relação ao comprimento total.

Tabela 8 – Valores médios do comprimento total e peso corporal dos alevinos, ao final da fase de crescimento (Fase 2), distribuído entre os sexos nos experimentos 1 e 2.

	n	Comprimento Total (mm)	Peso Corporal (g)
Experimento 1			
Machos	494	36,78±8,26 ^b	0,9796±0,8342 ^b
Fêmeas	234	38,70±8,50 ^a	1,1854±0,9147 ^a
Experimento 2			
Machos	351	31,30±7,97 ^a	0,6584±0,7769 ^a
Fêmeas	146	32,95±8,17 ^a	0,7402±0,6971 ^a

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Ao término do período experimental (69 DAE) dos dois experimentos, tanto o peso corporal quanto o comprimento total dos animais, apresentaram comportamento quadrático ($p < 0,05$) segundo demonstrado nos gráficos e equações da Figura 7.

Os coeficientes de variação (CV) para peso corporal aumentaram ao longo dos experimentos, com índices entre 48,4 e 146,6%. Para facilitar a visualização, os dados foram agrupados com a sobrevivência e o canibalismo e estão representados graficamente nas Figuras 8 e 9, respectivamente para os experimentos 1 e 2.

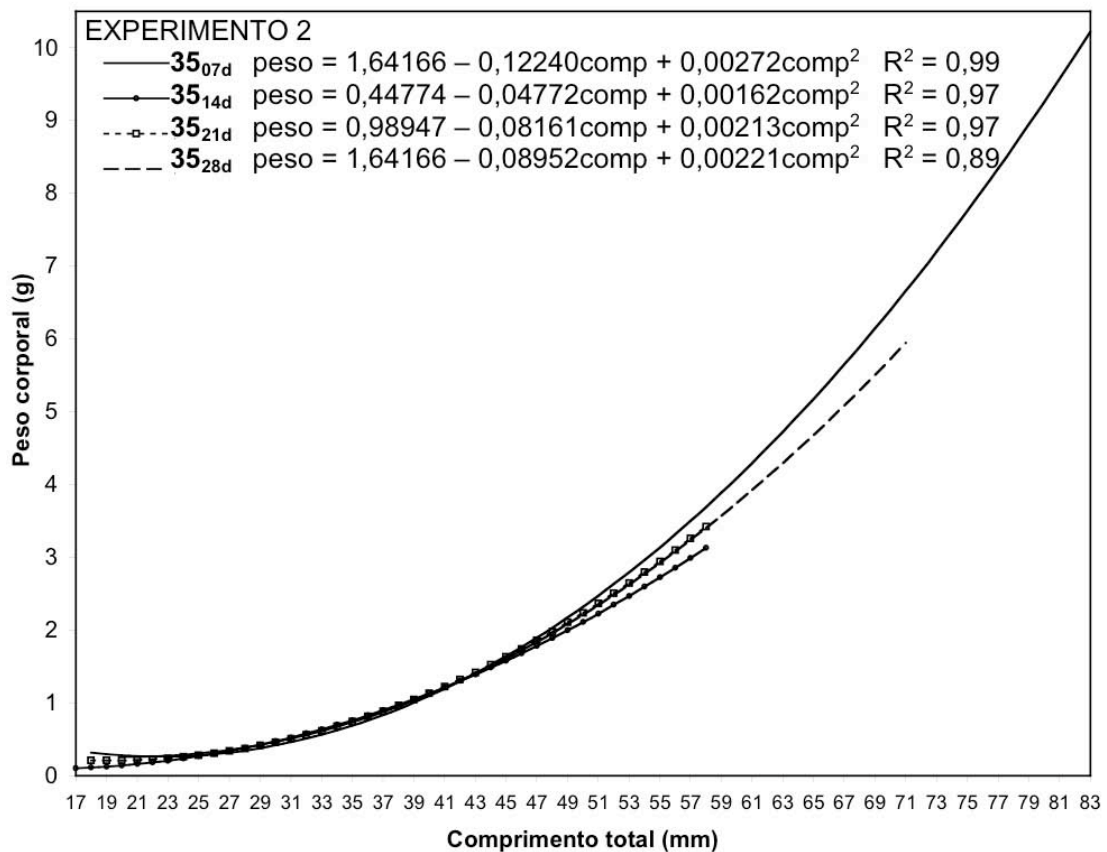
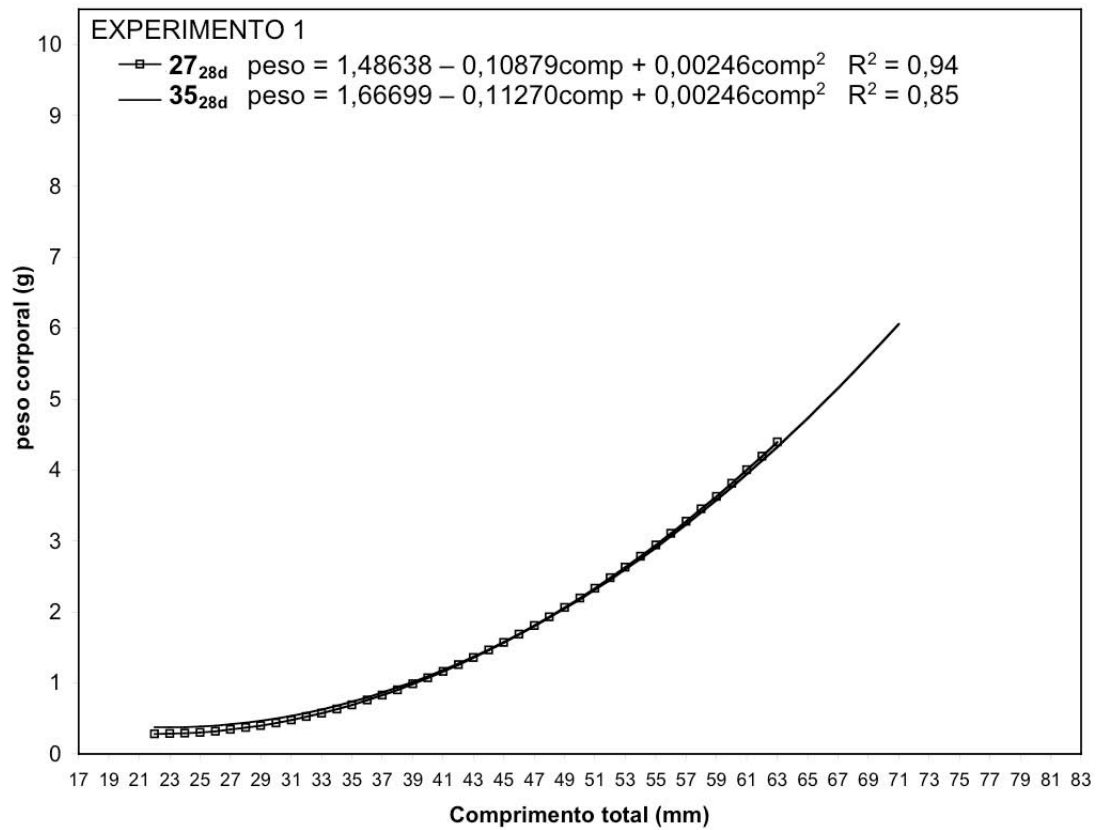


Figura 4 – Curvas de regressão para peso corporal e comprimento total, ao final do período experimental, para os diferentes tratamentos nos dois experimentos.

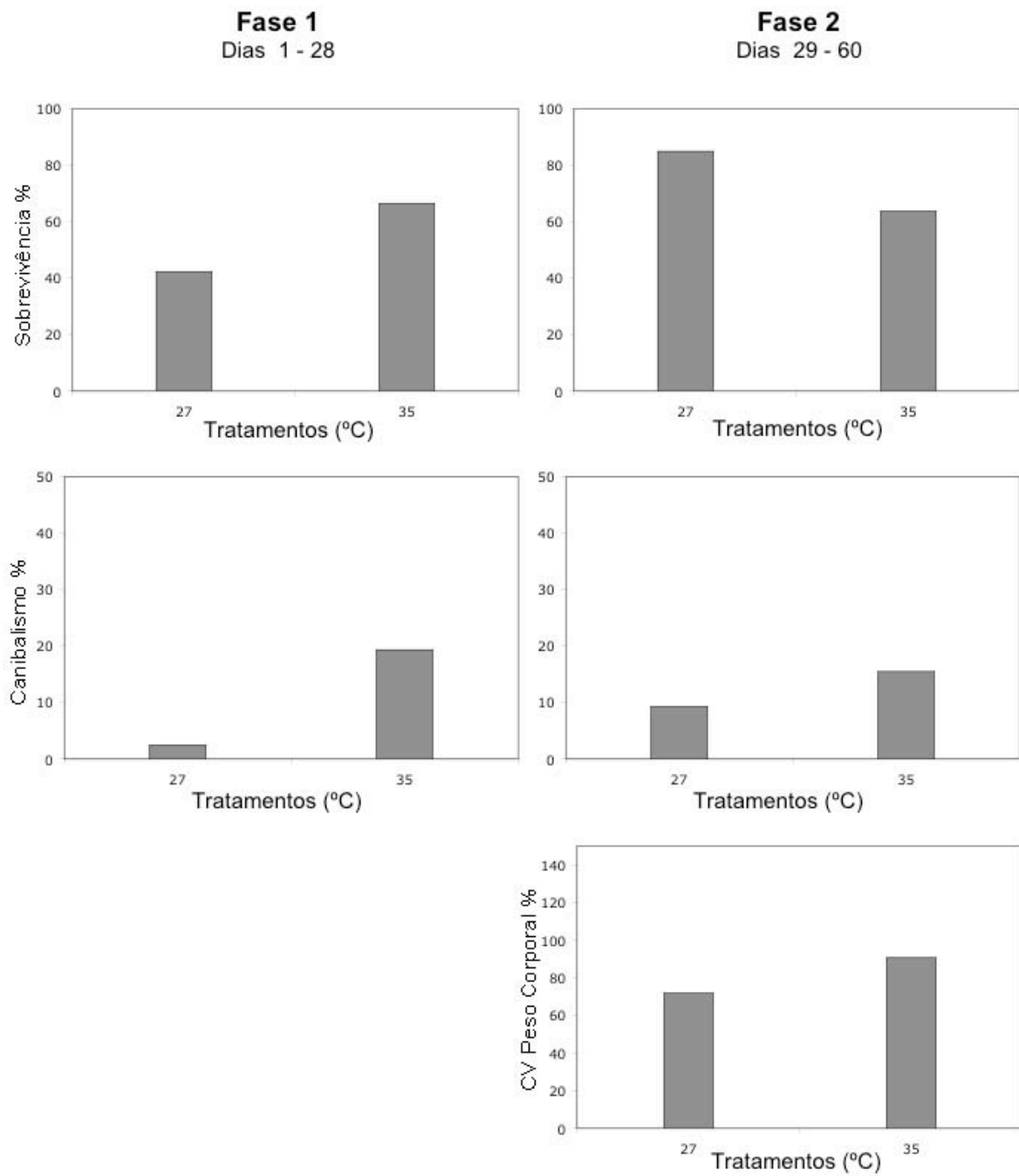


Figura 5 – Valores médios de sobrevivência, canibalismo e coeficiente de variação para peso corporal, para os diferentes tratamentos do experimento 1.

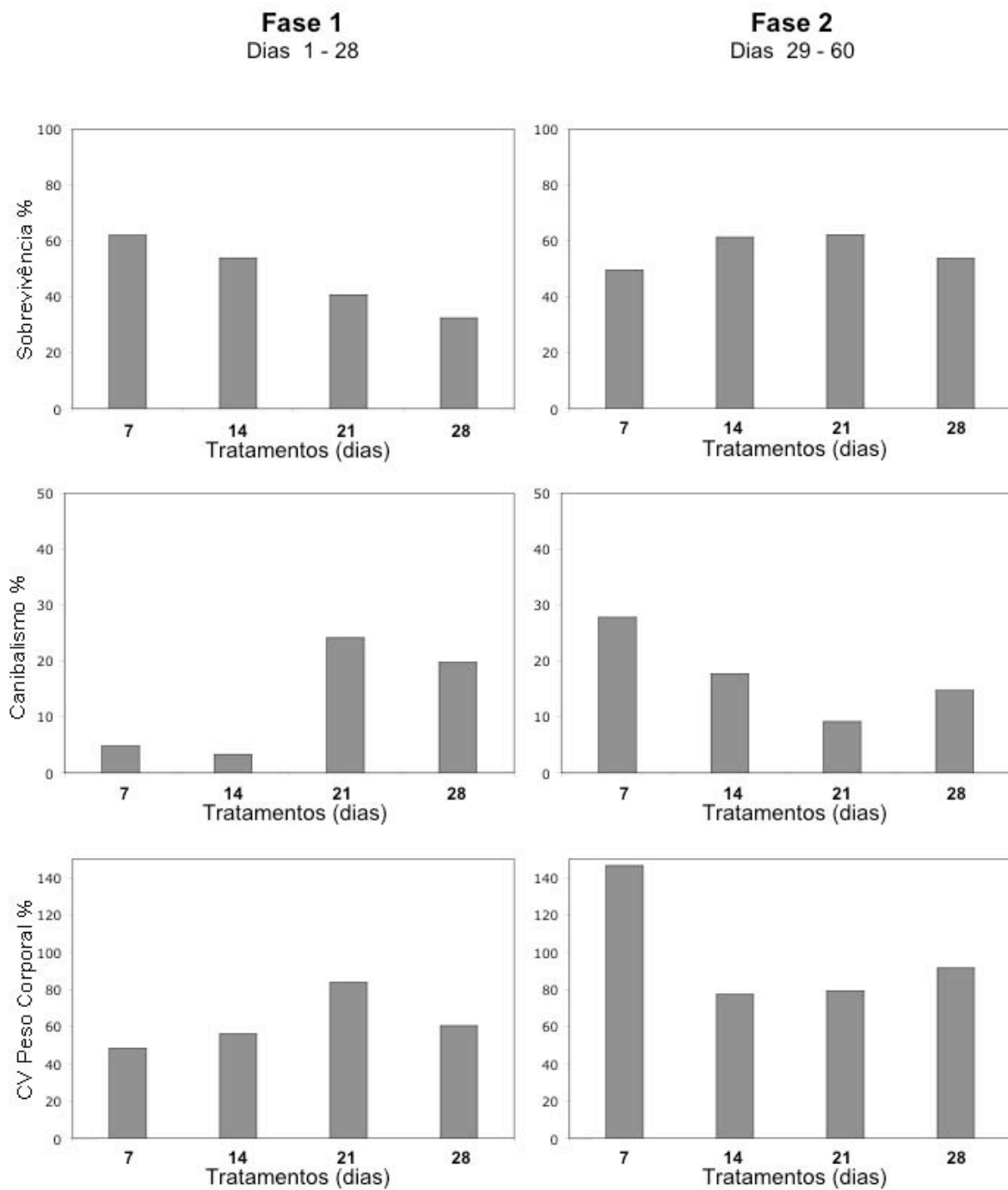


Figura 6 – Valores médios de sobrevivência, canibalismo e coeficiente de variação para peso corporal, para os diferentes tratamentos do experimento 2.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados fornecem evidência do efeito significativo da temperatura da água, na proporção dos sexos em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) da linhagem tailandesa Chitralada, confirmando os resultados já obtidos por diversos autores em estudos prévios para outras linhagens de tilápia do Nilo (Baroiller *et al.*, 1995; Abucay *et al.*, 1999; Baras *et al.*, 2001; Altena & Hörst-Schwark, 2002; Karayücel *et al.*, 2003; Müller-Belecke *et al.*, 2003), bem como para outras espécies de tilápias (Desprez & Mélard, 1998; Baras *et al.*, 2000; Baras *et al.*, 2002; Wang & Tsai, 2000), onde a temperatura é considerada como principal fator ambiental, influenciando na diferenciação sexual em tilápias (Baroiller *et al.*, 1999; Baroiller & D’Cotta, 2001), chegando, inclusive, a sobrepor totalmente os fatores genéticos (Kwon *et al.*, 2002).

Da mesma forma, os resultados obtidos tanto no presente trabalho como nos dos autores acima mencionados demonstraram que em temperaturas mais altas, apareceram fortes efeitos masculinizantes em animais mistos com genótipos XX e XY. Foi observado ainda, que as linhagens apresentaram sensibilidades diferentes quando submetidas a tratamentos de temperaturas variáveis, visando alterações na proporção de sexos. De maneira geral, foi demonstrado que na tilápia do Nilo, tratamentos simples com temperatura podem aumentar, de maneira repetida, a percentagem de machos (Müller-Belecke *et al.*, 2003).

No presente estudo, não foram observadas variações significativas quanto à distribuição das proporções de machos nos lotes dos diferentes tratamentos de temperatura 27°C e 35°C, o que difere dos resultados encontrados por Baroiller *et al.* (1995), Abucay *et al.* (1999) e Baras *et al.* (2001), onde as outras linhagens estudadas apresentaram grandes variações na proporção de sexos.

Na maioria dos casos, essas diferenças relatadas, foram atribuídas a heterogeneidade das linhagens avaliadas, ou seja, onde havia maior heterose houve maior variação na proporção dos sexos. Os autores mencionaram ainda que o aumento na temperatura, durante o período lábil da diferenciação sexual poderia resultar numa proporção de sexos não esperada entre indivíduos com diferentes cargas genéticas. Pelo exposto, pode-se deduzir que a população da tilápia do Nilo linhagem Chitralada, utilizada no presente estudo, deve apresentar um baixo grau de heterose, o que era esperado, pela reduzida base genética importada em 1996.

Na Tailândia, Tuan *et al.* (1999) realizaram um estudo sobre a determinação sexual nesta mesma linhagem, no qual foram analisadas 95 progênes, onde foi verificada uma grande variação na proporção de machos (15,5 a 100%). Esta variação foi atribuída, a princípio, à heterogeneidade da linhagem; no entanto, mais tarde os próprios autores admitiram que as variações sazonais de temperatura podem ter sido o principal fator na variação dos sexos, uma vez que os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente, o que vem a reforçar os resultados encontrados no presente estudo.

Uma diferença entre o estudo atual e os estudos realizados por outros autores, foi a metodologia adotada, uma vez que os mesmos analisaram progênes obtidas a partir de diferentes casais (expressão de indivíduos), enquanto que neste trabalho analisou-se animais amostrados de uma população (expressão da linhagem como um todo). Esta diferença reforça os resultados obtidos quanto à estabilidade da expressão da termo-sensibilidade na linhagem Chitralada.

Considerando os aspectos práticos e comerciais, a técnica mais eficiente é aquela que maximiza o sexo gonadal desejado e, ao mesmo tempo, minimiza o tempo de intervenção sobre os animais (Donaldson, 1996). No presente estudo, as

proporções de machos obtidas nos tratamentos de temperatura, indicaram ser possível adotar períodos mais curtos de exposição (uma semana ou 7 dias), uma vez que não diferiram significativamente quando comparadas ao tratamento de exposição por quatro semanas (28 dias).

Quando comparada com tratamentos hormonais que exigem período entre três e quatro semanas (Popma & Green, 1990; Phelps & Popma, 2000), a utilização de períodos mais curtos do tratamento de temperatura alta, que se mostrou eficiente no presente trabalho, apresenta-se vantajosa, tanto pela diminuição do período de manipulação dos animais, quanto pela redução de custos com o aquecimento da água por períodos menores, quanto pelo fato de ser um método mais seguro pela não utilização de esteróides.

Para que se obtenha sucesso na alteração da proporção de sexos pelo uso de temperatura, é imprescindível que os tratamentos comecem a ser aplicados antes do início da diferenciação sexual das gônadas, como realizado no presente estudo. De acordo com Baroiller *et al.* (1999) e Devlin & Nagahama (2002), o tratamento deve pelo menos sobrepor parcialmente o período de diferenciação gonadal, o que significa que os tratamentos devem iniciar concomitantemente ao final da reabsorção do saco vitelínico. Neste trabalho o final da reabsorção do saco vitelínico ocorreu no 10º dia após a eclosão. O período em que as gônadas apresentam sensibilidade às temperaturas parece ocorrer no mesmo momento e ter a mesma duração do período em que apresentam sensibilidade aos tratamentos hormonais. Essa coincidência de períodos sensíveis de temperatura e hormônios, poderia resultar de mecanismos semelhantes, causados por temperaturas altas e por hormônios durante a diferenciação sexual, onde a temperatura influencia o

mecanismo de ação da enzima aromatase, que catalisa a transformação de andrógenos para estrógenos (Baroiller & D'Cotta, 2001; D'Cotta *et al.*, 2001).

As estruturas gonadais analisadas pela técnica de aceto-carmim, possibilitaram definir com segurança os testículos e os ovários. Além disso, como as gônadas foram retiradas intactas, foi possível fazer observações em toda a sua extensão. Os critérios utilizados para definir as fêmeas e os machos, seguiram as orientações de Wassermann & Afonso (2002), e foram mais claros e específicos que aqueles utilizados por Guerreiro & Shelton (1974). Esses últimos autores definiram as fêmeas pela presença de ovócitos, enquanto que os machos o foram praticamente por exclusão, podendo ocorrer a classificação de animais intersexo como sendo fêmeas.

Na identificação das estruturas gonadais, sua morfologia externa, sua localização, sua inserção na cavidade abdominal, bem como sua afinidade e comportamento na presença da solução de aceto-carmim, são observações que, embora de menor importância, foram úteis para a identificação do sexo gonadal. A maior reação dos testículos que, quando submetidos à solução de aceto-carmim, apresentam uma coloração mais intensa, deve-se, provavelmente, a suas características físico-químicas.

No presente estudo, em nenhuma ocasião foram evidenciados indivíduos intersexo, o que está de acordo com as observações de outros estudos com tratamentos de temperatura, realizados com animais mistos com genótipos XX e XY, onde a presença de indivíduos com essas características é rara ou nula. A frequência de animais intersexo é maior nos casos em que os indivíduos sofreram processo incompleto de reversão sexual (Carvalho & Foresti, 1996; Phelps & Popma, 2000), reforçando a eficiência dos processos com temperatura.

Quanto à taxa de sobrevivência na Fase 1 dos dois experimentos conduzidos neste trabalho, não foi possível relacioná-la à influência da temperatura. Este fato deveu-se à ocorrência concentrada de mortes nos primeiros dias dos tratamentos, em especial nos lotes do tratamento controle (27°C por 28 dias) do experimento 1 e nos lotes do tratamento controle (35°C por 28 dias) do experimento 2. Como não foram identificados problemas sanitários, esses resultados podem indicar que tenha havido uma falha no início do funcionamento dos filtros biológicos, gerando um acúmulo de produtos nitrogenados tóxicos, afetando principalmente os tratamentos citados. As análises, no entanto, não conseguiram detectar o problema, devido ao fato de estarem sendo feitas com frequência semanal, sendo que ao final da primeira semana, os filtros já teriam entrado em funcionamento normal. Apesar dos problemas enfrentados na primeira semana, os parâmetros de qualidade de água encontrados nas análises semanais estão dentro dos níveis considerados normais para a piscicultura (Tavares, 1995).

Os valores encontrados para sobrevivência estão de acordo com os relatados por Popma & Green (1990) mencionando trabalhos que utilizaram diferentes tratamentos de reversão sexual, com taxa de sobrevivência normalmente entre 70 e 80%, podendo, no entanto, apresentar valores inferiores a 50%.

As taxas de sobrevivência encontradas para a Fase 2 do presente estudo indicam que os tratamentos com a temperatura de 35°C causaram redução nas taxas de sobrevivência, quando comparados com os tratamentos com temperatura controle (27°C), o que confirma os resultados mostrados por Baras *et al.* (2001).

Um outro problema na produção de alevinos de tilápia, é a ocorrência do canibalismo, que se manifesta tão logo ocorra diferença de tamanho entre larvas e alevinos, principalmente entre 10 e 30 dias após final da reabsorção do saco

vitelínico. Macintosh & Little (1995) afirmaram que o canibalismo pode ser responsável por uma mortalidade real entre 10 e 35%. As diferenças observadas, entre as taxas de sobrevivência aparente e real nos diferentes lotes e tratamentos do presente trabalho, foram atribuídas ao canibalismo. O percentual de canibalismo variou de 2,5% a 27,8%, sendo que o valor mais baixo foi inferior ao relatado por Macintosh & Little (1995), enquanto que o valor máximo estava dentro do limite estabelecido pelos mesmos autores. As maiores taxas de canibalismo foram observadas nos lotes que apresentaram maiores coeficientes de variações para peso corporal.

Foram encontrados coeficientes de variação altos para peso corporal em todos os tratamentos, principalmente nos de temperatura alta, concordando com Vera-Cruz & Mair (1994) que encontraram valores significativamente maiores nos tratamentos de reversão hormonal (61,4 a 145,8%) quando comparados ao tratamento controle. No entanto, Volpato *et al.* (1989) relatam que o crescimento heterogêneo entre larvas e alevinos de tilápia é uma característica comum, relacionada ao estabelecimento de hierarquias entre os peixes, com poucos animais grandes e muitos pequenos.

A taxa de crescimento dos peixes está ligada a diversos fatores, englobando o ambiente de criação, a disponibilidade de alimento e as características da espécie. Deste modo, os índices de crescimento das larvas de tilápia ao final do período de reversão sexual podem apresentar uma grande variação, como as que foram encontradas neste trabalho. No estudo conduzido por Baras *et al.* (2001), ficou bem evidenciado que a exposição de larvas de tilápia do Nilo a temperaturas masculinizantes, pode diminuir significativamente as taxas de crescimento quando comparadas com temperaturas normais de cultivo.

No experimento 1, os animais não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso e comprimento, embora as médias tenham sido ligeiramente superiores para o tratamento controle (27°C). Por outro lado, os tratamentos com períodos maiores de exposição, do experimento 2, resultaram em animais com pesos e comprimentos médios significativamente maiores, tanto na Fase 1 como na Fase 2, o que está em discordância com os resultados encontrados por Baras *et al.* (2001).

Apesar das diferenças dos valores encontrados para peso corporal e comprimento total entre os sexos serem significativas apenas no experimento 1, as fêmeas existentes apresentaram valores médios superiores aos dos machos nos dois experimentos, confirmando as observações feitas por Toguyeni *et al.* (2002), durante a alevinagem, onde o peso das fêmeas aumenta inversamente à sua proporção na população. Nesta fase as fêmeas podem crescer no mesmo ritmo ou até mesmo mais rapidamente que os machos.

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que a linhagem Chitralada, assim como a linhagem Boauké (Baroiller *et al.*, 1995), possui maior sensibilidade aos tratamentos com temperatura, representando melhores opções de linhagens para o desenvolvimento da tecnologia de produção de populações monossexo macho através da temperatura. No entanto, as percentagens de machos encontradas estão abaixo do recomendado para a tilápia do Nilo, que deve ser superior a 95%, embora usualmente sejam encontrados valores entre 80 e 90% (Popma & Green, 1990). A média da proporção de machos encontrada no tratamento de temperatura alta (35°C) foi de 75% sendo que em um dos lotes este percentual chegou a 80%, valor que pode limitar o uso comercial deste método.

Nenhuma das linhagens da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) já observadas, inclusive a linhagem Chitralada do presente estudo, apresentou as vantagens verificadas na tilápia azul (*O. aureus*), que apresenta crescimento mais rápido e homogêneo, e uma melhor sobrevivência nas temperaturas masculinizantes do que nas temperaturas normais de cultivo (Baras *et al.*, 2002).

Apesar disso, a característica da termo-sensibilidade parece apresentar alta herdabilidade, necessitando de trabalhos de seleção de famílias e indivíduos que expressem melhor essa característica nas diferentes linhagens de tilápia do Nilo, principalmente visando à sua aplicação prática na produção de populações monossexo (Baroiller *et al.*, 1999; Altena & Hörst-Schwark, 2002; Müller-Belecke *et al.*, 2003).

CONCLUSÕES

Esses experimentos apresentam novas informações sobre o efeito da temperatura na produção de populações monossexo macho, nessa importante linhagem comercial da tilápia do Nilo. Nas condições em que os experimentos foram realizados foi possível concluir que:

- O tratamento de temperatura de 35°C apresentou efeito significativo na proporção de machos na tilápia do Nilo da linhagem Chitralada;
- A exposição de 7 dias à temperatura alta, a partir do 10 DAE, permitiu que se mantivesse semelhantes efeitos masculinizantes, o que sugere a sua adoção, pela conseqüente redução nos custos de aquecimento da água e de manejo dos animais;
- A maior proporção de machos e o não aparecimento de animais intersexo, indicaram estabilidade da linhagem Chitralada quanto à termo-sensibilidade;
- Para aplicação comercial, recomendar-se-ia a utilização de matrizes e reprodutores geneticamente selecionados para termo-sensibilidade, como forma de aumentar a eficiência da reversão sexual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v.173, p.219-234, 1999.

ALTENA, A., HÖRST-SCHWARK, G. Effects of rearing temperatures on sex ratios in tilapia, *Oreochromis niloticus* L., investigations on a local population from the lake Victoria in Kenya. In: DEUTSCHER TROPENTAG: Challenges to organic farming and sustainable land use in the tropics and subtropics, Witzenhausen, 2002. **Proceedings...** Witzenhausen: 2002. p.184.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.192, p.187-199, 2001.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptative and evolutionary implications. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.210-223, 2000.

BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern sex-ratios of mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Journal of Experimental Zoology**, v.273, p.216-223, 1995.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, C, v.130, p.399-409, 2001.

BAROILLER, J. F.; GUIGEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular Molecular Life Sciences**, v.55, p.910-931, 1999.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v.197, p.283-301, 2001.

BORGES, A. M. **Piscicultura**. 2.ed. Brasília: EMATER, 2002. 36p.

CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p.249-262, 1996.

D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J. F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.265-276, 2001.

DESPREZ, D.; MÉLARD, C. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v.162, p.1-2, 1998.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v.208, p.191-364, 2002.

DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.381-392, 1996.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: The most important aquaculture species of the 21 st Century. In: SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., Rio de Janeiro, 2000. **Anais...** Rio de Janeiro: 2000. p.3-8.

GUERRERO R. D.; SHELTON W. L. An Aceto-Carmine Squash Method for Sexing Juvenile Fish. **The Progressive Fish-Culturist**, v.36, n.1, p.56, 1974.

KARAYÜCEL, I.; PENMAN, D.; KARAYÜCEL, S.; McANDREW, B. Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, v.55, 2, p.114-122, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285p.

KWON, J. Y.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Treatment with an aromatase inhibitor supresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.625-636, 2002.

LOVSHIN L.L. Tilapia culture in Brazil. In: B.A. COSTA-PIERCE & J.E. RAKOCY(eds.). **Tilapia Aquaculture in the Americas**, v. 2. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. p.133-140.

MACINTOSH, D. J.; LITTLE, D. C. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: N.R. BROMAGE & R. J. ROBERTS (eds.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.277-320.

MÜLLER-BELECKE, A.; LEMMA, M. T.; HÖRST-SCHWARK, G. The effect of fry rearing temperatures on sex ratios in Nile tilapia – interactions between genotype and temperature. In: DEUTSCHER TROPENTAG: Technological and institutional innovations for sustainable rural development, Göttingen, 2003. **Proceedings...** Göttingen, 2003. p.156.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v.138, p.1-22, 1995.

PEIXOTO, M. T. D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J. Evaluation of the production of seed of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in system of hapas. In: WAS: Realizing the potential: responsible aquaculture for a secure future, Salvador, 2003. **Proceedings...** Salvador: The World Aquaculture Society, 2003. p.560.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex Reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J. E. (eds.). **Tilapia Aquaculture in the Americas**, v.2. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. p.34-59.

POPMA, T.J.; GREEN, B. W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds**: Aquaculture Production Manual. Research and Development Series n° 35. Alabama: Auburn University, 1990. 15p.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System. User's Guide**. Version 8.2 (compact disk). Cary, 2001.

TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: FINEP, 1995. 70p.

TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; FOSTIER, A.; ABUCAY, J.; MAIR, G.; BAROILLER, J. F. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.207, p.249-261, 2002.

TUAN, P. A.; MAIR, G. C.; LITTLE, D. C.; BEARDMORE, J. A. Sex determination and the feasibility of genetically male tilapia production in the Thai-Chitralada strain of *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v.173, p.257-269, 1999.

VERA CRUZ, E. M.; MAIR, G.C. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 122, p.237-248, 1994.

VOLPATO, G. L.; FRIOLI, P. M. A.; CARRIERI, M. P. Heterogeneous growth in fish: some data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanisms. **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 13, p.7-22, 1989.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v.286, p.534-537, 2000.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Ciência Rural**, v.32, p.113-139, 2002.

ZIMMERMAN, S.; LITTLE, D. C. Regional and national impacts of the introduction of the Chitralada strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to Brazil. In: WAS: Realizing the potential: responsible aquaculture for a secure future, Salvador, 2003. **Proceedings...** Salvador: The World Aquaculture Society, 2003. p.854.