

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

**INDUÇÃO DA INVERSÃO SEXUAL DA GAROUPA-
VERDADEIRA *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834)
(TELEOSTEI, SERRANIDAE) COM O USO DE
HORMÔNIO MASCULINIZANTE E CRIOCONSERVAÇÃO
DO SÊMEN**

Eduardo Gomes Sanches

Orientadora: Idili da Rocha Oliveira

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

São Paulo
Fevereiro - 2008

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

**INDUÇÃO DA INVERSÃO SEXUAL DA GAROUPA-
VERDADEIRA *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834)
(TELEOSTEI, SERRANIDAE) COM O USO DE
HORMÔNIO MASCULINIZANTE E CRIOCONSERVAÇÃO
DO SÊMEN**

Eduardo Gomes Sanches

Orientadora: Idili da Rocha Oliveira

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

São Paulo

Fevereiro – 2008

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

S211i

Sanches, Eduardo Gomes

Indução da inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae) com o uso de hormônio masculinizante e crioconservação do sêmen / Eduardo Gomes Sanches – São Paulo, 2008.
iv, 64f. ; graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca, Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Agência Paulisa de Tecnologia dos Agronegócios.
Orientadora: Idili da Rocha Oliveira.

1. Teleostei. 2. Serranidae. 3. Reprodução. 4. Crioconservação. 5. *Epinephelus*. I. Oliveira, Idili da Rocha. II. Título.

CDD 639.51

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho de pesquisa envolve a participação de muitas pessoas...

Com este não foi diferente. São muitas pessoas a agradecer, desde a Prof^a Dra. Idili que acreditou no projeto; ao Prof. Pedro que participou nos momentos decisivos; ao PqC. Gastão, que me socorreu com a estatística e o abstract e aos muitos colegas de pesquisa com quem discutia as idéias deste trabalho.

O PqC Roberto, sempre com boas sugestões, a quem devo minha motivação em seguir a carreira de pesquisador e a Dra. Renata que contribuiu muito para o desenvolvimento deste estudo.

Não poderia deixar de agradecer a todos os parceiros do Projeto Serranídeos (Pisceotec, Zahra Adventures, Instituto Aruuda Botelho, Sr. Barroso ...) que apóiam meu trabalho desde 2005. Um agradecimento especial ao Bruno e ao Evandro, em nome de quem agradeço a todos meus estagiários que colaboraram neste estudo.

Um especial obrigado ao Antonio Carlos, parceiro dentro e fora do trabalho, moderador de meus ímpetos e companheiro de jornadas. A lista é grande, talvez falhe na memória, mas sem dúvida caberá para sempre no sucesso desse projeto.

Bem, enfim, mais uma etapa encerrada, graças à base que me foi proporcionada por meus pais, em especial a minha mãe, D^a Luiza.

Meu agradecimento mais especial, a quem dedico esta jornada, à minha esposa Paula, amor de minha vida, dedicada companheira, sabe como ninguém entender minhas motivações e compreender minhas ausências, viagens e correrias do dia a dia. Como não poderia deixar de ser, uma grande “lambida” na fiel escudeira Scully, parceira na bagunça do fim do dia e atenta ouvinte das conversas sobre os serranídeos...

*Paula querida, essa vitória também é sua.
Obrigado por nunca me deixar duvidar!*

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A espécie <i>Epinephelus marginatus</i>	05
1.2 Inversão sexual.....	07
1.3 Crioconservação do sêmen.....	09
1.4 Objetivos.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Caracterização do experimento.....	11
2.2 Inversão sexual.....	11
2.3 Crioconservação do sêmen.....	13
2.3.1 Machos invertidos.....	16
2.3.1.1 Experimento I – Determinação dos fatores do congelamento (diluyente x concentração de crioprotetor x velocidade de congelamento).....	16
2.3.2 Macho do ambiente natural.....	17
2.3.2.1 Experimento II – Determinação do diluyente x diluição.....	17
2.3.2.2 Experimento III – Determinação da concentração de crioprotetor.....	18
2.3.2.3 Experimento IV – Determinação da velocidade de congelamento.....	18
2.4 Análise dos resultados.....	19
3. RESULTADOS.....	20
3.1 Inversão sexual.....	20
3.1.1 Masculinização.....	20
3.1.2 Avaliação das características do sêmen fresco.....	21
3.1.3 Desempenho ponderal.....	22
3.1.4 Variáveis ambientais.....	25
3.2 Crioconservação do sêmen.....	27
3.2.1 Machos invertidos.....	27
3.2.1.1 Experimento I – Determinação dos fatores do congelamento (diluyente x concentração de crioprotetor x velocidade de congelamento).....	27

3.2.2 Macho natural	31
3.2.2.1 Experimento II – Determinação do diluente x diluição	31
3.2.2.2 Experimento III – Determinação da concentração de crioprotetor.....	33
3.2.2.3 Experimento IV – Determinação da velocidade de congelamento	34
4. DISCUSSÃO	36
4.1 Inversão sexual	36
4.1.1 Masculinização	36
4.1.2 Avaliação das características do sêmen fresco	39
4.1.2.1 Volume do sêmen	39
4.1.2.2 Densidade espermática	39
4.1.2.3 Motilidade e tempo de motilidade espermática	40
4.1.3 Desempenho ponderal	41
4.1.4 Variáveis ambientais	45
4.2 Crioconservação do sêmen	46
4.2.1 Machos invertidos	46
4.2.1.1 Experimento I – Determinação dos fatores do congelamento (diluente x concentração de crioprotetor x velocidade de congelamento)	46
4.2.2 Macho do ambiente natural	50
4.2.2.1 Experimento II – Determinação do diluente x diluição	50
4.2.2.2 Experimento III – Determinação da concentração de crioprotetor.....	50
4.2.2.3 Experimento IV – Determinação da velocidade de congelamento	51
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS	53

RESUMO

A garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* é uma espécie hermafrodita protogínica recomendada para piscicultura marinha. O principal obstáculo para o sucesso de sua reprodução em cativeiro é a dificuldade na obtenção de machos funcionais na natureza. Para contornar essa questão, o presente estudo pretendeu avaliar a inversão sexual de fêmeas através de indução hormonal e definir um protocolo de criopreservação do sêmen dos peixes invertidos para manutenção da viabilidade dos gametas por longo período. Paralelamente, compararam-se as características espermáticas do sêmen dos peixes invertidos com o colhido de um exemplar macho capturado na natureza. Para a inversão sexual empregou-se o andrógeno 17 alfa-metiltestosterona, ministrado de duas diferentes formas: via oral e via injetável. Os peixes, em número de vinte e sete, com peso médio de $863,9 \pm 231,2$ g, foram divididos em três tratamentos: T1 = controle (garoupas que não receberam hormônio), T2 = tratamento via oral (garoupas que foram alimentadas com pedaços de peixe através do qual foi administrado o hormônio) e T3 = tratamento via injetável (garoupas que receberam o hormônio através de injeção intramuscular) e mantidos em tanques-rede no mar, em Ubatuba/SP. No T2 a dosagem de andrógeno foi de 1 mg/kg de peso corporal, diariamente, durante 5 dias por semana, e no T3, a dosagem foi de 5 mg/kg de peso corporal, semanalmente, em uma única dose. Após cento e oitenta dias, 100% dos peixes do T2 e 77,8% dos peixes do T3 estavam produzindo sêmen sendo que os peixes do T1 mantiveram-se como fêmeas funcionais. Os efeitos da interação entre três diluentes (pH 6,1, 7,8 e 8,2), diferentes concentrações de crioprotetor dimetilsulfóxido (0 a 12,5%) e diferentes velocidades de congelamento (15 a $110^{\circ}\text{C} \times \text{min}^{-1}$) sobre a motilidade e o tempo de motilidade espermática do sêmen dos peixes induzidos à inversão sexual e do macho capturado na natureza foram analisados em experimentos fatoriais. O sêmen foi congelado, empregando-se palhetas criogênicas, em vapor de nitrogênio e, posteriormente, transferido para nitrogênio líquido. A combinação que resultou em uma maior taxa de motilidade e tempo de motilidade espermáticas ($p < 0,05$) foi proporcionada com o diluente com pH 8,2, concentração do crioprotetor dimetilsulfóxido de 5% e velocidade de congelamento de $60^{\circ}\text{C} \times \text{min}^{-1}$. As semelhanças observadas nas taxas da motilidade e do tempo da motilidade do sêmen das fêmeas sexualmente invertidas e do sêmen do macho do ambiente natural, indicaram que o protocolo de inversão hormonal usado foi bem-sucedido na masculinização das garoupas. Estes resultados tornaram possível a implantação do primeiro banco de sêmen da garoupa-verdadeira no Brasil, reduzindo a necessidade da adoção da inversão sexual rotineira para a reprodução da espécie.

ABSTRACT

The dusky grouper *Epinephelus marginatus* is hermaphrodite protogynic specie recommended for marine culture. The main obstacle for success of reproduction in captivity is the difficulty of obtaining of functional males in the nature. This study aims evaluated the induced hormonal sex inversion of females and developing a protocol of semen cryopreservation of inverted fish for maintenance of gametes viability for long period. Parallel, was compared the spermatoc characteristics of semen of inverted fish with the male captured in the nature. For the sex inversion was used androgenic 17 alpha-methyltestosterone, supplied in two different ways: orally and injectable. A sample, in number of twenty-seven, with average weight of $863,9 \pm 231,2$ g, was divided in three treatments: T1 = controls (groupers that didn't receive hormone), T2 = treatment orally (groupers were fed with pieces of fish by which was administered the hormone) and T3 = treatment injectable (groupers received the hormone by intramuscular injection) and maintained in floating net cages, in Ubatuba, State of São Paulo, Brazil. In T2 the androgenic dosage was 1 mg/kg of body weight, daily, for 5 days in week, and in T3, the dosage was 5 mg/kg of body weight, weekly, in a single dose. After hundred and eighty days, 100% of fish of T2 and 77,8% of fish of T3 were producing semen and fishes of T1 stayed as females. The effects of interaction between three diluents (pH 6,1, 7,8 and 8,2), different concentrations of dimetilsulfoxide (0 a 12,5%) and different freezing speeds (15 a $110^{\circ}\text{C} \times \text{min}^{-1}$) on the sperm motility and time of sperm motility of semen of fish induced sex inversion and captured in the nature were analyzed by means of a factorial experiment. The semen was frozen by using cryogenic slats, in nitrogen steam and transferred, later, to liquid nitrogen. The higher sperm motility rate and time of motility ($p < 0,05$) was achieved by combining diluent C (pH 8,2) with 5 % concentration of cryoprotector (dimetilsulfoxide) and freezing speed of $60^{\circ}\text{C} \times \text{min}^{-1}$ ($p < 0,05$). The similarities observed in the rates of the mobility and time of spermatoc motility of females sex inverted semen and semen of male from the nature, indicated that the used protocol of hormonal inversion was successful in dusky grouper masculinization. These results made possible the implantation of the first semen bank of dusky grouper in Brazil, which reduced the need of routine sex inversions for the reproduction of this specie.

1. INTRODUÇÃO

A pesca marinha nacional enfrenta uma significativa crise devido à situação de sobrepesca imposta à grande maioria dos recursos que sustentam a produção pesqueira (DIAS NETO, 2001). Torna-se clara a necessidade de opções econômicas, ambientalmente sustentáveis, que reduzam a pressão extrativa sobre os estoques naturais de peixes e outros recursos do mar e forneçam alternativas para as comunidades pesqueiras tradicionais. Entre as alternativas disponíveis BRANDINI *et al.* (2000) destacaram a implantação da piscicultura marinha como um meio para geração de empregos e renda, elevar a produtividade das áreas costeiras de forma sustentável, promover a fixação dos produtores em seu local de origem, estimular a cadeia produtiva do pescado, diminuir a pressão extrativista sobre os recursos explorados, aproveitar economicamente áreas sub-aproveitadas e incorporar pescadores a uma atividade planejada. Em diversos países a piscicultura marinha já é uma atividade consolidada, geradora de emprego e renda, praticada por pequenos, médios e grandes produtores.

Os serranídeos (família Serranidae, sub-família Epinephelinae) compreendem 159 espécies distribuídas em 15 gêneros (HEEMSTRA e RANDALL, 1993). Denominados genericamente por meros, chernes, garoupas e badejos, estão entre os peixes marinhos mais cultivados no Sudeste Asiático, devido a seu elevado valor comercial, decorrente da alta demanda de mercado e por apresentarem, geralmente, rápido crescimento, resistência ao manejo e adaptação a sistemas intensivos de criação (CHOU e LEE, 1997).

DAVID-HODGKINS (1993), por sua vez, amplia as qualidades desta família de peixes, ao relatar que as garoupas, em diversas partes do mundo, não só alcançam um elevado preço de mercado, mas são importantes, também, para a pesca esportiva e para o turismo subaquático.

Por apresentarem um período de desova bem definido e a formação de agregações populacionais reprodutivas, os serranídeos são muito susceptíveis à sobrepesca, fato já observado no Sudeste Asiático e no Golfo do México (WHAYLEN *et al.*, 2004). PERERA (2006) demonstrou as conseqüências da sobrepesca nas agregações reprodutivas de *Epinephelus striatus* (garoupa-de-Nassau) resultando na drástica diminuição da população desta espécie, antes destaque na produção pesqueira da região do Caribe. Tais evidências reforçam a importância de se desenvolver estudos para a utilização dos serranídeos na piscicultura marinha.

Por serem animais extremamente adaptáveis a pequenos tanques-rede e aceitarem alimentação baseada em subprodutos da pesca, o cultivo de serranídeos na Ásia vem se tornando uma atividade geradora de emprego e renda para as comunidades litorâneas (LIAO, 1993). Atualmente grande parte das criações nessa região é realizado por pequenos e médios produtores (muitos deles pescadores) em áreas costeiras abrigadas, com o uso de tanques-rede com volume variando entre 8 e 18m³ (APEC/SEAFDEC, 2001).

Segundo MAIN e ROSENFELD (1995), os maiores produtores de serranídeos cultivados são Taiwan, Singapura, Tailândia, Hong Kong, Indonésia, China, Malásia, Vietnã e Filipinas, todos do Sudeste Asiático.

A importância da criação de serranídeos nessa região é tão grande que governos, como o da Tailândia, consideram-na prioridade nacional (POMEROY *et al.*, 2002). Em razão dessa importância, diversos institutos de pesquisa dedicam-se ao desenvolvimento de tecnologias para o crescimento sustentável da atividade. Segundo APEC/SEAFDEC (2001) as principais espécies produzidas são: giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*), black-spotted grouper (*Epinephelus malabaricus*), brown-spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), yellow-spotted grouper (*Epinephelus bleekeri*), white-spotted green grouper (*Epinephelus amblycephalus*), panther grouper (*Cromileptes altivelis*), estuarine grouper (*Epinephelus salmoides*), green grouper (*Epinephelus tauvina*), yellow grouper

(*Epinephelus awaara*), tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) e coral trout (*Plectropomous leopardus*).

A produção de serranídeos no Sudeste Asiático, de 3.000 toneladas/ano em 1992, já supera as 66.000 toneladas/ano (dados de 2005), com tendência de crescimento (FAO, 2006). Em relação ao preço de venda, McGILVRAY e CHAN (2001) apontam o valor de US\$ 70 para o quilo da panther grouper (*Cromileptes altivelis*) comercializada viva em mercados de Hong Kong. Esta espécie também é comercializada no mercado de peixes ornamentais marinhos, alcançando valores unitários de até US\$ 100 para exemplares entre 3 a 5 cm. WILLIAMS *et al.* (2005) confirmando o alto valor de comercialização de garoupas, apontaram os seguintes valores para o quilo do peixe vivo: orange-spotted grouper (*E. coioides*) – US\$ 8 a 11, tiger grouper (*E. fuscoguttatus*) – US\$ 15 a 20, coral trout (*P. leopardus*) – US\$ 30 a 40, yellow grouper (*E. awaara*) – US\$ 30 a 40, panther grouper (*C. altivelis*) – US\$ 80 a 95. No mercado norte-americano, atualmente, os serranídeos congelados estão cotados entre US\$ 5 e 7/kg. Nas Bahamas os exemplares vivos são comercializados entre US\$ 21 e 28/kg (TUCKER, 1999).

BALIAO *et al.* (1998, 2000) afirmaram que os cultivos de garoupas apresentam um alto retorno do investimento e curtos períodos de “payback”, em razão do alto preço de mercado alcançados por esse grupo de peixes. Segundo SIAR *et al.* (2002), o cultivo de serranídeos apresenta taxa interna de retorno (TIR) que varia, em função da flutuação do valor de mercado, de 12 a 356% e o retorno do capital empregado ocorre em menos de 12 meses.

No entanto, apesar dessa atratividade a expansão da criação de serranídeos ainda enfrenta problemas devido à baixa oferta de formas jovens, o que torna a quase totalidade dos cultivos do Sudeste Asiático dependente da coleta de jovens na natureza (SADOVY, 1998).

No Brasil a piscicultura marinha ainda é muito incipiente, embora a atividade venha ganhando impulso nos últimos anos a partir da consolidação dos resultados de pesquisas desenvolvidas por diversas universidades e

instituições de pesquisa e despertando um grande interesse junto à iniciativa privada.

O litoral brasileiro dispõe de vastos recursos para propiciar desta atividade, entretanto, a oferta de formas jovens é o que mais restringe este desenvolvimento (CERQUEIRA, 2005). Corroborando este autor, SANCHES *et al.* (2006), demonstrando a viabilidade econômica do cultivo da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) em tanques-rede, afirmaram que, apesar de o litoral norte paulista e o litoral sul fluminense possuírem características geográficas de recorte em enseadas e com ilhas próximas ao continente, delimitando inúmeros ambientes naturais abrigados, extremamente favoráveis à criação de peixes em tanques-rede, um dos maiores entraves para este desenvolvimento tem sido a obtenção de alevinos de espécies com potencial de produção. COX *et al.* (2006) também afirmaram ser a produção de larvas e formas jovens essencial para o desenvolvimento e a sustentabilidade da piscicultura marinha.

Também no Brasil os serranídeos são muito valorizados e têm elevada demanda, sendo o preço médio praticado na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) de R\$ 15,00/kg. Levantamentos feitos no município de Parati/RJ, com pescadores que capturam serranídeos, apontaram, em vendas diretas a turistas na temporada, valores de até R\$ 25,00/kg. A vantagem comercial fica por conta de que, dada a resistência dos serranídeos, muitas vezes eles chegam vivos ao mercado e acabam sendo preferidos pelos consumidores em detrimento dos demais peixes expostos sobre o gelo (SANCHES *et al.*,2006).

O desenvolvimento da piscicultura de serranídeos no Brasil tem outra implicação interessante: por serem considerados peixes de interesse para a pesca esportiva, com muitos apreciadores, a sua presença em abundância adquire importância estratégica para o turismo nas cidades litorâneas, possibilitando incrementar a atração de turistas-pescadores e a geração de trabalho e renda nesse setor da economia.

1.1 A espécie *Epinephelus marginatus*

Segundo ROCHA e COSTA (1999) o gênero *Epinephelus* apresenta onze espécies com registro de ocorrência para a costa brasileira: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828), *Epinephelus niveatus* (Valenciennes, 1828), *Epinephelus flavolimbatus* (Poey, 1865), *Epinephelus itajara* (Lichtenstein, 1822), *Epinephelus adscensionis* (Osbeck, 1765), *Epinephelus striatus* (Bloch, 1792), *Epinephelus nigritus* (Holbrook, 1855), *Epinephelus mystacinus* (Poey, 1852), *Epinephelus guttatus* (Linnaeus, 1758) e *Epinephelus drummondhayi* (Goode e Bean, 1879). Entre estas, uma das espécies que atinge maior tamanho é a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*, que supera um metro de comprimento e 40 kg de peso (SMITH, 1971). Conhecida em outros países como dusky grouper, é considerada por MACHADO *et al.* (2003) como uma espécie importante do ponto de vista econômico e turístico (grande interesse na pesca esportiva e no mergulho contemplativo) e apontada como uma candidata para a piscicultura marinha (MARINO *et al.*, 2000; SANCHES, 2006).

Reconhecida internacionalmente como um peixe emblemático dos ambientes recifais, no Brasil, este reconhecimento pode ser constatado na nota de R\$ 100,00 (cem reais) que traz estampada a figura de uma garoupa-verdadeira. A importância da garoupa-verdadeira também se mistura com a história do Brasil, conforme relato de BUENO (1999), que entre 1500 e 1550 a pesca a essa espécie, nos baixios da região de Abrolhos, na Bahia, era a principal fonte de renda da Capitania de Porto Seguro. Segundo MARINO *et al.* (2003) desde 1995 a garoupa-verdadeira está inclusa na lista de peixes ameaçados (Berne Convention, Annex 3 – Protocol for Mediterranean Biodiversity). FENNESSY (2006) também afirmou que *E. marginatus* é considerada, nos dias atuais, como uma espécie ameaçada e, por isso, inclusa na lista vermelha da International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN).

De acordo com ROCHA e COSTA (1999) esta espécie foi, durante muito tempo, referida pelo nome *Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758). No entanto, HEEMSTRA e RANDALL (1993) concluíram que este nome não pode ser empregado visto que a descrição original ter se aplicado a um exemplar do gênero *Mycteroperca* coletado na costa venezuelana. Em vista disto, desde 1993, passou a ser adotado o nome *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834).

Com grande ocorrência em áreas rochosas dos litorais Sudeste e Sul do Brasil, poucos estudos foram realizados visando avaliar o potencial de cultivo dessa espécie, entretanto, considerando sua biologia reprodutiva, já existem diversos estudos. As primeiras pesquisas com garoupas foram iniciadas em 1980, pelos pesquisadores Daniel Benetti e Eduardo Fagundes Netto, no Instituto de Pesquisas da Marinha, em Arraial do Cabo/RJ (FAGUNDES NETTO e BENETTI, 1984). Em 1996, foi iniciado o Projeto Garoupa, da Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI/SC, coordenado pelo Dr. Maurício Hostim, que vem desenvolvendo relevantes trabalhos na área de biologia destes peixes.

Como os demais membros da subfamília *Epinephelinae* a garoupa-verdadeira é uma espécie hermafrodita protogínica, ou seja, matura inicialmente como fêmea e em dado momento de seu desenvolvimento sofre uma inversão sexual, tornando-se macho (LIAO, 1993; ZABALA *et al.*, 1997a). ANDRADE *et al.* (2003), estudando a reprodução da espécie, observaram que a primeira maturação sexual ocorre quando o indivíduo atinge cerca de 45 cm e 2kg (idade aproximada de 5 anos). Concluíram, também, que o período de desova tende a se concentrar em torno de dezembro, justamente o período em que afluem mais turistas ao litoral, com conseqüente aumento da demanda por peixes de qualidade para restaurantes e hotéis, o que leva a um inadequado aumento do esforço de pesca sobre a espécie. CHAUVET (1981) afirmou que a inversão sexual da garoupa-verdadeira ocorre a partir dos 16 anos de idade para um comprimento de 83 cm e um peso médio de 10,0 kg. BRUSLÉ (1985) concluiu que garoupas com peso inferior a 3,0 kg ainda são imaturos sendo que fêmeas funcionais ocorrem na faixa de 3,0 a 9,0 kg. Acima de 9,0 kg a proporção de ocorrência de fêmeas diminui e a de machos aumenta. Esse

autor observou que a inversão sexual ocorreria em peixes com 9 a 10 anos de idade e 90 cm de comprimento. As afirmações anteriores foram confirmadas por SPEDICATO *et al.* (1995) que avaliando um lote composto por 138 garoupas com peso entre 0,4 e 23,0 kg observou a ocorrência de machos somente em peixes com peso superior a 13,0 kg.

Em condições naturais, exemplares de *E. marginatus* levam aproximadamente 3,3 anos para atingir 400 g (BRUSLÉ, 1985). Entretanto, sob condições de criação, recebendo alimentação adequada e controlando-se a qualidade da água, estes mesmos peixes podem crescer muito mais rápido. Exemplares de *E. marginatus* com peso inicial de 40 gramas, alimentados com polvos (*Octopus* sp.) e mexilhões (*Perna perna*), atingiram 450 gramas após 15 meses de cultivo, com uma conversão alimentar de 6,5:1,0 (GRACIA LOPEZ e CASTELLO-ORVAY, 2003).

1.2 Inversão sexual

A inversão sexual é reconhecida como uma estratégia reprodutiva de grande sucesso entre os peixes (BARREIROS, 1998) sendo que a presumida vantagem evolucionária desta mudança de sexo está baseada na oportunidade reprodutiva de desovar em grupos (reduzindo a predação dos ovos, incrementando a variabilidade genética e aumentando a taxa de fertilização) e conseguir que os machos tenham sido as fêmeas melhor sucedidas no processo de sobrevivência a diferentes condições (SHAPIRO, 1984). Nestes peixes a mudança de sexo é sócio-demograficamente controlada. A remoção dos machos da população induz a inversão sexual das fêmeas dominantes (SHAPIRO, 1989). BARREIROS (1998) descrevendo o processo de inversão sexual na garoupa-verdadeira afirmou que para que uma fêmea se transforme em macho é necessário que exista uma pressão populacional de indivíduos de pequeno porte que possam induzir a fêmea de maior porte a iniciar o processo de inversão sexual. A ausência de indivíduos jovens pode fazer com que fêmeas nunca iniciem o processo de inversão e apontou como exemplo

algumas regiões do Mar Mediterrâneo onde a espécie não se reproduz, não são observados juvenis e encontram-se fêmeas com peso superior a 20,0 kg, o que em populações não submetidas a uma elevada pressão de pesca corresponderiam a machos.

Então, dada a complexidade do processo de inversão sexual, associada a fatores como a estrutura sócio-demográfica desses peixes na natureza, a obtenção de machos torna-se um problema para a realização da reprodução em cativeiro (TUCKER e FITZGERALD, 1994; SADOVY e COLIN, 1995; BARREIROS, 1998).

A captura de machos, no ambiente natural, é extremamente difícil, por vários fatores: pequena ocorrência (os serranídeos formam haréns, com poucos machos e muitas fêmeas), serem exemplares de grande porte (dificuldades no manejo) e permanecerem em profundidades maiores que 30 metros, tornando a sua captura complexa e com resultados frequentemente negativos em termos de sobrevivência dos indivíduos capturados (GRIER e NEIDING, 2000).

Buscando alternativas para este problema, diversos autores têm demonstrado a viabilidade da inversão sexual de serranídeos em cativeiro, com a utilização de andrógenos (ROBERTS e SCHLIEDER, 1983; KUO *et al.*, 1988; TAN-FERMIN *et al.*, 1994; QUNITIO *et al.*, 1997, 2001). Técnicas de inversão sexual têm sido utilizadas em várias espécies de serranídeos com resultados positivos. As mais empregadas consistem em realizar a inversão sexual baseada na ingestão de alimento tratado com metiltestosterona (PANDIAN e SHEELA, 1995) ou, mais recentemente, a utilização de implantes de metiltestosterona (SARTER *et al.*, 2006) ou de implantes de inibidores de aromatase (ALAM *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2006). Nos peixes tratados, observa-se o aumento da concentração de testosterona no plasma sanguíneo, o desenvolvimento dos testículos e produção de sêmen. Entretanto, seis meses após a interrupção da administração de andrógenos, os peixes retornam a condição de fêmeas (CHAO e CHOW, 1990; MARINO *et al.*, 2000), tornando-

se necessário repetir o processo em cada estação de reprodução, o que é trabalhoso e de custo elevado.

1.3 Crioconservação do sêmen

Desde o êxito alcançado por BLAXTER (1953) na hibridização de duas populações assincrônicas do arenque do Atlântico (*Clupea harengus*), utilizando espermatozóides conservados a -79° C, a importância do resfriamento como um recurso para preservar gametas *ex situ*, notadamente espermatozóides, é reconhecida em mais de 200 espécies de peixes (sendo 40 delas marinhas), contribuindo significativamente para o controle da reprodução na piscicultura moderna (TIERCH, 2000; GWO, 2000).

Ainda que, as técnicas de congelamento não melhorem a qualidade do sêmen (LAHNSTEINER *et al.*, 1992), o que se verifica é que o seu uso tem trazido ganhos indiretos, mormente em relação à identificação das fontes de variabilidade da qualidade dos gametas (HONEYFIELD e KRISE, 2000) e ao alongamento da estação reprodutiva (KNAPP, 2000). Seguindo esse raciocínio, LUBZENS *et al.* (1997) acrescentaram, ainda, outros benefícios principalmente nos estudos de controle da reprodução de espécies hermafroditas protogínicas e de melhoramento genético de reprodutores, por meio das técnicas clássicas de seleção ou por meio da manipulação genética (triploidia, transgenia).

Neste sentido o Instituto de Pesca, vem, desde 1980, desenvolvendo a tecnologia de crioconservação de sêmen para diversas espécies de peixes: pacu, curimatá, truta, tainha e robalo (FOGLI DA SILVEIRA *et al.*, 1984; KAVAMOTO *et al.*, 1986, 1989; SERRALHEIRO *et al.*, 1998).

A técnica da crioconservação é considerada por CLOUD *et al.* (1990) como de especial interesse para espécies ameaçadas de extinção, por possibilitar a preservação da estrutura genética da população, e por GWO (2000) e GRIER e NEIDING (2000) como ferramenta importante para o cultivo

de peixes da família Serranidae, por possibilitar a formação de bancos de sêmen e viabilizar a reprodução em condições de cativeiro.

No entanto, embora possa ser uma interessante estratégia, poucos trabalhos (WITHLER e LIM, 1982; CHAO *et al.*, 1992; GWO, 1993; MIYAKI *et al.*, 2005) tem focado a crioconservação do sêmen de espécies dessa família.

A definição de um protocolo de crioconservação de sêmen de serranídeos possibilitará a criação de um banco de sêmen de diferentes espécies, como recomendado por HARVEY (1998 e 2000) constituindo um importante instrumento tanto para a conservação quanto para a produção comercial destas espécies.

1.4 Objetivos

a) Estabelecer um protocolo de indução hormonal para inversão sexual da garoupa-verdadeira com obtenção de machos viáveis;

b) Estabelecer um protocolo de crioconservação de sêmen da garoupa-verdadeira, a partir de indivíduos invertidos artificialmente;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do experimento

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte – Instituto de Pesca – APTA – SAA, em Ubatuba/SP (23 27'04" S e 45 02'48" W) entre os meses de outubro/2006 a março/2007. Foram obtidas, junto a pescadores locais, 27 fêmeas de garoupa-verdadeira (peso médio de 0,8 kg) que foram mantidas em três tanques-rede de 8,0 m³, confeccionados com panagem de nylon multifilamento com 25 mm de abertura de malha, em densidade de nove peixes/tanque.

Os tanques-rede foram fixados a um sistema de “long line” montado e fixado a 20 metros paralelamente à linha de costa, em águas com profundidade de 4,0 ± 0,5 metros. Diariamente, ao lado dos tanques-rede, foram medidas as variáveis ambientais: *temperatura* (máxima e mínima), com auxílio de um termômetro de mercúrio instalado a 50 cm de profundidade, *salinidade*, por meio de um salinômetro óptico, a *transparência*, com o uso de um disco de Secchi com cabo graduado em centímetros e a *pluviometria*, utilizando-se um pluviômetro. As incrustações biológicas aderidas às panagens dos tanques-rede foram limpas a cada 30 dias, visando manter uma adequada circulação de água no interior dos mesmos.

2.2 Inversão sexual

Os peixes foram divididos em três lotes compondo três tratamentos: T1 = tratamento controle (garoupas que não receberam hormônio), T2 = tratamento via oral (garoupas alimentadas com pedaços de peixe aos quais foi acrescido o hormônio) e T3 = tratamento via injeção (garoupas que receberam o hormônio por meio de injeção intramuscular).

O hormônio andrógênio utilizado foi a 17 alfa-metiltestosterona. No T2 a dosagem de hormônio foi de 1 mg/kg de peso corporal, administrada oralmente, diariamente, durante 5 dias e, no T3, a dosagem foi de 5 mg/kg de peso corporal, em dose única, com as injeções intramusculares intervaladas de sete dias, baseado na metodologia proposta por SPEDICATO *et al.* (1995). No início do experimento, nove exemplares foram sacrificados para confirmação do estágio gonadal.

As garoupas foram alimentadas com peixes da fauna acompanhante da pesca dirigida ao camarão-sete-barbas, obtidos junto a pescadores artesanais. O regime de alimentação (quantidade de alimento a ser fornecida aos peixes) baseou-se na tabela de arraçamento recomendada por SIM *et al.* (2005), sendo que a frequência alimentar empregada foi a mesma descrita por CHUA e TENG (1978). A seguinte rotina foi estabelecida para o trato diário da alimentação: o alimento era descongelado, picado manualmente em pedaços de tamanho que os peixes pudessem ingerir com facilidade e, para os peixes do T2, adicionado o hormônio, previamente encapsulado. A alimentação, fornecida uma vez ao dia, em um único trato, cinco dias por semana, no período matinal, totalizava 1,5% da biomassa contida em cada tanque-rede. A correção na quantidade de alimento foi realizada mensalmente, de acordo com o crescimento da biomassa estocada.

O experimento teve duração de 180 dias, sendo o consumo de alimento e a ocorrência de mortalidade anotados diariamente, para avaliação do desempenho produtivo de todos os tratamentos.

Para identificar o início da produção de sêmen e quantificar o ganho em comprimento e peso dos exemplares, os peixes de todos os tratamentos foram anestesiados com benzocaína (1g/20L de água) e, em seguida, medidos (cm) em ictiômetro e pesados (g) individualmente, em balança eletrônica digital (precisão de 0,01g) no início e a cada trinta dias durante o período experimental. A partir dos valores de comprimento total (cm), peso (g) e ingestão (g/dia) e do registro de ocorrência de mortalidade, foram calculados os seguintes parâmetros de desempenho:

- *Taxa de Crescimento Específico:*

$$\text{TCE comprimento (\%PV/dia)} = 100 \times (\ln cf - \ln ci) / t$$

cf = comprimento médio final; ci = comprimento médio inicial; t = nº de dias do período experimental.

$$\text{TCE peso (\%PV/dia)} = 100 \times (\ln pf - \ln pi) / t$$

pf = peso médio final; pi = peso médio inicial; t = nº de dias do período experimental.

- *Ganho de Comprimento Diário:* $\text{GCD (cm/dia)} = (cf - ci) / t$

- *Ganho de Peso Diário:* $\text{GPD (g/dia)} = (pf - pi) / t$

- *Conversão Alimentar Aparente:* $\text{CAap} = C/\text{GP}$

C = quantidade total de alimento consumida no período; GP = ganho de peso no período experimental.

- *Taxa de Sobrevivência (S, %) = 100 X (Pxf / Pxi).*

Pxf = nº de peixes no final do período experimental; Pxi = nº de peixes no início do período experimental.

O fator de condição (K) foi calculado através da expressão $K = Wt/ Lt^b$, onde Wt corresponde ao peso, Lt ao comprimento total e “b” ao coeficiente angular da relação comprimento-peso ($Wt = aLt^b$).

2.3 Crioconservação do sêmen

Após a conclusão do processo de inversão sexual (determinado pela produção de sêmen dos exemplares), iniciou-se a fase da crioconservação do sêmen. O sêmen fresco foi avaliado em relação ao volume, densidade, motilidade e tempo de motilidade espermáticas. Antes da coleta do sêmen foram anotados os dados de comprimento e peso de cada exemplar. O sêmen foi extraído individualmente de cada exemplar, com o uso de seringas plásticas de 1 mL graduadas (0,01 mL), envoltas em papel opaco (para evitar a incidência de luz sobre as amostras), pressionando levemente a região abdominal do animal compreendida entre as nadadeiras peitoral e caudal, no sentido crânio-caudal.

O emprego das seringas permitiu eliminar a contaminação do sêmen com fezes, sangue e principalmente com urina, uma das principais fontes de redução da qualidade do sêmen (RANA, 1996). Após a anotação do volume do sêmen colhido, o material contido em cada uma das seringas foi transferido para um único frasco plástico opaco graduado (0,01 mL) de 5 mL, mantido imerso em recipiente com água na temperatura de 26° C (mesma temperatura em que eram mantidos os exemplares de *E. marginatus* no laboratório).

A mistura de amostras do sêmen dos exemplares foi feita utilizando-se quantidades iguais, até que os volumes mínimos necessários para cada experimento fossem atingidos. Para manter a estabilidade do sêmen, a partir do momento da colheita até o início dos testes de congelamento, foram seguidas as recomendações de STOSS (1983), com relação à altura do pacote celular de no máximo 0,5 cm.

A densidade espermática foi estimada após a diluição do sêmen em duas etapas, até atingir a diluição final de 1:10⁴. Na primeira etapa uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada a 990 µL de solução de formol salino (5 mL de solução de formaldeído e 95 mL de água marinha a 35‰). Na segunda etapa (momento da realização da contagem), o sêmen foi novamente diluído, utilizando-se a mesma solução e mesmo fator de diluição. A seguir, a contagem foi feita em câmara de Neubauer Improved (1 mm³), sob microscopia óptica de contraste de fase e aumento de 200 vezes.

O número de espermatozóides foi estimado segundo a fórmula:

$$C_e = N \times F_c$$

onde:

C_e: concentração de espermatozóides por mm³

N: número de células contadas

F_c: fator de correção

onde:

$$F_c = (q \times f_d)/d$$

em que:

$q = 5$, razão entre o número total de quadrados da câmara de Neubauer Improved (25) e o número de quadrados em que foram realizadas as contagens (5);

$fd = 10^4$, representa o fator de diluição da alíquota de sêmen;

$d = 0,1$ mm, representa a profundidade da câmara de Neubauer Improved.

A motilidade espermática (porcentagem de células da amostra que apresentam movimento) e o tempo da motilidade espermática (duração do movimento celular, em segundos) foram estimadas logo após o término da coleta de sêmen de cada exemplar. Uma alíquota de 15uL de sêmen fresco foi depositada em lâmina histológica de vidro e, a seguir, misturada com igual volume de água marinha 35‰, 26°C. A homogeneização foi feita com o auxílio de lamínulas. Na estimativa da motilidade, em microscópio óptico com contraste de fase (aumento de 400 x), empregou-se a escala arbitrária, de 0 a 100%, proposta por SALISBURY e VANDEMARK (1964), onde foram considerados todos os espermatozóides que apresentaram movimento em um único campo focal, escolhido aleatoriamente, com a intensidade da luz mantida inalterada. A motilidade espermática foi estimada pelo número de espermatozóides móveis/número total de espermatozóides presentes no campo de microscopia.

O tempo de motilidade espermática foi cronometrado, em segundos, desde o início da homogeneização do sêmen com a água marinha até que todas as células se tornassem imóveis. O tempo de motilidade espermática foi aferido com a mesma amostra preparada para se observar a motilidade espermática.

Somente sêmen com motilidade espermática superior a 90% foi utilizado nos experimentos de congelamento. Para cada tratamento (combinação específica dos fatores: tipo e concentração de diluente, velocidade de congelamento e concentração do crioprotetor) foram congeladas 3 palhetas plásticas seladas com álcool polivinílico (replicatas) em botijão criogênico contendo vapor de nitrogênio (-196°C), seguindo as etapas enumeradas em WAYMAN e TIERSCH (2000). Após 180 dias de congelamento, as palhetas foram descongeladas em água (26°C), durante 2 a 3 minutos, para nova aferição da motilidade e do tempo de motilidade espermáticas. A motilidade e o tempo de

motilidade serviram para avaliar a eficácia do congelamento em função dos fatores envolvidos em cada tratamento testado.

2.3.1 Machos invertidos

Empregando-se o sêmen dos exemplares de garoupa-verdadeira que realizaram a inversão sexual, realizou-se o seguinte experimento:

2.3.1.1 Experimento I – Determinação dos fatores do congelamento (diluente x concentração de crioprotetor x velocidade de congelamento)

Considerando-se que esquemas fatoriais são indicados para representar as possíveis combinações dos tratamentos ou fatores de um tratamento que podem interagir entre si, e que, segundo BABIAK *et al.* (2000), se aplicam aos experimentos de crioconservação, foi desenvolvido um modelo fatorial envolvendo três soluções diluidoras de sêmen (A, B, C), duas concentrações do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO), de 5 e 10% e três velocidades de congelamento (110, 90 e 60°Cxmin⁻¹).

As soluções diluidoras de sêmen com diferentes composições iônicas e pH (Tabela 1) foram baseados na composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos, com valores de pH ajustados para 6,1; 7,8 e 8,2.

Tabela 1. Composição química das soluções diluidoras.

	NaCl (g/L)	KCl (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	MgCl ₂ (g/L)	NaHPO ₄ (g/L)	NaHCO ₃ (g/L)
Diluyente A (pH = 6,1)	7,89	1,19	0,20	0,4266	-	-
Diluyente B (pH = 7,8)	6,5	3,0	0,3	-	0,2	-
Diluyente C (pH = 8,2)	7,89	1,19	0,22	0,72531	0,0805	0,84

O sêmen colhido foi dividido, após a mistura, em volumes iguais, em nove frascos plásticos opacos, para colocação dos respectivos diluentes. Os diluentes, previamente acrescidos do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 5 e 10%, foram adicionados lentamente ao sêmen até completar a proporção de diluição de 1:4 (v/v). O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos e foram testadas três velocidades de congelamento (110, 90 e 60°Cxmin⁻¹).

2.3.2 Macho do ambiente natural

Em razão da fortuita captura de um exemplar macho de *E. marginatus* (112 cm e 32,0 kg) em Cananéia/SP, em dezembro de 2006, e aproveitando-se do fato dele estar produzindo sêmen, buscou-se comparar o sêmen dos exemplares invertidos artificialmente com o sêmen do macho naturalmente invertido, realizando-se os seguintes experimentos:

2.3.2.1 Experimento II – Determinação do diluyente x diluição

Conforme explicado no experimento I e seguindo as recomendações de BABIAK *et al.* (2000) também para este experimento foi desenvolvido um modelo fatorial envolvendo as três soluções diluidoras de sêmen (A, B, C) empregadas no experimento anterior e quatro proporções do volume de diluyente adicionadas ao sêmen 1:0, 1:1, 1:2, 1:3 (v/v). A concentração do crioprotetor dimetilsulfóxido

(DMSO) foi fixada em 10% e a velocidade de congelamento em $60^{\circ}\text{C}\text{xmin}^{-1}$. O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos.

2.3.2.2 Experimento III – Determinação da concentração de crioprotetor

Neste experimento buscou-se testar diferentes concentrações do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO). Foram estabelecidas seis concentrações (zero, 2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0% e 12,5%). Para este experimento foi empregada a solução diluidora C. A proporção de sêmen : diluente foi de 1:3. A velocidade de congelamento foi $90^{\circ}\text{C}\text{xmin}^{-1}$ e o tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi 60 segundos.

2.3.2.3 Experimento IV – Determinação da velocidade de congelamento

Para a definição da velocidade de congelamento mais adequada para a conservação das características do sêmen da garoupa-verdadeira foram testadas velocidades de: 15, 30, 45, 60 e $90^{\circ}\text{C}\text{xmin}^{-1}$. O monitoramento da velocidade foi feito com auxílio de um par-termoelétrico. No sistema criogênico empregado, as velocidades de congelamento foram determinadas previamente para cada espécie, em função do tamanho das palhetas utilizadas para o envasamento do sêmen (WAYMAN e TIERSCH, 2000). As palhetas foram confeccionadas no laboratório, a partir de tubos de plástico criogênico, utilizados rotineiramente na inseminação artificial de bovinos. Os tubos foram cortados em tamanhos adequados para armazenar diferentes volumes de sêmen diluído da garoupa-verdadeira, para que, durante o resfriamento, pudessem refletir as velocidades de congelamento examinadas neste estudo. Cada palheta foi selada em uma das extremidades com álcool polivinílico em pó interposto entre camadas de algodão hidrófilo e hidrófobo. Para este experimento o sêmen foi diluído com a solução diluidora C. A proporção de sêmen : diluente foi de 1:3 e a

concentração de DMSO fixada em 10%. O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos.

2.4 Análise dos Resultados

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o SAS (Statistical Analyses System), o SAS/STAT, versão 6.11 (1990). As médias das diferentes variáveis foram estimadas pelo procedimento Means. A análise de variância foi efetuada pelo procedimento ANOVA (Analysis of Variance). Este procedimento realiza teste de igualdade entre três ou mais médias, permitindo verificar se a variabilidade dentro dos grupos é maior que a existente entre os grupos. A técnica supõe independência e normalidade das observações e igualdade entre a variância dos grupos. A significância das diferenças obtidas entre os tratamentos em cada experimento foram obtidas pelo método ANOVA, usando procedimentos paramétricos, com base no teste de variação múltipla de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3. RESULTADOS

3.1 Inversão sexual

3.1.1 Masculinização

Após 180 dias do início do processo de inversão 100% dos peixes do T-2 e 77,8% dos peixes do T-3 produziram sêmen. Os peixes do T-1 (lote controle) mantiveram-se como fêmeas. A produção total de sêmen, em uma única coleta, dos peixes do T-2, foi de 3,28 mL e a dos peixes do T-3 de 1,41 mL. Os dados de produção de sêmen dos tratamentos T-2 e T-3 foram submetidos ao Teste T, a 5% de probabilidade (ZAR, 1999), que revelou que a produção de sêmen do T-2 foi significativamente superior a do T-3 ($p < 0,05$). A produção média de sêmen dos diferentes tratamentos pode ser vista na Tabela 2.

Tabela 2. Médias e desvios padrão do peso corporal e do volume de sêmen de *Epinephelus marginatus* submetidos ao processo de inversão sexual.

Lote	Peso médio (g)	Produção de sêmen (mL)
T-1 (controle) (n = 9)	1.128,8 ± 189,7	0,0
T-2 (via oral) (n = 9)	1.377,9 ± 357,7	0,36 ± 0,26 * ($p = 0,0032$)
T-3 (via injetável) (n = 9)	1.274,8 ± 279,8	0,20 ± 0,13

Médias seguidas pelo símbolo * na coluna diferem entre si pelo Teste T a 5% de probabilidade.

Não foi observada correlação entre o peso dos exemplares e a produção individual de sêmen. O consumo total por peixe do hormônio 17 alfa-metiltestosterona durante o período experimental foi de 120 mg/kg independentemente da forma de administração.

3.1.2 Avaliação das características do sêmen fresco

Esta avaliação foi realizada comparativamente entre o sêmen fresco dos exemplares de *E. marginatus* invertidos e o do macho do ambiente natural. Os dados obtidos da biometria dos exemplares e das características do sêmen fresco (volume, densidade espermática, motilidade e tempo de motilidade) estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias e desvios padrão de comprimento total (cm), peso total (g), volume de sêmen (mL), densidade (células/mL), motilidade (%) e tempo de motilidade (segundos) espermáticas de *Epinephelus marginatus*.

Macho	Comprimento total (cm)	Peso total (g)	Características espermáticas do sêmen fresco			
			Volume sêmen (mL)	Densidade ($\times 10^9$ células/mL)	Motilidade (%)	Tempo de motilidade (s)
Ambiente	112,0	32.000,0	12,0	2,9	100	3300
T-2*	44,5 \pm 3,7	1.377,9 \pm 357,7	0,36 \pm 0,26	3,1 \pm 0,2	100	3060 \pm 600
T-3**	42,9 \pm 3,0	1.274,8 \pm 279,8	0,20 \pm 0,13	2,9 \pm 0,3	100	3000 \pm 540

* média obtida de nove peixes

** média obtida de sete peixes

3.1.3 Desempenho ponderal

Os resultados de desempenho dos três lotes são caracterizados na Tabela 4 e na Figura 1.

Tabela 4. Médias e desvios padrão de desempenho ponderal de três lotes de *Epinephelus marginatus* durante o período experimental de 180 dias.

Variáveis	T-1	T-2	T-3
Comprimento inicial (cm)	37,2 ± 2,7	36,6 ± 2,7	36,9 ± 3,4
Peso inicial (g)	841,3 ± 191,9	833,1 ± 179,7	810,3 ± 192,2
Biomassa inicial (g)	7.571,6	7.497,7	7.292,6
Sobrevivência (%)	100	100	100
Comprimento final (cm)	41,7 ± 2,7	44,5 ± 3,7	42,9 ± 3,0
Peso final (g)	1.128,8 ± 189,7	1.377,9 ± 357,7	1.274,8 ± 279,8
Biomassa final (g)	10.158,8	12.400,9	11.473,5
TCE comprimento (%PV/dia)	0,06	0,11	0,09
TCE peso(%PV/dia)	0,17	0,28	0,25
GPD (g/dia)	1,60± 0,35	3,03± 1,06	2,58± 0,55
GCD (cm/dia)	0,03± 0,01	0,04± 0,01	0,03± 0,01
CAap	9,12:1,0	5,02:1,0	5,59:1,0

TCE = taxa de crescimento específico; GPD = ganho de peso diário; GCD = ganho de comprimento diário; CAap = conversão alimentar aparente.

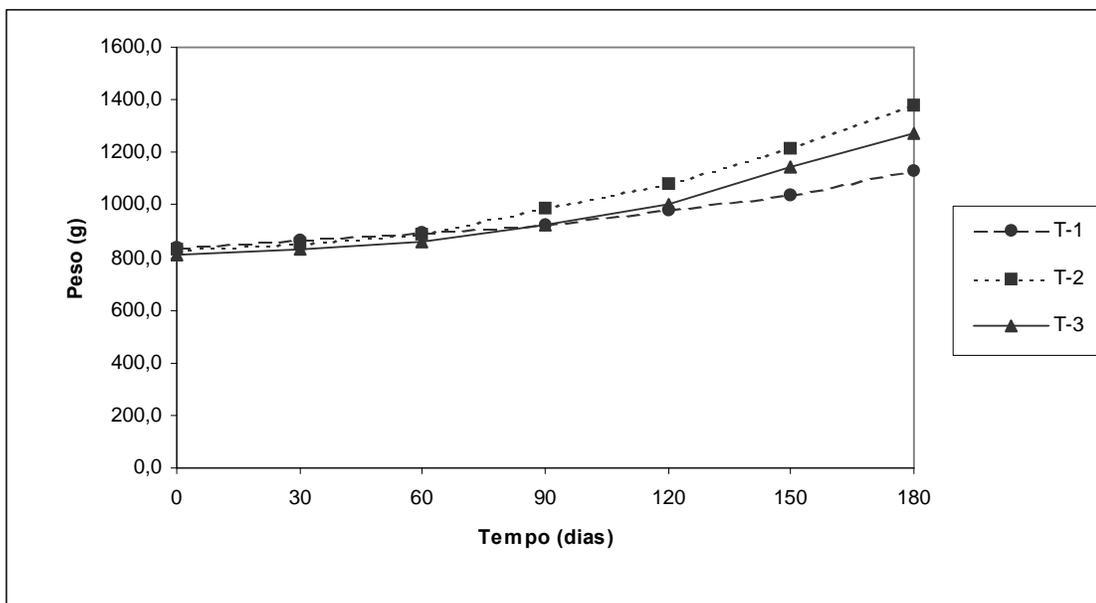


Figura 1. Crescimento de três lotes de *Epinephelus marginatus* durante o período experimental de 180 dias.

Os dados de peso final e ganho de peso diário foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey e os resultados podem ser observados na Tabela 5, demonstrando que T-2 e T-3 não diferem entre si, porém foram significativamente superiores ao T-1.

Tabela 5. Médias e desvios padrão de peso final e ganho de peso diário (GPD) de *E. marginatus* durante o período experimental de 180 dias.

Variáveis	T-1	T-2	T-3
Peso final (g)	1.128,8 ± 189,7 ^b	1.377,9 ± 357,7 ^a	1.274,8 ± 279,8 ^a
GPD (g/dia)	1,60 ± 0,35 ^B	3,03 ± 1,06 ^A	2,58 ± 0,55 ^A

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma linha apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

^{A-B} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma linha apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

O fator de condição dos três lotes é apresentado na Figura 2, mostrando uma clara tendência de queda. As relações comprimento-peso são apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5.

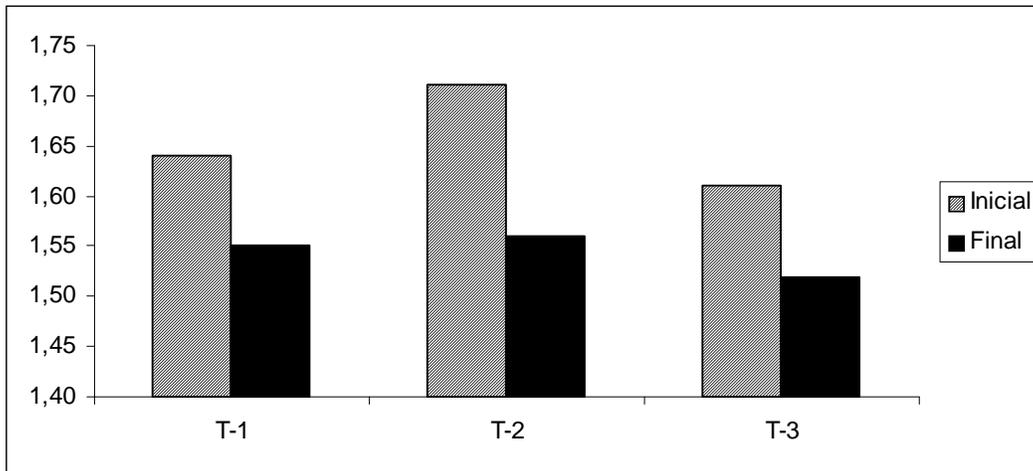


Figura 2. Valores do fator de condição no início e final do período experimental.

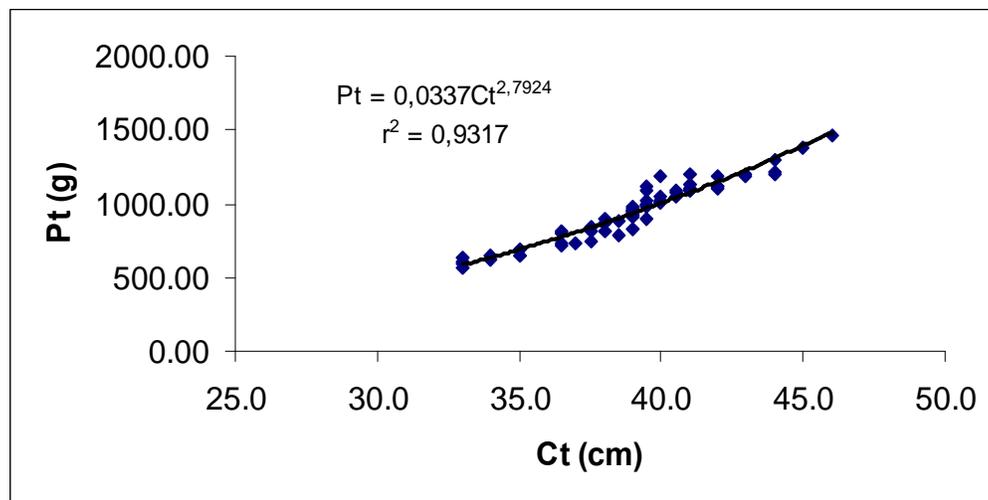


Figura 3. Relação comprimento-peso do T-1 durante o período experimental de 180 dias.

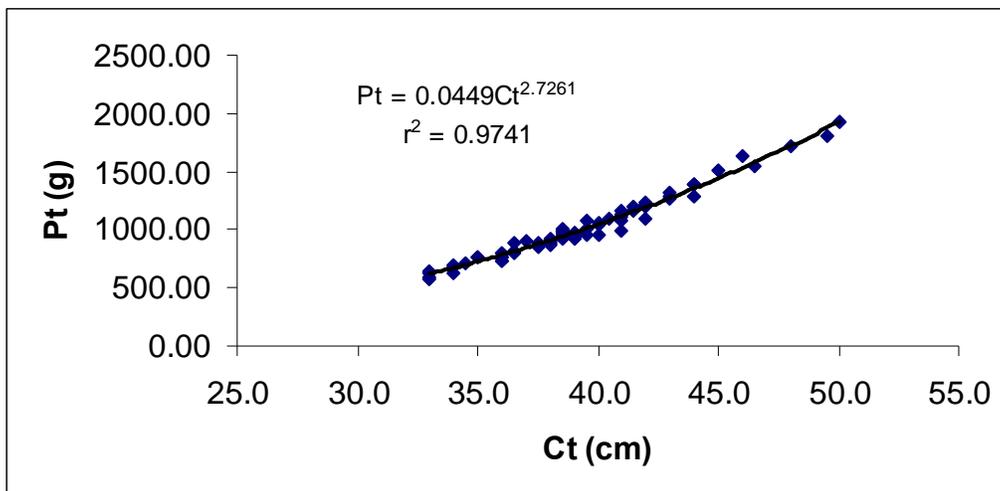


Figura 4. Relação comprimento-peso do T-2 durante o período experimental de 180 dias.

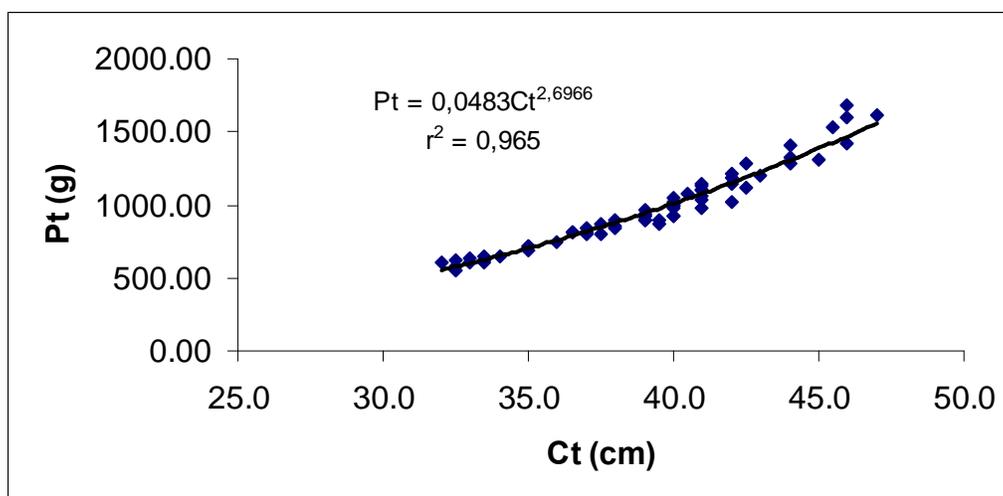


Figura 5. Relação comprimento-peso do T-3 durante o período experimental de 180 dias.

3.1.4 Variáveis ambientais

Na Tabela 6 são apresentados os valores das variáveis ambientais na área onde os tanques-rede estiveram instalados com os lotes experimentais de exemplares de *E. marginatus*.

Tabela 6. Médias, amplitude e coeficiente de variação (CV) das variáveis ambientais da área experimental.

Variável	Média	Amplitude	CV (%)
Temperatura máxima (°C)	26,3	23,0 – 30,0	7,58
Temperatura mínima (°C)	24,3	22,0 – 28,0	6,82
Salinidade (‰)	34,0	21,0 – 36,0	6,74
Transparência (m)	2,2	0,5 – 4,0	40,59
Pluviometria (mm)	30,6	0,0 – 238,7	136,12

Observou-se conforme era esperado uma relação inversa entre a salinidade e a pluviometria (Figura 6).

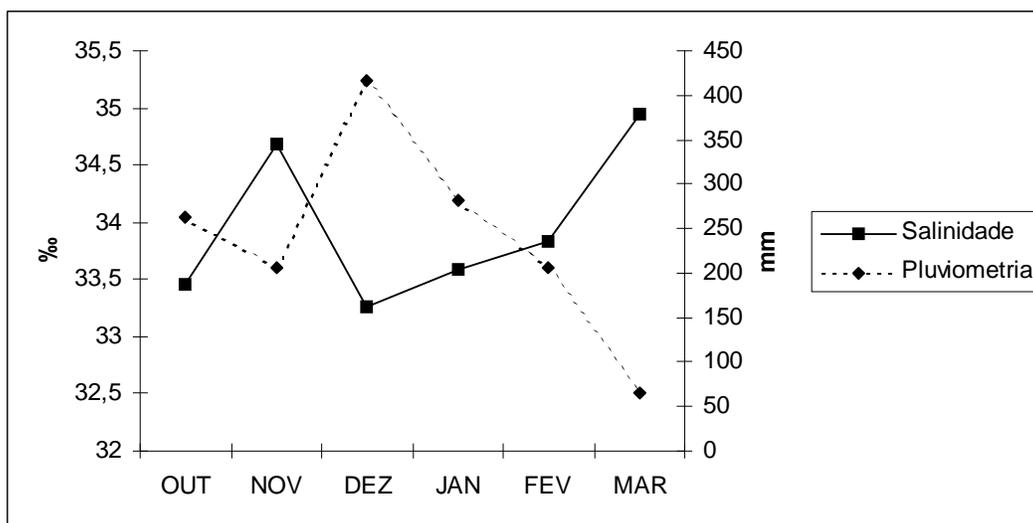


Figura 6. Relação entre salinidade e pluviometria na área experimental.

3.2 Crioconservação do sêmen

3.2.1 Machos invertidos

3.2.1.1 Experimento I – Determinação dos fatores do congelamento (diluyente x concentração de crioprotetor x velocidade de congelamento)

Os valores obtidos para a motilidade do sêmen dos machos invertidos após o processo de crioconservação foram submetidos a ANOVA e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado da aplicação da ANOVA para os valores obtidos para motilidade espermática do sêmen de *Epinephelus marginatus*.

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p
diluyente	2	0,968	0,484	163,31	<0,001
velocidade	2	0,274	0,137	46,31	<0,001
dms0	1	0,645	0,645	217,56	<0,001
diluyente*velocidade	4	0,144	0,036	12,19	<0,001
diluyente*dms0	2	0,091	0,046	15,44	<0,001
velocidade*dms0	2	0,063	0,031	10,56	<0,001
diluyente*velocidade*dms0	4	0,036	0,009	3,06	0,029
Erro	36	0,107	0,003		

A análise mostrou que a motilidade média possui comportamento distinto entre os fatores estudados (interação entre diluyente*velocidade*dms0, $p=0,029$). A seguir foi aplicado o teste de Tukey visando obter a melhor combinação entre os fatores. Os dados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Médias e desvios padrão da motilidade (expressos em porcentagem) do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus* submetidos a diferentes diluentes, velocidades de congelamento e concentrações de DMSO.

Diluyente	Velocidade	DMSO	Média ± dp
A	110°Cxmin ⁻¹	5%	41,7 ± 5,8 ^c
		10%	15,0 ± 0,0 ^d
	90°Cxmin ⁻¹	5%	58,3 ± 5,8 ^b
		10%	28,3 ± 11,5 ^{cd}
	60°Cxmin ⁻¹	5%	68,3 ± 5,8 ^b
		10%	25,0 ± 1,0 ^{cd}
B	110°Cxmin ⁻¹	5%	28,3 ± 5,8 ^{cd}
		10%	15,0 ± 0,0 ^d
	90°Cxmin ⁻¹	5%	28,3 ± 5,8 ^{cd}
		10%	15,0 ± 0,0 ^d
	60°Cxmin ⁻¹	5%	31,7 ± 5,8 ^{cd}
		10%	15,0 ± 0,0 ^d
C	110°Cxmin ⁻¹	5%	38,3 ± 5,8 ^c
		10%	38,3 ± 5,8 ^c
	90°Cxmin ⁻¹	5%	68,3 ± 5,8 ^{ab}
		10%	45,0 ± 0,0 ^c
	60°Cxmin ⁻¹	5%	85,0 ± 0,0 ^a
		10%	55,0 ± 0,0 ^{bc}

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,05).

Estes resultados indicaram que o valor mais elevado para a motilidade média foi obtido empregando-se o diluyente C, concentração de DMSO de 5 % e uma velocidade de congelamento de 60°Cxmin⁻¹.

Os dados de tempo de motilidade do sêmen dos machos invertidos foi submetido a ANOVA e os resultados estão na Tabela 9.

Tabela 9. Resultado da ANOVA para o tempo de motilidade espermática do sêmen de *Epinephelus marginatus*.

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p
diluyente	2	17803099	8901550	43,00	<0,001
velocidade	2	9039572	4519786	21,83	<0,001
dmso	1	29739361	29739361	143,66	<0,001
diluyente*velocidade	4	2263548	565887	2,73	0,044
diluyente*dmso	2	4525907	2262954	10,93	<0,001
velocidade*dmso	2	2590375	1295187	6,26	0,005
diluyente*velocidade*dmso	4	1063191	265798	1,28	0,294
Erro	36	7452369	207010		

Pela Tabela 9, observou-se que a interação entre os três fatores estudados (diluyente, velocidade e dmso), considerando-se o tempo de motilidade espermática, não foi significativo ($p = 0,294$), mas foi estatisticamente significativo entre cada dois fatores ($p < 0,05$). Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da aplicação do teste de Tukey visando obter a melhor combinação entre os fatores.

Tabela 10. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade (segundos) nos diferentes diluentes e velocidades de congelamento do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus*.

	Velocidade de congelamento		
	110°Cxmin ⁻¹	90°Cxmin ⁻¹	60°Cxmin ⁻¹
Diluyente A	1708 ± 875 ^{cd}	2652 ± 962 ^{ab}	2465 ± 1462 ^{bc}
Diluyente B	958 ± 655 ^d	1192 ± 1043 ^d	1820 ± 1668 ^{bcd}
Diluyente C	2077 ± 275 ^{bc}	2551 ± 681 ^{bc}	3459 ± 638 ^a

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os resultados demonstraram que o melhor tempo de motilidade espermática é obtido empregando-se o diluyente C na velocidade de congelamento de 60°Cxmin⁻¹.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da aplicação do teste de Tukey entre os fatores diluentes e a concentração de DMSO, visando a melhor combinação entre os fatores.

Tabela 11. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade (segundos) do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus* em diferentes diluentes e concentrações de DMSO.

	Diluyente A	Diluyente B	Diluyente C
5% DMSO	3165 ± 839 ^a	2322 ± 856 ^{bc}	3033 ± 753 ^a
10 % DMSO	1385 ± 529 ^d	325 ± 93 ^e	2358 ± 713 ^b

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas (p<0,05).

Os resultados demonstraram que o melhor tempo de motilidade espermática foi obtido empregando-se o diluyente A ou o diluyente C com uma concentração de 5 % de DMSO.

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados da aplicação do teste de Tukey entre os fatores velocidade de congelamento e concentração de DMSO, visando definir a melhor combinação entre esses fatores.

Tabela 12. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade (segundos) do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus* em diferentes velocidades de congelamento e diferentes concentrações de DMSO.

	Velocidade de congelamento		
	110°Cxmin ⁻¹	90°Cxmin ⁻¹	60°Cxmin ⁻¹
5 % DMSO	2084 ± 536 ^c	2823 ± 658 ^b	3613 ± 656 ^a
10 % DMSO	1078 ± 653 ^{cd}	1440 ± 1018 ^{cd}	1549 ± 1235 ^c

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas (p<0,05).

Os resultados demonstraram que o melhor tempo de motilidade espermática é obtido empregando-se o crioprotetor DMSO a uma concentração de 5 % e uma velocidade de congelamento de 60°Cxmin⁻¹.

3.2.2 Macho do ambiente natural

3.2.2.1 Experimento II – Determinação do diluente x diluição

Os valores obtidos para a motilidade do sêmen do macho do ambiente natural foram submetidos a ANOVA e os resultados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultado da ANOVA para motilidade espermática do sêmen de *Epinephelus marginatus*.

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p
diluyente	2	0,009	0,004	1,91	0,170
diluição	3	5,140	1,713	747,67	<0,001
diluyente*diluição	6	0,008	0,001	0,58	0,746
Erro	24	0,055	0,002		

Pela Tabela 13, tem-se que o comportamento da motilidade média entre os diluentes nas diferentes diluições não foi significativo ($p = 0,746$), entretanto, considerando-se isoladamente o fator diluição, a motilidade média foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Visando-se comparar a diferença entre as médias, os dados foram submetidos ao teste de Tukey sendo os resultados apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Médias e desvios padrão da motilidade espermática (expressos em porcentagem) do sêmen de *Epinephelus marginatus* submetidos a diferentes diluentes e diferentes diluições.

	Diluições			
	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3
Diluyente A	3,3 ± 2,9 ^b	91,7 ± 5,8 ^a	96,7 ± 2,9 ^a	91,7 ± 5,8 ^a
Diluyente B	3,3 ± 2,9 ^b	88,3 ± 5,8 ^a	88,3 ± 5,8 ^a	88,3 ± 5,8 ^a
Diluyente C	3,3 ± 2,9 ^b	86,7 ± 2,9 ^a	91,7 ± 5,8 ^a	91,7 ± 5,8 ^a

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que a motilidade espermática média do sêmen do macho do ambiente de *E. marginatus* não foi estatisticamente significativa a partir da diluição 1:1 ($p > 0,05$) e que apenas quando não ocorreu diluição (1:0) as motilidades médias são inferiores as demais relações ($p < 0,05$).

Os valores obtidos para o tempo de motilidade espermática do sêmen do macho natural foram submetidos à ANOVA e os resultados estão na Tabela 15.

Tabela 15. Resultado da ANOVA para o tempo de motilidade do sêmen do macho do ambiente natural de *Epinephelus marginatus*.

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p
diluyente	2	390601	195301	1,38	0,270
diluição	3	57061877	19020626	134,75	<0,001
diluyente*diluição	6	4333969	722328	5,12	0,002
Erro	24	3387602	141150		

A Tabela 15 mostrou que o tempo médio de motilidade espermática comportou-se de forma diferente entre os diluentes nas diferentes diluições ($p = 0,002$). Visando-se comparar a diferença entre as médias, os dados foram submetidos ao teste de Tukey e os resultados estão na Tabela 16.

Tabela 16. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade espermática (expressos em segundos) do sêmen de *E. marginatus* submetidos a diferentes diluentes e diferentes diluições.

	Diluições			
	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3
Diluyente A	139 ± 48 ^c	2515 ± 280 ^b	3285 ± 373 ^{ab}	3331 ± 561 ^{ab}
Diluyente B	139 ± 48 ^c	2624 ± 500 ^b	2672 ± 518 ^b	4126 ± 505 ^a
Diluyente C	139 ± 48 ^c	2883 ± 432 ^b	3040 ± 436 ^{ab}	2505 ± 77 ^{ab}

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Pela Tabela 16, pode-se observar que o tempo de motilidade no diluyente B e na relação 1:3 apresentou maior tempo médio de motilidade do que as demais combinações de diluições e diluentes ($p < 0,05$).

3.2.2.2 Experimento III – Determinação da concentração de crioprotetor

A concentração de crioprotetor DMSO de 5,0% apresentou melhor desempenho na crioconservação do sêmen de *E. marginatus*, em termos de motilidade (%) e tempo de motilidade (segundos) espermáticas, com diferenças significativas ($p < 0,05$), em relação às demais concentrações (Tabela 17).

Tabela 17. Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (segundos) do sêmen crioconservado do macho natural de *Epinephelus marginatus* submetido a diferentes concentrações de DMSO.

DMSO (%)	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
0,0	3,3 ± 2,9 ^e	238,3 ± 135,3 ^D
2,5	46,7 ± 2,9 ^c	1463,7 ± 110,3 ^C
5,0	96,7 ± 2,9 ^a	3355,0 ± 141,5 ^A
7,5	78,3 ± 5,8 ^b	2609,0 ± 191,7 ^B
10,0	36,7 ± 2,9 ^{cd}	1533,3 ± 526,0 ^C
12,5	26,7 ± 2,9 ^{cd}	340,0 ± 159,0 ^D

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

^{A-B} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.2.2.3 Experimento IV – Determinação da velocidade de congelamento

Os resultados deste experimento indicaram que as velocidades de congelamento $90^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ e $60^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ apresentaram os melhores desempenhos, de acordo com os valores de motilidade e tempo de motilidade espermáticas, sem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre elas (Tabela 18).

Tabela 18. Médias e desvios padrão da motilidade (%) e do tempo de motilidade (segundos) do sêmen crioconservado de *Epinephelus marginatus* submetido a diferentes velocidades de congelamento.

Volume (mL)	Velocidade (°Cxmin ⁻¹)	Motilidade (%)	Tempo de Motilidade (s)
0,25	90	86,7 ± 5,8 ^a	2850,7 ± 133,4 ^{AB}
0,50	60	91,7 ± 5,8 ^a	3335,0 ± 237,9 ^A
0,75	45	76,7 ± 2,9 ^{ab}	2277,7 ± 197,4 ^{BC}
1,00	30	61,7 ± 15,3 ^b	1899,7 ± 637,8 ^C
1,25	15	78,3 ± 7,6 ^{ab}	2286,7 ± 301,4 ^{BC}

^{a-b} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p< 0,05).

^{A-B} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescrito na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p< 0,05).

4. DISCUSSÃO

4.1 Inversão sexual

4.1.1 Masculinização

CHEN *et al.* (1977) e CHAO e CHOW (1990) reportaram que o hormônio metiltestosterona administrado oralmente pode induzir a transformação de fêmeas maduras ou fêmeas imaturas em machos funcionais sendo que a determinação do estágio do ciclo reprodutivo para a administração de esteróides masculinizantes é de fundamental importância. PANDIAN e SHEELA (1995) afirmaram que o hormônio 17 alfa-metiltestosterona é o andrógeno mais eficaz na indução do processo de masculinização em peixes, embora outros hormônios possam ser utilizados como demonstraram QUINTIO *et al.* (2001) ao empregarem o mibolerone e obterem a inversão sexual de *E. coioides*. Confirmando a literatura, os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram que o hormônio 17 alfa-metiltestosterona foi eficaz na inversão sexual de *E. marginatus*.

CHEN *et al.* (1977) afirmaram que a dose de 1 mg de 17-alfa-metiltestosterona (MT) por quilo de alimento foi eficiente na inversão sexual de *E. tauvina*. A inversão sexual também foi obtida em *E. coioides*, com peso médio de 1,2 kg, após um período de cinco meses, através da administração de injeções intramusculares de 17 alfa-metiltestosterona intervaladas de quinze dias na dosagem de 0,5 a 1,0 mg/kg (TAN-FERMIN *et al.*, 1994). Em ambos os casos, após seis meses do tratamento hormonal ter sido interrompido, os machos sexualmente invertidos retornaram a condição funcional de fêmeas (CHEN *et al.*, 1977; TAN-FERMIN *et al.*, 1994). Resultados promissores de inversão sexual permanente foram obtidos por SARTER *et al.* (2006) empregando implantes de 17 alfa-metiltestosterona em exemplares de *E. marginatus* com peso médio de 131 gramas. Em nosso estudo as dosagens empregadas de 17 alfa-metiltestosterona foram eficientes em obter a masculinização de exemplares *E. marginatus*.

A forma de administração do hormônio masculinizante no processo de inversão sexual foi discutida por PANDIAN e SHEELA (1995) que afirmaram ser a via oral a forma mais eficiente em contraponto à administração via intramuscular, em função do estresse que as repetidas injeções causam aos peixes, aumentando os riscos de injúrias e patologias associadas a lesões causadas durante a aplicação. Confirmando estes autores, MARINO *et al.* (2000) afirmaram que os resultados da inversão sexual via intramuscular podem ser negativos em razão do estresse causado pelos sucessivos manuseios dos exemplares, induzindo a uma baixa resposta ao hormônio. Em nosso estudo as menores porcentagens de peixes invertidos no T3 pode ser creditada a este problema, visto que a produção de sêmen dos peixes deste tratamento foi significativamente inferior ao T2 que recebeu o hormônio via oral.

Por outro lado, alternativas às técnicas de inversão sexual que empregam hormônios, como a que envolve o efeito do controle social, vêm sendo pesquisadas. QUNITIO *et al.* (1997) estudando a aplicação desta técnica estocaram uma fêmea de maior porte junto com diversas fêmeas de menor porte de *E. coioides* em um mesmo tanque-rede e conseguiram que a fêmea de maior porte fosse induzida à inversão sexual, sem o emprego de hormônios. O princípio baseia-se no ciclo biológico da espécie descrito por SHAPIRO (1984) em que a remoção dos machos da população induz à inversão sexual de fêmeas dominantes.

Em relação à porcentagem de sucesso do processo de inversão sexual YEH *et al.* (2003) obtiveram 66,7% de peixes invertidos em um lote de *E. tukula* e 100% em um lote de *E. salmoides*. CHAO e LIM (1991) obtiveram 85% com *E. tauvina*, o mesmo valor obtido por TAN-FERMIN *et al.* (1994) com *E. coioides*. MARINO *et al.* (2000) obtiveram apenas 25% com *E. marginatus* creditando este baixo valor à hierarquia social entre os peixes nos tanques, resultando em baixa ingestão do hormônio por muitos exemplares. Os resultados obtidos em nosso trabalho apontaram resultados de 100% (via oral) e 77,8% (via intramuscular) de inversão sexual de *E. marginatus* traduzindo a eficiência da técnica adotada neste estudo.

Diversos autores afirmam que em peixes do gênero *Epinephelus* pode ser longo o tempo para que o processo de inversão sexual se complete. KUO *et al.* (1988) obtiveram a inversão sexual induzida de *E. fario* após 150 dias, CHAO e CHOW (1990) com *E. tauvina* em 210 dias, TAN-FERMIN *et al.* (1994) com *E. coioides* em 180 dias e HASSIN *et al.* (1997) em 150 dias com *E. aeneus*. Em nosso trabalho o tempo necessário para inversão sexual induzida de *E. marginatus* foi de 180 dias, portanto, dentro do tempo esperado para espécies do gênero *Epinephelus*. Estudos como o de ALAM *et al.* (2006) têm demonstrado a possibilidade de reduzir esse tempo com implantes de inibidores de aromatase. Estes autores obtiveram a inversão sexual de exemplares de *E. merra* em apenas 21 dias, demonstrando o potencial do emprego dessa técnica. LI *et al.* (2006) também empregando inibidores de aromatase, obtiveram a inversão sexual de *E. akaara* em menos de 30 dias, confirmando a eficiência dos inibidores de aromatase na aceleração do processo de inversão sexual em espécies do gênero *Epinephelus*. Este processo é baseado na inibição da atividade da enzima aromatase provocando a redução da produção de estrógenos.

A quantidade de 17 alfa-metiltestosterona necessária para a inversão sexual varia com a espécie estudada e o tempo de emprego do hormônio. CHEN *et al.* (1977) registraram um consumo de 145 mg/kg em *E. tauvina*. KUO *et al.* (1988) precisaram de 160 mg/kg para a masculinização de *E. fario*. GLAMUZINA *et al.* (1998) apontaram um consumo de 120 mg/kg para a masculinização de fêmeas de *E. marginatus*. MARINO *et al.* (2000) utilizaram 85 mg/kg para masculinização de exemplares da mesma espécie em 105 dias. Em nosso estudo o consumo do hormônio 17 alfa-metiltestosterona, por peixe, durante o período experimental, foi de 120 mg/kg independentemente da forma de administração, valor dentro da faixa de variação para o gênero *Epinephelus*.

4.1.2 Avaliação das características do sêmen fresco

Para SALISBURY e VANDEMARK (1964), o estudo do sêmen por meio da determinação do volume coletado, da motilidade e concentração espermática serve de base para a diluição do material fecundante além de possibilitarem a mensuração da capacidade de produção do sêmen de cada reprodutor.

4.1.2.1 Volume do sêmen

O volume de sêmen colhido é muito utilizado como indicador da produção espermática e corresponde entre 20 e 50% do conteúdo total de sêmen retido nos testículos (BILLARD, 1990). Diversos autores, entretanto, afirmam que o volume de sêmen produzido por machos invertidos artificialmente de *Epinephelus* é costumeiramente pequeno (SPEDICATO *et al.*, 1995; KUO *et al.*, 1988; GLAMUZINA *et al.*, 1998).

No procedimento de colheita, a pressão manual do abdômen exercida para a liberação do sêmen pode resultar em quantidades variáveis de urina e fezes, alterando o volume total. A colheita do sêmen de *E. marginatus* diretamente do poro genital com seringas (1 mL/0,01), possibilitou eliminar esse material indesejado. RANA (1996) elucidou que a contaminação do sêmen, principalmente por urina, freqüentemente ignorada, pode significar um aumento de até 80% no volume resultante, refletindo significativamente na qualidade do ejaculado.

4.1.2.2 Densidade espermática

Neste estudo, considerando-se os machos invertidos e o macho do ambiente natural de *E. marginatus*, a densidade espermática variou de 2,9 a $3,1 \times 10^9$ células/mL. Estes valores são ligeiramente inferiores ao reportado para a espécie por SPEDICATO *et al.* (1995), de 4,7 a $8,6 \times 10^9$, embora contrastem com a menor densidade obtida por KUO *et al.* (1988) em *E. fario* de $8,0 \times 10^7$ células/mL. Entretanto todos estes valores podem ser considerados

dentro dos limites da maioria das espécies marinhas compiladas por RANA (1996), de $2,0 \times 10^6$ a $6,5 \times 10^{10}$ células/mL.

4.1.2.3 Motilidade e tempo de motilidade espermática

A motilidade e o tempo de motilidade vêm sendo correlacionadas com a fertilidade do sêmen desde os primórdios das técnicas de fertilização dos peixes (RANA, 1996). Diversos autores destacaram a correlação positiva entre a motilidade espermática e a taxa de fertilização (MOUNIB *et al.*, 1968; HARVEY *et al.*, 1982).

Segundo BILLARD *et al.* (1995) a motilidade é o parâmetro mais comum para avaliar a qualidade do sêmen embora a capacidade de fertilização seja o teste conclusivo sobre essa questão. Estes mesmos autores ressaltaram, entretanto, que a capacidade de fertilização pode ser afetada por fatores independentes da qualidade do sêmen e que interagem no processo, tais como, a qualidade dos ovócitos, o que pode gerar resultados de difícil interpretação. Sobre este assunto GWO (2000) afirmou que em função da dificuldade em se obter ovócitos com boa qualidade aplicando-se técnicas de desova induzida, na grande maioria dos trabalhos publicados sobre criopreservação de sêmen de peixes marinhos, a avaliação da taxa de fertilização não é utilizada, sendo somente a motilidade e o tempo de motilidade espermáticas descritas como indicadoras da qualidade do sêmen.

O sêmen de *E. marginatus* examinado após o processo de criopreservação mostrou uma alta porcentagem de células móveis (85%), indicando que as técnicas empregadas neste estudo foram adequadas na preservação da qualidade espermática. Os valores de motilidade, obtidos neste estudo, foram superiores aos encontrados no sêmen de *Epinephelus malabaricus* por CHAO *et al.* (1992) com valores de 40 a 60%, de *Epinephelus moara* com 42 a 52% (MIYAKI *et al.*, 2005), de *Dicentrarchus labrax* (FAUVEL *et al.*, 1999), de *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004) ambos com taxa de motilidade ao redor de 80%, porém, inferiores ao obtido por RILEY *et al.* (2004) com o *Lutjanus campechanus*, ao redor de 95%.

Os valores médios do tempo de motilidade espermática obtidos para *E. marginatus*, de 3060 ± 600 segundos, foram muito superiores aos obtidos para várias outras espécies de peixes marinhos, ao redor de 500 segundos (BILLARD, 1978), embora valores elevados de tempo de motilidade espermática também tenham sido reportados por CHAO *et al.* (1992) para *E. malabaricus*, superiores a 4500 segundos.

Tempos elevados de motilidade espermática provavelmente devem estar relacionados ao complexo processo reprodutivo dos peixes do gênero *Epinephelus* que formam haréns e intensas agregações reprodutivas descritas por ZABALA (1997b).

4.1.3 Desempenho ponderal

A densidade populacional mantida nos tanques-rede neste estudo (1,1 peixes/m³) esteve bem abaixo da recomendada por APEC/SEAFDEC (2001) que indica densidades de engorda entre 15 a 20 peixes/ m³. Para CHOU e LEE (1997) a densidade ideal na fase de engorda deve ser de 20 peixes/ m³. AHMAD *et al.* (1999), avaliando o desempenho de *Epinephelus coioides* sob diferentes densidades de estocagem (10, 20 e 40 peixes/m³) concluíram que para produzir peixes com peso superior a 800 gramas a densidade de 10 peixes/m³ é a mais recomendada por proporcionar um crescimento mais rápido e melhor conversão alimentar. A baixa densidade adotada em nosso trabalho objetivou um melhor controle sobre os tratamentos alimentares dos peixes, permitindo, conseqüentemente, um melhor controle da ingestão do hormônio.

Neste trabalho foram utilizados tanques-rede de 8 m³ visando-se um sistema prático e funcional para operação em condições adversas de mar. HUGUENIN e ANSUINI (1978) afirmaram que quando o tamanho dos tanques-rede é aumentado, aumentam as dificuldades de manejo e pioram as condições de circulação de água no interior dos mesmos, diminuindo a produtividade do sistema. BEVERIDGE (1996) afirmou que o volume dos

tanques-rede deve estar em sintonia com o sistema de produção, sendo que tanques-rede de menor volume são ideais para sistemas familiares de produção. Concordando com este autor, o presente estudo corroborou esta afirmação, portanto o sistema empregado neste estudo pode ser uma alternativa para possível adoção por pequenos maricultores.

Os serranídeos são conhecidos por apresentarem uma lenta taxa de crescimento em condições naturais. Exemplares de *E. marginatus*, em meio natural, levam 3,3 anos para atingirem 400 gramas (BRUSLÉ, 1985). Segundo SALAZAR e SANCHEZ (1988), a garoupa-de-São-Tomé (*Epinephelus morio*) leva 2 anos para atingir 480 gramas. O badejo de areia (*Mycteroperca microlepis*) atinge 400 gramas, após 1,2 anos, de acordo com MANOOCH e HAIMOVICI (1978). GRACIA LOPEZ e CASTELLO ORVAY (2003) demonstraram que, em condições de criação, a velocidade de crescimento de *Epinephelus guaza* pode ser substancialmente aumentada, obtendo-se peixes com peso médio de 450 gramas após 15 meses. Em razão de uma confusão taxonômica, publicações referentes a *E. guaza* no Mar Mediterrâneo, referem-se, segundo HEEMSTRA e RANDALL (1993), a *E. marginatus*. JAMES *et al.* (1998), estudando o crescimento de duas espécies de garoupas (*Epinephelus fuscoguttatus* e *Epinephelus polyphekadion*) em tanques-rede, obtiveram um peso médio de 578 gramas após sete meses de cultivo para *E. fuscoguttatus* e 513 gramas após doze meses de cultivo para *E. polyphekadion*, concluindo que *E. fuscoguttatus* apresentava melhor aptidão para cultivo comercial. Em relação a ganho de peso, embora não fosse o objetivo deste estudo, foi possível observar que exemplares de *E. marginatus* alcançaram um crescimento expressivo quando comparado com outras espécies de *Epinephelus* (T1 = 287,5 g; T2 = 544,8 g; T3 = 464,5 g) em 180 dias de cultivo.

Segundo CHUA e TENG (1980) hormônios andrógenos, dependendo da dose empregada, podem atuar como promotores do crescimento em peixes do gênero *Epinephelus*, estimulando o apetite, melhorando a eficiência da conversão alimentar, induzindo a retenção de nitrogênio e promovendo o desenvolvimento muscular. Em um caso analisado por estes autores, o emprego do hormônio 17-alfa-metiltestosterona, por cinco meses, em um lote de *E. tauvina*, resultou em um incremento de mais de 43% no peso dos exemplares. Em nosso estudo os dados de peso final e ganho de peso diário foram significativamente superiores ($p < 0,05$) nos lotes submetidos ao hormônio masculinizante (T2 e T3) em comparação ao tratamento controle (T1), comprovando o efeito de promotor de crescimento do hormônio 17-alfa-metiltestosterona.

Avaliando-se a taxa de crescimento específico de *E. itajara*, BOTERO e OSPINA (2003), encontraram valores entre 0,13 (lote alimentado com ração) e 0,96 a 1,40 (lote alimentado com rejeito de pesca). TUCKER (1998) registrou uma TCE de 0,52 para *Epinephelus striatus*, alimentada com rejeito de pesca, destacando o bom potencial desta espécie de serranídeo para a piscicultura marinha. GRACIA LOPEZ e CASTELLO ORVAY (2003) avaliando o crescimento de *E. marginatus* criadas em laboratório e alimentadas com polvos e mexilhões obtiveram uma TCE de 0,78. No presente trabalho obteve-se uma TCE de 0,17 (T1), 0,28 (T2) e 0,25 (T3) o que demonstrou claramente a habilidade em ganho de peso da garoupa-verdadeira quando submetida a uma dieta a base de rejeito de pesca, corroborando com os resultados conhecidos para espécies do gênero *Epinephelus* que apresentam uma boa TCE em diferentes condições de criação. A grande diferença nos valores da TCE entre os exemplares de *E. itajara* e *E. marginatus*, alimentados com rejeito de pesca, bem maiores para *E. itajara*, está relacionada à velocidade de crescimento própria de cada espécie, já que exemplares de *E. itajara* atingem um tamanho máximo muito superior aos exemplares de *E. marginatus* na natureza.

Os serranídeos são predadores de topo de cadeia trófica, alimentando-se quando jovens, basicamente, de crustáceos e pequenos peixes

e, quando adultos, de polvos e peixes maiores, apresentando, assim como outros peixes carnívoros, dificuldade em aceitar ração inerte (GRACIA LOPEZ e CASTELLO ORVAY, 2003). Por essa razão, segundo APEC/SEAFDEC (2001), a grande maioria dos produtores de serranídeos alimenta seus plantéis com rejeito de pesca (pequenos peixes ou formas jovens de peixes rejeitados em operações de pesca de arrasto-de-fundo). Uma das vantagens em utilizar o rejeito de pesca consiste em seu baixo custo e elevada disponibilidade (SIM *et al.*, 2005). Em regiões onde ocorrem desembarques da pesca camaroeira de pequeno porte a obtenção de rejeito de pesca é muito facilitada (SANCHES, 2006). MUSA e NURUNDIN (2005) afirmaram que os produtores de serranídeos em países do Sudeste Asiático acreditam que o rejeito de pesca é o melhor alimento para a engorda de garoupas com base em suas observações de comportamento alimentar e crescimento dos peixes. Avaliando a utilização do rejeito de pesca na alimentação da garoupa-verdadeira, SANCHES *et al.* (2007) afirmaram que esta fonte alimentar proporcionou uma boa conversão alimentar e um adequado ganho de peso na garoupa-verdadeira.

Utilizando-se rejeito de pesca em criações de serranídeos pode-se esperar valores para a conversão alimentar entre 4:1 e 6:1 (LIAO, 1993; CHOU e LEE, 1997). Os resultados da conversão alimentar obtidos neste estudo corroboraram estas informações, porém, o valor de 9,12:1,0 obtido no T1, comparativamente aos demais tratamentos, indicam que, neste lote, a metodologia alimentar adotada não foi adequada, pois parte do alimento ofertado não foi aproveitado pelos peixes, elevando o valor da conversão alimentar.

Considerando-se outras variáveis no desempenho ponderal dos peixes dos diferentes tratamentos experimentais, o fator de condição é freqüentemente utilizado como referência à situação de bem estar dos exemplares. O fator de condição é maior em indivíduos que possuem maiores pesos para um dado comprimento. Já o coeficiente de alometria indica o ponto de inflexão da curva que relaciona comprimento e peso quando se atinge os valores assintóticos para o comprimento, isto é, quando o crescimento em

comprimento passa a apresentar um incremento irrelevante em relação ao incremento em peso (LE CREN, 1951). No presente estudo observou-se que o fator de condição apresentou maiores valores no início dos tratamentos e verificou-se que, após o término do experimento, esses valores diminuíram, provavelmente associados ao ganho de peso dos peixes ou ao estresse do confinamento por se tratar de animais retirados do ambiente natural.

O padrão de variação do fator de condição obtido neste trabalho concorda com os obtidos por ABDULLAH *et al.* (1987) que estudando *Epinephelus tauvina* registraram pequena variação do fator de condição com maior valor no início e menor valor no fim do período de criação. Não obstante BOTERO e OSPINA (2003) também registraram um decréscimo do fator de condição para exemplares de *E. itajara* sob condições de criação em tanques-rede.

Importante registrar que durante o período experimental foi constatado na garoupa-verdadeira o mesmo “comportamento tímido” já descrito para outros peixes do gênero *Epinephelus* por CHUA e TENG (1980), SADOVY e EKLUND (1999) e BOTERO e OSPINA (2003), com os exemplares permanecendo agrupados nas laterais e no fundo dos tanques-rede, implicando em uma subutilização do espaço disponível nos tanques.

4.1.4 Variáveis ambientais

TOOKWINAS (1989) em revisão sobre a situação da criação de garoupas no Sudeste Asiático destacou que os parâmetros ambientais ideais para este cultivo seriam: salinidade entre 20 e 32 ‰, temperatura da água entre 26 e 32° C, amônia inferior a 0,1 mg/L, pH entre 7,5 e 8,3 e teor de oxigênio dissolvido acima de 4 mg/L. Segundo BOONYARATPALIN (1997) as garoupas suportam grandes variações na salinidade e que, por se tratarem de peixes tropicais, a faixa ideal de temperatura da água está compreendida entre 22 e 28° C, sendo que abaixo de 15° C deixam de se alimentar.

Em estudo preliminar, GRACIA LOPEZ e CASTELLO-ORVAY (2003) afirmaram que a espécie *E. marginatus* possui ampla tolerância à flutuação das variáveis ambientais como salinidade e temperatura, não apresentando mortalidade em águas com flutuação de salinidade entre 20 e 35 ‰ e temperatura da água entre 20 e 26° C.

Estudando cultivos de garoupas na Malásia, ARULAMPALAM *et al.* (1998) observaram a mesma relação entre a salinidade e a pluviometria como a observada em nosso estudo. Estes mesmos autores destacaram que as garoupas cultivadas suportavam bem, isto é, sem registro de mortalidade, estas flutuações na salinidade.

Pelo exposto pode-se observar que os valores de salinidade, transparência e de temperatura da água obtidos neste trabalho estiveram dentro dos intervalos ideais para o cultivo de *E. marginatus*.

4.2 Crioconservação do sêmen

4.2.1 Machos invertidos

4.2.1.1 Experimento I – Determinação dos fatores do congelamento (diluyente x concentração de crioprotetor x velocidade de congelamento)

Segundo GWO (2000) quando o sêmen é exposto a temperaturas criogênicas as características seminais são duramente afetadas, e somente podem ser preservadas se, antes do início do congelamento, o sêmen for diluído em soluções adequadas.

De acordo com FOOTE (1975) um diluyente deve apresentar as seguintes funções: prover nutrientes como fonte de energia, proteger as células espermáticas contra as conseqüências prejudiciais do resfriamento rápido, possuir um efeito tampão para prevenir mudanças bruscas no pH resultantes do metabolismo dos espermatozóides, manter a pressão osmótica apropriada, inibir o crescimento bacteriano e aumentar o volume do sêmen de modo que

possa ser utilizado em múltiplas fecundações. LEGENDRE e BILLARD (1980) acrescentam a estas funções uma elevada condutividade térmica e a solubilidade ao crioprotetor.

Muitos diluentes empregados na crioconservação de sêmen de peixes marinhos baseiam-se, na sua composição, no plasma sanguíneo e/ou seminal (RANA, 1996). Não obstante, o plasma seminal obtido por centrifugação não tem se mostrado como um diluente adequado para a crioconservação de sêmen de espécies de água doce (STOSS, 1983). Já em peixes marinhos este plasma tem sido empregado com sucesso (HARA *et al.*, 1982). LAHNSTEINER *et al.* (1997) reportaram uma significativa correlação entre o pH do plasma seminal e a motilidade espermática, sugerindo que o pH pode ser uma importante característica do plasma seminal que influencia a motilidade espermática.

Diversos trabalhos (ODA e MORISAWA, 1993; BILLARD *et al.*, 1993; LAHNSTEINER *et al.*, 1997) têm demonstrado os efeitos de íons notadamente Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , na iniciação e na duração do tempo de motilidade espermática.

As três soluções iônicas empregadas neste estudo foram baseadas na composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos, com valores de pH ajustados para 6,1; 7,8 e 8,2. O melhor desempenho de motilidade e tempo de motilidade espermáticas foram obtidos com o uso do diluente C com pH ajustado em 8,2. Estes resultados concordam com PELETEIRO *et al.* (1996) que ressaltaram que na composição dos diluentes para peixes marinhos, o pH e a capacidade de tamponamento merecem atenção especial. Estes mesmos autores afirmaram que diluentes com pH ajustado entre 7,8 e 8,5 (alcalinos) e adequadamente tamponados com substâncias inorgânicas, como fosfatos e/ou bicarbonatos de sódio e/ou de potássio, têm apresentado melhor desempenho na preservação da viabilidade dos espermatozóides, ao contrário de diluentes sem capacidade de tamponamento e com pH ácido ou próximo ao neutro. Estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus* CHAO *et al.* (1992) obtiveram

sucesso empregando um diluente tamponado para pH 8,0, demonstrando a importância do pH básico para a manutenção das características do sêmen. Segundo GWO (2000) o emprego de diluentes tamponados objetiva impedir que metabólitos produzidos pelos espermatozoides, acumulados no decorrer do processo de congelamento, provoquem mudanças no pH do sêmen, com efeitos deletérios às células espermáticas.

MAZUR (1970) afirmou que os efeitos da variação contínua da osmolaridade, nos meios intra e extracelular, sobre os espermatozoides, dependem da velocidade de resfriamento empregada ao sêmen. Uma velocidade relativamente baixa predisporia as células a uma perda rápida de água, com desidratação e redução do tamanho e posteriormente, do pH. Por outro lado, uma velocidade muito rápida pode não dispor às células o tempo necessário para concluírem o fluxo de água e o equilíbrio dos solutos, favorecendo, ainda, a formação de cristais de gelo no interior das células. Em estudos posteriores, MAZUR (1977), provou que durante o descongelamento, o gelo formado pode se recrystalizar, formando blocos maiores que irão danificar/romper as membranas celulares.

De acordo com SUQUET *et al.* (2000) a velocidade de congelamento em peixes marinhos pode variar de 8 a 99° C x min⁻¹, sendo realizada em duas etapas: a primeira em vapor de nitrogênio e a segunda em nitrogênio líquido. Em nosso estudo, considerando-se a motilidade e o tempo de motilidade espermáticas, a melhor velocidade de congelamento para o sêmen de *E. marginatus* foi de 60° C x min⁻¹. WITHLER e LIM (1982) obtiveram resultados adversos empregando a velocidade de 25° C x min⁻¹ para sêmen de *E. tauvina*. Os resultados obtidos em nosso trabalho concordaram com os obtidos por CHAO *et al.* (1992) que estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus* obtiveram os melhores resultados empregando a velocidade de congelamento de 60° C x min⁻¹ e com os obtidos por MIYAKI *et al.* (2005) que empregou esta mesma velocidade na crioconservação do sêmen de *E. moara*.

Os crioprotetores empregados para o sêmen de peixes marinhos foram revisados por SUQUET *et al.* (2000) e GWO (2000). O dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido considerado de baixa toxicidade e eficiente na ação de proteger os espermatozóides durante o resfriamento, reduzindo a formação de gelo, por meio da diminuição do ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo (PELETEIRO *et al.*, 1996). Segundo CHAO e LIAO (2001) o DMSO é um dos crioprotetores mais amplamente empregado no congelamento de sêmen. Embora de ação não completamente elucidada, sabe-se que o DMSO interage com os fosfolípidos estruturais da membrana da célula espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo de 0° C (THIRUMALA *et al.*, 2006).

Para WAYMAN *et al.* (1997) os melhores resultados no uso de DMSO em sêmen de peixes marinhos têm sido obtidos com concentrações variando de 10 a 20%, embora as mais utilizadas estejam entre 7 e 10% (BILLARD *et al.*, 1995). MONGKONPUNYA *et al.* (1995) afirmaram, porém, que o incremento na concentração do DMSO provoca redução da motilidade espermática e da vitalidade dos espermatozóides. Neste trabalho os melhores resultados foram obtidos empregando-se uma concentração de DMSO de 5% para o sêmen de *E. marginatus* similar a concentração recomendada por LEUNG (1987) para o robalo asiático *Lates calcarifer*. Entretanto, nossos resultados contrastaram com os resultados obtidos por outros autores para espécies do gênero *Epinephelus*. WITHLER e LIM (1982) com sêmen de *E. tauvina* e CHAO *et al.* (1992) estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus* que obtiveram os melhores resultados empregando uma concentração de 10% de DMSO. GWO (1993), por sua vez, empregou uma concentração ainda mais alta, de 20%, alcançando bons resultados na crioconservação do sêmen de *E. malabaricus*. Mais estudos em diferentes espécies de *Epinephelus* são necessários para se obter uma visão mais clara sobre esta questão.

4.2.2 Macho do ambiente natural

4.2.2.1 Experimento II – Determinação do diluente x diluição

A diluição do sêmen antes do congelamento tem sido recomendada em peixes de água doce e marinhos para otimizar a viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento (SCOTT e BAYNES, 1980). A proporção de sêmen:diluente pode variar de 1:1 a 1:20 (PELETEIRO *et al.*, 1996; SUQUET *et al.*, 2000) porém, para a maioria dos estudos conclui por proporções de diluição de 1:3 a 1:6 (MC ANDREW *et al.*, 1993).

DREANNO *et al.* (1997) testaram quatro diluições: 1:1, 1:2, 1:4 e 1:9 no sêmen do linguado *Scophthalmus maximus* não observando diferenças significativas entre elas na motilidade e no tempo de motilidade espermática. WITHLER e LIM (1982) reportaram resultados promissores com o emprego de uma diluição de 1:24 para sêmen de *E. tauvina*, não confirmando o exposto por GWO (2000) de que altas diluições poderiam estar vinculadas a queda na sobrevivência dos espermatozoides, aparentemente pela exaustão das células espermáticas provocada pelo “efeito diluição”. MIYAKI *et al.* (2005) empregaram proporções de 1:2 e 1:4 na crioconservação do sêmen de *E. moara* não obtendo diferenças significativas entre as mesmas. Em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes proporções de diluição empregadas para o sêmen de *E. marginatus*.

4.2.2.2 Experimento III – Determinação da concentração de crioprotetor

Confirmando os resultados obtidos no Experimento I a concentração de crioprotetor (DMSO) em 5,0% apresentou melhor desempenho na crioconservação do sêmen do macho de *E. marginatus* capturado no ambiente natural, em termos de motilidade (%) e tempo de motilidade espermáticas (em segundos), com diferenças significativas ($p < 0,05$), em relação às outras concentrações. Este constatação apontou que concentrações de DMSO superiores a 5% apresentam um efeito de toxicidade para os espermatozoides

de *E. marginatus*, embora efeitos tóxicos do DMSO na crioconservação de sêmen de peixes marinhos somente sejam reportados na literatura em concentrações acima de 10%.

4.2.2.3 Experimento IV – Determinação da velocidade de congelamento

Confirmando os resultados obtidos no Experimento I os resultados deste experimento indicaram que as velocidades de congelamento $90^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ e $60^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$ apresentaram os melhores desempenhos, avaliados com base na motilidade e tempo de motilidade espermáticas, sem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre elas. Porém, pela praticidade e maior capacidade de armazenamento de sêmen das palhetas de 0,50 mL (que proporcionam a velocidade de congelamento de $60^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$) recomenda-se o seu emprego na crioconservação do sêmen de *E. marginatus* em detrimento às palhetas de 0,25 mL (que proporcionam a velocidade de congelamento de $90^{\circ}\text{Cxmin}^{-1}$).

5. CONCLUSÕES

Sobre a inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*:

- A inversão sexual induzida de fêmeas de *Epinephelus marginatus* mais efetiva foi a realizada com o uso do hormônio 17-alfa-metiltestosterona, na dosagem de 1 mg/kg de peso corporal, administrada via oral, junto com o alimento.
- O hormônio 17-alfa-metiltestosterona proporcionou, um paralelo efeito anabolizante, incrementando o ganho de peso dos exemplares com ele tratados.
- Não foram observadas diferenças quantitativas, entre o sêmen dos peixes com inversão sexual induzida e do macho capturado no ambiente natural.

Sobre a crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*:

- O diluente C, com pH de 8,2, foi o que proporcionou o melhor equilíbrio iônico e efeito de tamponamento do pH, quando comparado aos diluentes com pH 6,1 e 7,8.
- A concentração de 5% de DMSO mostrou-se mais eficiente na ação crioprotetora dos espermatozoides.
- A velocidade de congelamento de $60^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, proporcionada com o uso de palhetas de 0,50 mL, foi a mais adequada para controlar a formação de gelo e conseqüentemente as crioinjúrias.

6. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.S.; WUAN, T.O.; KAWAHARA, S. 1987 Preliminary studies in stocking density and production of hamoor *Epinephelus tauvina* in PVC-lined raceways. *Journal World of Aquaculture Society*, 18 (4): 126-132.
- AHMAD, T.A.; EL-ZAHAR, C.; WUAN, T.O. 1999 Nursing and production of the grouper *Epinephelus coioides* at different stocking densities in tanks and sea cages. *Asian Fisheries Society*, 12 (2): 154-161.
- ALAM, M.A.; BHANDARI, R.K.; KOBAYASHI, Y.; SOYANO, K.; NAKAMURA, M. 2006 Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture*, 255: 532-535.
- ANDRADE, A.B.; MACHADO, L.F.; HOSTIM-SILVA, M.; BARREIROS, J.P. 2003 Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Arch.Biol. Tech.*, 46 (3): 373-381.
- APEC/SEAFDEC 2001 *Husbandry and health management of grouper*. APEC, Singapore and SEAFDEC, Iloilo, Philippines. 94 p.
- ARULAMPALAM, P.; YUSOFF, F.M.; SHARIFF, M.; LAW, A.T.; SRINIVASA RAO, P.S. 1998 Water quality and bacterial populations in a tropical marine cage culture farm. *Aquaculture Research*, 29: 617-624.
- BABIÁK, I.; BRZUSKA, E.; PERKOWSKI, J. 2000 Fractional factorial design of screening experiments on cryopreservation of fish sperm. *Aquaculture Research*, 31(1) 273-282.
- BALIAO, D. D.; DE LOS SANTOS, M.; RODRÍGUEZ, E. M.; TICAR, R. B. 1998 *Grouper culture in brackishwater ponds*. Aquaculture Extension Manual nº 24, SEAFDEC Aquaculture Department Iloilo, Philippines, 17p.
- BALIAO, D.D.; DE LOS SANTOS, M. A.; FRANCO, M. N.; JAMOM, N. R. S. 2000 *Grouper culture in floating net cages*. Aquaculture Extension Manual nº 29. SEAFDEC – Aquaculture Department, Tigbauan, Iloilo, Philippines, 10p.
- BARREIROS, J. P. 1998 Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 5 (1): 81-90.
- BEVERIDGE, M.C.M. 1996 *Cage aquaculture*. Fishing News Books. Oxford. 346 p.
- BILLARD, R., 1978 Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. Actes de colloques du CNEXO, 8: 59-73.
- BILLARD, R. 1990 Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol. 2, *Reproduction in the male*. Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland. p. 870-888.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. 1993 Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6:67-75.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. 1995 Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129(1): 95-112.
- BLAXTER, J.H.S. 1953 Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 1189-1190.
- BOONYARATPALIN, M. 1997 Nutrient requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia. *Aquaculture*, 151 (1): 283-313.

- BOTERO, J. Y. e OSPINA, J. F. 2003 Crecimiento y desempeño general de juveniles silvestres de mero guasa *Epinephelus itajara* (Liechtenstein) mantenidos en jaulas flotantes bajo diferentes condiciones de cultivo. *Bol. Invest. Mar. Cost. Santa Marta*, Colômbia, 32: 25-36.
- BRANDINI, F. P.; SILVA, A. S.; PROENÇA, L. A. O. 2000 Oceanografia e Maricultura. In: VALENTI, W.C. (ed.) 2000 *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq. Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 73-106.
- BRUSLÉ, J. 1985 Esposé synoptique des données biologiques sur les mérours *Epinephelus aeneus* (Geoffroy Saint Hilaire, 1809) et *Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758) de L'Océan Atlantic et de la Méditerranée, FAO Synop. Pêches, 129: 64.
- BUENO, E. 1999 *Capitães do Brasil: a saga dos primeiros colonizadores*. Coleção Terra Brasilis. 3. Editora Objetiva. Rio de Janeiro. 287 p.
- CERQUEIRA, V.R. 2005 Cultivo de peixes marinhos. In: BALDISSEROTO, B. e GOMES, L.L. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Editora UFSM. Santa Maria/RS. p. 369-406.
- CHAO, T. e CHOW, M. 1990 Effect of methyl testosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Singapore Journal of Primary Industries*, 18: 1-14.
- CHAO, T.M. e LIM, L.C. 1991. Recent development in the breeding of grouper (*Epinephelus* app.), *Singapore Journal of Primary Industries*, 4: 78-93.
- CHAO, N.H.; TSAI, H.P.; LIAO, I.C. 1992 Short and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fisheries Science*, 5:103-116.
- CHAO, N.H. e LIAO, I.C. 2001 Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197(1): 161-189.
- CHAUVET, C. 1981 Calcul par otolimetrie de la relation long t – age d *Epinephelus guaza* (L. 1758) de la Cote Nord de la Tunisie. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* 27: 103-106.
- CHEN, F.Y.; CHOW, M.; CHAO, T.M.; LIM, L.C. 1977 Artificial spawning and larval rearing of the grouper *Epinephelus tauvina* (Forsskal) in Singapore. *Singapore Journal of Primary Industries*, 5(1): 1-21.
- CHOU, R.; LEE, H.B. 1997 Commercial marine fish farming in Singapore. *Aquaculture Research*, 28: 767-776.
- CHUA, T. E. e TENG, S. K. 1978 Effects of feeding frequency on the growth of young estuary grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.), cultured in floating net cages. *Aquaculture*, 14: 31-47.
- CHUA, T. E. e TENG, S. K. 1980 Economic production of estuary grouper *Epinephelus salmoides* Maxwell, reared in floating net cages. *Aquaculture*, 20: 187-228.
- CLOUD, J.G.; MILLER, W.H.; LEVANDUSKI, M.J. 1990 Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plan and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *Progressive Fish Culturist*, 52: 51-53.
- COX, E.; FRY, P.; JOHNSTON, A. 2006 Mesocosm technology advances grouper culture in northern Australia. *Aquaculture Asia Magazine*, Jan-Mar, p. 34-36.

- DAVID-HODGKINS, M. 1993 Nassau grouper culture in the Caribbean. *Caribbean Aquaculture Assoc.* 8 (3): 9-11.
- DIAS NETO, J. 2001 *Gestão do uso dos recursos pesqueiros marinhos no Brasil*. Brasília, 164p. (Dissertação de Mestrado - Centro de Desenvolvimento Sustentável da Universidade de Brasília - Mestrado em Desenvolvimento Sustentável. Área de concentração: Política e Gestão Ambiental).
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; QUEMENER, L.; COSSON, J.; FIERVILLE, F.; NORMANT, Y.; BILLARD, R., 1997 Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 48: 589-603.
- FAGUNDES NETTO, E.B. e BENETTI, D.D. 1984 Noções sobre o crescimento e perspectivas de cultivo da garoupa-verdadeira (*Epinephelus guaza*) Linnaeus, 1758) Pisces, Serranidae. In: SIMPÓSIO BRAS. AQUICUL. 3., São Carlos, DATA. *Anais...* p.453
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006 Yearbook of Fishery Statistics: Summary Tables. FAO, Rome. Disponível em <http://www.fao.org> . Acesso em: 25 set. 2007.
- FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C.; COSSON, J.; SUQUET, M., 1999 Characteristics of sperm of captive sea bass, *Dicentrarchus labrax* in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, 54: 356-369.
- FENNESSY, S.T. 2006 Reproductive biology and growth of the yellowbelly rockcod *Epinephelus marginatus* (Serranidae) from South-East Africa. *África Journal of Marine Science*, 28 (1): 1-11.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G.; PENTEADO, L.A.; CARVALHO FILHO, A. C. 1984 Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 11: 131-136.
- FOOTE, R.H. 1975 Semen quality from the bull to the freezer. *Theriogenology*, 3: 219.
- GLAMUZINA, B., SKARAMUCA, B., GLAVIC N.; KOZUL, V. 1998 Preliminary studies on reproduction and early life stages in rearing trial with dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquaculture*, 29 (10): 769.
- GRACIA LOPEZ, V.; CASTELLO-ORVAY, F. 2003 Preliminary data on the culture of juveniles of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Hidrobiologica*, 13 (4): 321-327.
- GRIER, H. e NEIDING, C. 2000 Gonads and gametes of fishes. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society. p. 1-12.
- GWO, J.C. 1993 Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39: 1331-1342.
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society. p. 138-160.
- HARA, S.; CANTO, J.T.; ALMENDRAS, J.M.E. 1982 A comparative study of various extender for milkfish *Chanos chanos* Forsskal sperm preservation. *Aquaculture*, 28: 339-346.

- HARVEY, B., 1982 Cryobiology and the storage of teleost gametes. In: GOOS H.J.T. and RICHTER. J.J. (ed.) *Proceeding of the International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Wageningen, Netherlands. pp 123-127.
- HARVEY, B. 1998 An overview of action before extinction. In: HARVEY, B.; ROSS, C.; GREER, D. *Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity*. Vancouver: World Fisheries Trust. p. 1-18.
- HARVEY, B. 2000 The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 332-337.
- HASSIN, S., MONBRISON, D.; YANIN, Y., ELIZUR, A., ZOHAR, Y.; POPPER, D.M. 1997 Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* L. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156: 305-316.
- HEEMSTRA, P.C. e RANDALL, J.E. 1993 FAO species catalogue. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). *FAO, Rome*. 16: 382.
- HONEYFIELD, D.C. e KRISE, W.F. 2000. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. (editors). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. USA: 49-58.
- HUGUENIN, J.E. e ANSUINI, F.J. 1978 A review of technology and economics of marine fish cage systems. *Aquaculture*, 15: 151-170.
- JAMES, C.M.; AL-THOBAITI, S.A.; RASEM B.M.; CARLOS, M.H. 1998 Comparative growth of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal) and camouflage grouper *E. polyphemadion* (Bleeker) under hatchery and growout culture conditions. *Asian Fisheries Society*, 11 (2) 78-86.
- KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. 1986 Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13 (2): 45-50.
- KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. 1989 Fertilização em *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881, com sêmen crioconservado em nitrogênio líquido. *Boletim do Instituto de Pesca*, 16 (1): 29-36.
- KNAPP, W.E. 2000 Foreword. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. USA: xvii.
- KUO, C.M.; TING, Y.Y.; YEH, S.L. 1988 Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74: 113-126.
- LAHNSTEINER, F. WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. 1992 Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*, 103, 73-84.

- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. 1997 Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research* 28: 471-479.
- LE CREN, E. D. 1951 The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad and conditions in the perch *Perca fluviatilis*. *J. Anim. Ecol.*, 20 (2): 201-219.
- LEGENBRE, M. e BILLARD, R., 1980 Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reproduction, Nutrition, and Development*, 20: 1859-1868.
- LEUNG, L.K. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture* 64: 243-247
- LI, G.L.; LIU, X.C.; ZHANG, Y.; LIN, H.R. 2006 Gonadal development, aromatase activity and p450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Terminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole. *Aquaculture Research*, 37 (5): 484-491.
- LIAO, I. C. 1993 Finfish hatcheries in Taiwan. In: LEE, C. S.; SU, M. S. e LIAO, I. C. *Finfish hatchery in Asia: proceedings of finfish hatchery in Asia 91*. Tungkang Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, p 1-25.
- LUBZENS, E.; DAUBE, N.; PEKARSDY, I.; MAGNUS, Y. COHEN, A. YUSEFOVICH, F.; FEIGIN, P. 1997 Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks: Strategies in research and application. *Aquaculture*, 155: 13-30.
- MACHADO, L.F.; ANDRADE, A.B.; HOSTIM – SILVA, M.; BARREIROS, J.P. 2003 Habitat use by the juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* and relative abundance, in Santa Catarina, Brazil. *Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 6 (4): 133-138.
- MAIN, K. L. e ROSENFELD, C. 1995 *Culture of high-value marine fishes. Proceedings of a workshop in Honolulu, Hawaii*. The Oceanic Institute. 55p.
- MANOOCH, CH. S. e HAIMOVICI, M. 1978 Age and growth of the gag, *Mycteroperca microlepis*, and size-age composition of the recreational catch of the southeastern United States. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107 (2): 234-240.
- MARINO, G.; AZZURRO, E.; FINOIA, M.G.; MESSINA, M.T.; MASSARI, A.; MANDICH, A. 2000 Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterranennes. CIHEAM*, 47:215-226.
- MARINO, G.; PANINI, E.; LONGOBARDI, A.; MANDICH, A.; FINOIA, M.G.; ZOHAR, Y.; MYLONAS, C.C. 2003 Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH α implant. *Aquaculture*, 219: 841-858.
- MAZUR, P. 1970 The freezing of biological systems. *Science Cryobiology*. 168: 939-949.
- MAZUR, P. 1977 The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 14: 251-272.

- MC ANDREW, B.J.; RANA, K.J.; PENMAN, D.J. 1993 Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: MUIR, J.F. and ROBERTS, R.J. *Recent Advances in Aquaculture*, vol. IV, Oxford, Blackwell, p. 295-336.
- MCGILVRAY, F. e CHAN, T. T. C. 2001 *The trade in live reef food fish: A Hong Kong Perspective*, International Marine Life Alliance, Hong Kong. 21p.
- MIYAKI, K.; NAKANO, S.; OHTA, H.; KUROKURA, H. 2005 Cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*) sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Science*, 71: 457-458.
- MONGKONPUNYA, K., CHAIRAK, N., PUPIPAT, T.; TIERSCH, T.R., 1995 Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish. *Asian Fisheries Science*, 3: 211-221.
- MOUNIB, M.S.; HWANG, P.C.; IDLER, D.R. 1968 Cryogenic preservation of Atlantic cod *Gadus morhua* sperm. *Journal of the Fisheries, Canada*, 25: 2623-2632.
- MUSA, C.U.C. e NURUNDIN, A.A. 2005 *Trash fish production and national fish feed requirement in Malaysia*. Regional Workshop on low value and trash fish in the Asia-Pacific region. Honei, Vietnã, 16p.
- ODA, A. e MORISAWA, M. 1993 Rises of intracellular Ca and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskeleton*, 25: 171-178.
- PANDIAN, T. J. e SHEELA, S.G. 1995 Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138: 1-22.
- PELETEIRO, J.B.; CHEREGUINI, O.; CAL, R.M. 1996 Preliminary results of artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). *Informe Técnico Del Instituto Espanological de Oceanografo*, 162: 1-13.
- PERERA, A.A. 2006 Disappearance of a Nassau grouper spawning aggregation of the southern Mexican Caribbean coast. *Marine Ecology Progress Series*, 327: 289-296.
- POMEROY, R.; AGBAYANI, R.; TOLEDO, J.; SUGAMA, K. 2002 The status of grouper culture in southeast Asia. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin*, 42 (10): 22-26.
- QUINITIO, G.F.; CABEROY, N.D.; REYES JR, D.M. 1997 Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. *Isr. J. Aquac.*, 49: 77-83.
- QUINITIO, G.F.; TAN-FERMIN, J.D. 2001 Possible application of mibolerone for induced sex inversion of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish. Sci.*, 67: 232-237.
- RANA, K.J. 1996 Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R. e ROBERTS, R.J. *Broodstock Management and egg and Larval Quality*. Oxford, Blackwell Science, p. 53-75.
- RILEY, K., I., HOLLADAY, C. G., CHESNEY, E.J. and TIERSCH, T. R. 2004 Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, 238 (1): 183-194.
- ROBERTS, D. E. JR. e SCHLIEDER, R. A. 1983 Induced sex inversion, maturation, spawning and embryogeny of the protogynous grouper, *Mycteroperca microlepis*. *J. World Maricul. Soc.* 14: 639-649.

- ROCHA, L.O.F. e COSTA, P.A.S. 1999. *Manual de identificação de peixes marinhos para a costa central*. REVIZEE. UNE-RIO. Rio de Janeiro. 230p.
- SADOVY, Y. e COLIN, P.L. 1995 Sexual development and sexuality in the Nassau grouper. *J. Fish Biol.*, 46: 961-976.
- SADOVY, Y. 1998 Wild collection of juveniles for grouper mariculture: just another capture fishery? *SPC Live Reef Fish Information Bulletin*, 4:36-39.
- SADOVY, Y. e EKLUND, A.M.; 1999 *Synopsis of biological data on the Nassau grouper, Epinephelus striatus (Bloch, 1792) and the jewfish, E. itajara (Lichtenstein, 1822)*. NOAA Technical Report NMFS 146, FAO fis. Synop. 157, 65p.
- SALAZAR, A. e SANCHEZ, J. 1988 Aspectos biológico pesqueros del mero *Epinephelus morio* de la flota artesanal de las costas de Yucatán, México. Proceedings of the 41st Gulf and Caribbean Fisheries Institute, p. 422-430.
- SALISBURY, G.W. e VANDEMARK, N.L. 1964 *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos*. Zaragoza. ACRIBIA. 707 p.
- SANCHES, E.G.; HENRIQUES, M.B.; FAGUNDES, L. 2006 Viabilidade econômica do cultivo da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) em tanques-rede, região Sudeste do Brasil. *Informações Econômicas*, SP, 36 (8): 15-25.
- SANCHES, E.G. 2006 Boas perspectivas para o cultivo de meros, garoupas e badejos no Brasil. *Panorama da Aqüicultura*, 16 (93): 44-51.
- SANCHES, E.G.; AZEVEDO, V.G.; COSTA, M.R. 2007 Criação da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae) alimentada com rejeito de pesca e ração úmida em tanques-rede. *Atlântica*, 29(2): 123-128.
- SARTER, K.; PAPADAKI, M.; ZANUY, S.; MYLONAS, C.C. 2006 Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256: 443-456.
- SERRALHEIRO, P.C.S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M.; OLIVEIRA, I.R.; PIMENTEL, C.M.M. 1998. Fertilização em robalo *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) com sêmen crioconservado. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE AQUICULTURA (Aqüicultura Brasil 98), 1, Recife 1998. *Anais*, p. 290.
- SCOTT, A.P. e BAYNES, S.M. 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 17: 707-739.
- SHAPIRO, D. 1984 Sex reversal and sociodemographic processes in coral reef fishes. In: POTTS, G. W. e WOOTTON, R. J. *Fish Reproduction: strategies and tactics*. London: Academic Press. 280p.
- SHAPIRO, D. 1989 Sex change as an alternative life-history style. In: BURTON, M.N. (ed.) *Alternative Life-History Styles of Animals*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 320p.

- SIAR, S. V.; JOHNSTON, W. L.; SIM, S. Y. 2002 *Study on economics and socio-economics of small-scale marine fish hatcheries and nurseries, with special reference to grouper systems in Bali, Indonesia*. Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific, Bangkok, 36pp.
- SIM, S.Y.; RIMMER, M.; WILLIAMS, K.; TOLEDO, J.D.; SUGAMA, K.; RUMEGAN, I., WILLIAMS, K.C., PHILLIPS, M.J. 2005 *A practical guide to feeds and feed management for cultured groupers*. NACA, Bangkok, Thailand. 18 p.
- SMITH, C.L. 1971 A revision of the American groupers: *Epinephelus* and allied genera. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 146: 1-241.
- SPEDICATO, M.T.; LEMBO, G.; DI MARCO, P.; MARINO, G. 1995 Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Options Méditerran.*, 16: 131-148.
- STOSS, J. 1983 Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., DONALDSON, E.M. *Fish Physiology*. New York: Academic Press, pp. 305-350.
- SUQUET, M., DREANNO, C., FAUVEL, C., COSSON, J.; BILLARD, R., 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31:231-243.
- TAN-FERMIN, J.D.; GARCIA, I.M.B.; CASTILLO JR, A.R. 1994 Induction of sex inversion in juvenile grouper *Epinephelus suillus*, (Valenciennes) by injections of 17-alfa-metiltestosterone. *Jpn. J. Ichthyol.*, 40: 413-420.
- TIERSCH, T.R. 2000 Introduction. In: TIERCH, T.R. e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. USA: xix-xxvi.
- TIERCH, T. R., WAYMANN, W.R., SKAPURA, D.P., NEIDIG, C.L.; GRIER, H.J. 2004 Transport and cryopreservation of sperm of the common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research*, 35: 278-288.
- THIRUMALA, S.; CAMPBELL, W.T.; VICKNAIR, M.R.; TIERSCH, T.R.; DEVIREDDY, R.V. 2006 Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, 66: 964-973.
- TOOKWINAS, S. 1989 Review of knowledge on grouper aquaculture in South East Asia. In: *ADVANCES IN TROPICAL AQUACULTURE*. Workshop, 20 February- 4 March/1989, Tahiti, French Polynesia, p. 429-435.
- TUCKER, J.W., Jr. e FITZGERALD, W.J. 1994 Induced spawning in two Western Tropical Pacific groupers, *Plectropomus areolatus* and *Epinephelus fuscoguttatus*, in Palau. *Asian Fisheries Science*, 7: 57-62.
- TUCKER, J.W. Jr. 1998 *Marine Fish Culture*. Kluwer Academia Publishers. 750 p.
- TUCKER, J.W.Jr. 1999 *Grouper Aquaculture*. SRAC Publication, n.721, 22p.
- WAYMAN, W.R.; THOMAS, R.G.; TIERSCH, T.R. 1997 Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 47: 1519-1529.

- WAYMAN, W.R. e TIERSCH, T.R. 2000 Research methods for cryopreservation of sperm. In: TIERSCH, T.R e MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, pp. 264-279.
- WHAYLEN, L.; PATTENGILL-SEMMENS, C.V.; SEMMENS, B.X.; BUSH, P.G. and BOARDMAN, M.R. 2004 Observations of a Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, spawning aggregation site in Little Cayman, Cayman Islands, including multi-species spawning information. *Envir. Biol. of Fishes*, 70: 305-313.
- WILLIAMS, K. C.; SMITH, D. M.; WILLIAMS, I. H.; IRVIN, S. J.; BARCLAY, M. 2005 Aciar grouper grow-out feeds program and related CSIRO research. *Aquaculture Asia*, 12 (1): 29-34.
- WITHLER, F.C. e LIM, L.C. 1982 Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, 37: 389-392.
- YEH, S.L.; DAI, Q.C.; CHU, Y.T.; KUO, C.M.; TING, Y.Y.; CHANG, C.F. 2003 Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula*. *Aquaculture*, 228 : 371-381.
- ZABALA, M.; GARCIA-RUBIES, A.; LOUISY, P.; SALA, E. 1997a Spawning behavior of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61 (1): 65-77.
- ZABALA, M.; LOUISY, P.; GARCIA-RUBIES, A ; GRACIA, V. 1997b Social-behavioral context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*. 61 (1): 79-89.
- ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical analysis*. 4th Ed. Prentice Hall. Upper Saddle River. NJ, USA, 1999. 929 p.