

Morfologia espermática em tilápia tailandesa alimentada com diferentes fontes de óleo

Rodrigo D. Navarro^{1*}, Viviane O. Felizardo², Luis D. S. Murgas², Marcelo M. Pereira⁴, Aline F. S. Carvalho², Fernanda K. S. P. Navarro³

¹Universidade de Brasília, Laboratório de Aquicultura e de Biotecnologia de Organismo Aquáticos, Brasil. ²Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia Animal e Famacologia, Brasil. ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Brasil. ⁴Fundação do Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Treinamento em Aquicultura, Brasil. *Email: navarrounb@gmail.com

RESUMO

Fontes habitualmente utilizadas para a fabricação de ração para peixes, como o óleo de peixe têm um custo alto para a indústria de rações e por isso é necessário pesquisa em fontes alternativas. Objetivou-se avaliar a morfologia do esperma fresco da tilápia tailandesa alimentados com dietas contendo diferentes fontes de óleo. Foram utilizadas 80 tilápias tailandesas alimentadas com dietas contendo quatro fontes de óleo (T1: óleo de soja, T2: óleo de linhaça, T3: óleo de peixe, T4: óleo de milho). Os peixes foram alimentados com 5% de peso corporal, oferecidas três vezes por dia. A cada 15 dias foram realizados biometrias para ajuste da ração. Adotou-se o ciclo luz/escuro de 12:12 h. A temperatura foi medida duas vezes por dia (7:00 e 17:00 h), o oxigênio dissolvido, medido por um oxímetro digital e amônia a cada sete dias utilizando um kit de amonia. Uma maior frequência de anormalidades espermáticas foi observada no grupo de peixes alimentados com dieta suplementada com óleo de peixe (cabeça isolada, cauda degenerada e cauda gota distal). Neste trabalho, o tratamento utilizando óleo de peixe foi o que apresentou maior porcentagem de anormalidades. A utilização de óleo de soja e linhaça parece ser mais eficiente nas avaliações da integridade do sêmen *in natura*, por estar vinculado a menores índices de anormalidade no sêmen de tilápias.

Palavras Chave: óleo de soja, óleo de linhaça, óleo de milho, óleo de peixe, nutrição de reprodutores, *Oreochromis niloticus*.

Sperm morphology in Thai tilapia fed with different sources of oil

ABSTRACT

Sources commonly used for the manufacture of fish feed such as fish oil have a high cost to the feed industry and therefore research into alternative sources is needed. The objective of this study was to evaluate the morphology of fresh sperm from Thai tilapia Fed diets containing different oil sources. Eighty Thai tilapia fed diets containing four sources of oil were used (T1: soybean oil, T2: linseed oil, T3: fish oil, T4: corn oil). The fish were fed 5% of body weight, offered three times a day. Biometrics were performed every 15 days to adjust the feed. The light / dark cycle of 12:12 h was adopted. The temperature was measured twice a day (7:00 a.m. and 5:00 p.m.), dissolved oxygen as measured by a digital oximeter and ammonia every seven days using an ammonia kit. A higher frequency of sperm abnormalities was observed in the group of fish fed a diet supplemented with fish oil (isolated head, degenerated tail and distal droplet tail), in which fish oil treatment presented the highest percentage of abnormalities. use of soybean oil and flaxseed appears to be more efficient in assessing the integrity of semen in natura, because it is linked to lower rates of abnormality in tilapia semen.

Key Words: soybean oil, linseed oil, corn oil, fish oil, breeding nutrition, *Oreochromis niloticus*

Aprobado: Abril 2019

Morfología espermática en tilapias tailandesas alimentadas con diferentes fuentes de aceite

RESUMEN

Las fuentes habitualmente utilizadas para la fabricación de alimento para peces, como el aceite de pescado, tienen un alto costo para la industria de raciones y por eso es necesario investigar en fuentes alternativas. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la morfología espermática del semen fresco de tilapia tailandesa alimentadas con dietas que contenían diferentes fuentes de aceite. Se utilizaron 80 tilapias tailandesas asignadas a cuatro grupos T1: aceite de soja, T2: aceite de linaza, T3: aceite de pescado y T4: aceite de maíz. Los peces fueron alimentados con un 5% de peso corporal, ofrecidos tres veces al día. Cada 15 días se realizaron biometrios para el ajuste de la ración. Se adoptó el ciclo luz / oscuro de 12:12 h. La temperatura se midió dos veces al día (7:00 y 17:00 h), el oxígeno disuelto, medido por un oxímetro digital y amoníaco cada siete días utilizando un kit de amoníaco. En el grupo de peces alimentados con dieta suplementada con aceite de pescado (cabeza aislada, cola degenerada y cola gota distal, se observó una mayor frecuencia de anomalías espermáticas en el grupo de peces alimentados con aceite de pescado (cabeza aislada, cola degenerada y gota citoplasmática distal). En este trabajo, el tratamiento utilizando aceite de pescado fue el que presentó mayor porcentaje de anomalías. El uso de aceite de soja y linaza parece ser más eficiente en las evaluaciones de la integridad del semen in natura, por estar vinculado a menores índices de anomalía en el semen de tilapias.

Palabras clave: aceite de soja, aceite de linaza, aceite de maíz, aceite de pescado, nutrición de reproductores, *Oreochromis niloticus*.

INTRODUÇÃO

A aquicultura economicamente viável depende, em grande parte, de um fornecimento confiável de ovos férteis e alevinos, os quais podem ser produzidos com estoques de reprodutores mantidos em condições adequadas. A função desses reprodutores é influenciada por diversos fatores, além da nutrição; condição climática do local de criação especialmente o fotoperíodo, a temperatura e as chuvas (Miliorini 2007). Quanto à nutrição, está diretamente ligada à reprodução e qualidade dos ovos, e por isso a dieta dos peixes deve ser feita de acordo com sua exigência nutricional (Watanabe *et al.* 1985). Contudo, grande parte das pesquisas está ligada apenas à determinação do nível proteico que seja capaz de promover um maior desempenho produtivo (Andrade 2007).

Fontes habitualmente utilizadas para a fabricação de ração para esses animais, como o óleo de peixe têm um custo alto para a indústria de rações e por isso é fundamental que sejam feitos estudos na busca de fontes alternativas para esses ingredientes sem que se comprometa o

desenvolvimento dos peixes (Bell *et al.* 1997). Nesse sentido, a utilização de alguns óleos vegetais é uma alternativa que pode ser eficaz em diminuir o custo das rações, além de ser fonte de ácidos graxos essenciais necessários ao desenvolvimento de peixes (Martino *et al.* 2002). Alguns óleos, a exemplo dos óleos de soja e linhaça, tem sua composição formada por ácido linolênico em alta quantidade, precursor do ácido eicosapentanoico (EPA) e do Ácido docosahexanoico (DHA; Pereira *et al.* 2003), esses ácidos graxos são importantes na composição de membrana plasmáticas, proporcionando maior número de ovos viáveis e melhor qualidade de sêmen (Navarro *et al.* 2010, 2014).

Existem poucos estudos que avaliam a influência da dieta sobre a morfologia espermática, particularmente a relação da suplementação com diferentes fontes de óleo e a presença de anomalias no esperma da tilápia. A determinação desses defeitos pode servir como um parâmetro para alertar o potencial de fertilização do sêmen e fazer inferências sobre a sua qualidade (Murgas *et al.* 2011).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia de espermatozoides do sêmen *in natura* de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração contendo diferentes fontes de óleo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com machos de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) com peso inicial de (167 ± 0,88 g), na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil, durante 2 meses.

Foram utilizados 80 tilápias, 20 peixes por tratamento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos com quatro repetições de acordo com Navarro *et al.* (2006) e alimentados com uma dieta com 32% PB isoprotéicas e isoenergéticas 3300 kcal ED / kg com quatro fontes de óleo, T1: óleo de soja (OL), T2: óleo de linhaça (OS), T3: óleo de peixe (OP), T4: óleo de milho (OM) (Tabela 1).

Os peixes foram alimentados com 5% de peso corporal, oferecidas três vezes por dia (8:00, 13:00 e 18:00 h). A cada 15 dias foram realizados biometrias para ajuste da ração. Adotou-se o ciclo luz/escuro de 12:12 h. A temperatura foi

Tabela 1. Composições percentuais, químicas e calculadas das dietas experimentais.

| Ingredientes | Dietas | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 |
| Farelo de soja (%) | 60,00 | 60,00 | 60,00 | 60,00 |
| Farelo de trigo (%) | 21,16 | 21,16 | 21,16 | 21,16 |
| Milho (%) | 9,80 | 9,80 | 9,80 | 9,80 |
| Óleo de soja (%) | 6,75 | - | - | - |
| Óleo de linhaça (%) | - | 6,75 | - | - |
| Óleo de peixe (%) | - | - | 6,75 | - |
| Óleo de milho (%) | - | - | - | 6,75 |
| Fosfato bicalcio | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Premix mineral e vitamínico (%) ³ | 0,60 | 0,60 | 0,60 | 0,60 |
| Calcário (%) | 0,62 | 0,62 | 0,62 | 0,62 |
| Antioxidante (BHT) | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Metionina (%) | 0,55 | 0,55 | 0,55 | 0,55 |
| Sal (%) | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 |
| Níveis nutricionais | | | | |
| Proteína bruta (%) ¹ | 31,98 | 31,98 | 31,98 | 31,98 |
| Energia bruta (kcal/kg) ² | 3299,02 | 3299,02 | 3299,02 | 3299,02 |
| Extrato etéreo (%) ¹ | 8,01 | 8,01 | 8,01 | 8,01 |
| Fibra bruta (%) ¹ | 5,71 | 5,71 | 5,71 | 5,71 |
| Cálcio (%) | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,48 |
| Fósforo (%) | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 |

1 Com base nas análises do laboratório de Nutrição/DZO.

2 Baseado em valores de referência estabelecidos por Furuya (2010)

3 Premix vitamínico comercial (5 kg/ton), com níveis de garantia por quilograma de produto: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit k3, 2.400 mg; Vit B3, 4.800 mg; Vit B2, 4.800 mg, Vit B6, 4.000 mg, Vit B12, 4.800 mg, ác. Fólico, 1.200 mg; pantotenato Ca 12.000mg; Vit. C, 48.000 mg; biotina, 48 mg; cloreto de colina, 108.000 mg; niacina, 24.000 mg; e premix mineral comercial (1 kg/ton), com níveis de garantia por quilograma do produto: Fe, 50.000 mg; Cu, 3.000 mg; 20.000 mg; Mn, 20.000 mg; Zn, 3.000 mg; I, 100 mg; Co, 10 mg; Se, 100 mg.

medida duas vezes por dia (7:00 e 17:00 h), o oxigênio dissolvido, medido por um oxímetro digital (YSI Bernauer, Blumenau, Brasil) e amônia a cada sete dias com kit de amonia. O pH e temperatura foram medidos por um aparelho digital de multi-parâmetro medidor de pH por pHmetro portátil (Bernauer F-1002, Blumenau, Brasil). Durante o estudo, a temperatura da água foi controlada e mantida em $28,23 \pm 0,63$ °C, enquanto o pH e o oxigênio dissolvido foram $7,25 \pm 0,58$ e $5,23 \pm 0,85$ mg L⁻¹, respectivamente.

Após o período de alimentação, os animais foram levados para aquários de 1.000 litros. A captura dos animais foi realizada por um puçá e toalha molhada. Com os olhos vendados a papila urogenital foi limpa e seca com uma toalha de papel, pressões suaves foram realizadas na parede abdominal, no sentido crânio-caudal e foram coletados ejaculados individuais. Verificou-se que não havia contaminação do sêmen por urina, sangue ou fezes, e se o mesmo não havia sido ativado. Quando houve previa ativação seminal, o sêmen foi descartado. Todo procedimento foi utilizando o microscópio de luz do Departamento de Veterinária da UFLA. O ejaculado foi colhido num tubo de ensaio estéril, imerso em gelo, protegido da luz, para posterior análise laboratorial.

As amostras de sêmen "fresco" para vinte animais de cada tratamento foram utilizadas para análises morfológicas, que foram observadas por microscopia de luz, com iluminação fluorescente Incident (Nikon, modelo Optiphot-2), no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do solo da UFLA. Uma alíquota de 10 µL de sêmen fresco foi diluído em 990 mL de solução-citrato-formalina. Em seguida, a fracção de 10 µL da amostra foi fixada em uma lâmina de vidro, coradas pelo método de rosa bengala e cobertas por a lamínula. O teste consistiu na observação do morfologia de 100 células de esperma em vários campos em toda a lâmina, conforme metodologia utilizada por Miliorini *et al.* (2011).

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% foi utilizado, a partir do software SAS (2001), para análise das anomalias espermáticas presentes.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Uma maior frequência de anormalidades espermáticas ($P < 0,05$) foi observada no grupo de peixes alimentados com dieta suplementada com óleo de peixe (T3) (cabeça isolada, cauda degenerada e gota citoplasmática distal (Tabela 2). Segundo alguns pesquisadores a associação do óleo de peixe com substâncias antioxidantes, como vitamina E e selênio é primordial para prevenir alterações morfológicas dos espermatozoides (Maldjian *et al.* 2005). Como a inclusão destes antioxidantes não foi realizada no presente experimento, isto pode ter favorecido a este maior número de anomalias no tratamento com óleo de peixe, que segundo Oliveira *et al.* (2006) apresenta uma menor concentração de ômega 3 e 6 que óleo de linhaça, apesar do óleo de peixe apresentar maiores níveis de ácido docosahexaenóico (DHA) e de ácido eicosapentaenóico (EPA), também importantes para manutenção qualidade espermática.

Strzezek *et al.* (2004) e Oliveira *et al.* (2006) relatam que a relação entre os ácidos graxos da série -3 e -6 na dieta pode ser essencial na manutenção da qualidade do sêmen *in natura*, uma vez que a fluidez da membrana dos espermatozoides está relacionada à sua composição lipídica. Murgas *et al.* (2001) e Oliveira *et al.* (2006) verificaram que os ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa ω -3 são componentes importantes de fosfolípidos das membranas biológicas e têm sido consideradas como essenciais para a manutenção das propriedades físico-químicas das membranas testiculares.

Oliveira *et al.* (2006) observaram, em varrões, um efeito significativo para alterações de cauda ($P < 0,05$), sendo que o tratamento com óleo de peixe apresentou maiores alterações quando comparado aos demais tratamentos (controle, óleo de linhaça, óleo comercial com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados). No presente estudo, foi verificado, na maioria dos tratamentos, um maior número de anomalias de cauda quando comparado a anomalias de cabeça (Tabela 2). Isto pode estar relacionado a maior produção de substâncias resultantes da peroxidação lipídica na região da cauda, devido ao maior número de

mitocôndrias e com isso a maior atividade de oxigênio na região espermática (Chatterjee e Gagnon 2001).

A integridade das estruturas espermáticas (cabeça, peça intermediária e cauda) são essenciais para o bom desempenho dos espermatozoides (Kavamoto *et al.* 1999), pois, anormalidades morfológicas no sêmen podem reduzir a fertilização (Cosson 1999). A inclusão de diferentes tipos de óleo na dieta pode ser utilizada para reduzir o número total desses defeitos, uma vez que no presente estudo foram encontradas porcentagens inferiores (6,4 - 10,7%) de anormalidades em comparação com outros estudos em que não houveram inclusão de óleos de peixe ou vegetais, como Mataveli *et al.* (2007) para a

tilápia do Nilo (16,28%) e Kavamoto *et al.* (1999) para curimatá (*Prochilodus scrofa*; 90,46%). Em média, as anormalidades totais verificadas em espécies nativas, cuja dieta não foi suplementada com fontes de óleos, como *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Brycon orbignyanus* são superiores a 12% (Andrade *et al.* 2014).

A porcentagem de anormalidades totais verificada no presente estudo é considerada dentro dos limites aceitáveis para a utilização na fertilização de ovócitos (Tabela 2), de acordo com Miliorini *et al.* (2011) uma porcentagem acima de 50% de espermatozoides normais é necessário para que haja uma boa fertilização na reprodução artificial.

Tabela 2. Médias das anormalidades de cabeça e cauda do sêmen “*in natura*” de tilápia Tailandesa em relação à fonte de óleo utilizado

| Anormalidade | Diets | | | | |
|----------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | P |
| Macrocefalia | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,000 |
| Microcefalia | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,1036 |
| Cabeça Degenerada | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,2 | 0,1705 |
| Cabeça Isolada | 0,1 ^b | 0,2 ^b | 1,2 ^a | 0,6 ^{ab} | 0,0001 |
| Cabeça Gota Proximal | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 0,2 | 0,0580 |
| Soma Cabeça | 1,3 | 1,2 | 2,0 | 1,2 | 0,1859 |
| Cauda Fraturada | 0,0 ^b | 0,3 ^a | 0,0 ^b | 0,0 ^b | 0,0235 |
| Cauda Enrolada | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,5136 |
| Cauda Degenerada | 0,8 ^b | 1,0 ^b | 2,4 ^a | 1,2 ^b | 0,0001 |
| Cauda Dobrada | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | 0,1161 |
| Gota citoplasmática distal | 3,4 ^b | 3,2 ^b | 5,2 ^a | 4,0 ^{ab} | 0,0001 |
| Soma Cauda | 5,1 ^b | 5,5 ^b | 8,4 ^a | 6,4 ^{ab} | 0,0001 |
| Total de Anormalidade | 6,4 ^b | 6,7 ^b | 10,4 ^a | 7,6 ^{ab} | 0,0043 |

Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com a teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

CONCLUSÃO

A utilização de óleo de soja e linhaça parece ser mais eficiente nas avaliações da integridade do sêmen *in natura*, por estar vinculado a menores índices de anormalidade no sêmen de tilápias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o PNPd/CNPq pela bolsa concedida e financiamento do projeto.

LITERATURA CITADA

Andrade, VX. 2007. Desempenho reprodutivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), criado em sistema intensivo com dietas contendo diferentes níveis proteicos e suplementada com óleo de milho. Tese de doutorado. Jaboticabal, Brasil. Universidade Estadual Paulista. 98p.

- Andrade, ES; Paula, DAJ; Felizardo, VO; Murgas, LDS; Veras, GC; Rosa, PV. 2014. Milt cryopreservation for rheophilic fish threatened by Extinction in the Rio Grande, Brazil. *CryoLetters* 35(1):8-14.
- Bell, MV; Farndale, BM; Bruce, MP; Navas, JM; Carrilo, M. 1997. Effect of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 149:107-119.
- Cosson, J; Billard, R; Cibert, C; Dreanno, C; Suquet, M. 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In Gagnon, C (ed.). *The male gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Paris, França, Cache River. p. 161-186.
- Chatterjee, S; Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction Development* 59(4):451-458.
- Kavamoto, ET; Barnabe, VH; Campos, BES; Andrade-Talmelli, EF. 1999. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Boletim do Instituto de Pesca* 25:61-66.
- Martino, RC; Cyrino, JEP; Portz, L; Trugo, LC. 2002. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture* 209(1-4):233-246.
- Mataveli, M; Moraes, GV; Streit Jr, DP; Vargas, LDM; Sakaguti, ES; Toninato, JC; Barbosa, RC; Merlini, L. 2007. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. *Boletim do Instituto de Pesca* 33(1): 1-7.
- Miliorini, AB; Murgas, LDS; Rosa, PV; Oberlender, G; Pereira, GJM; Costa, DV. 2011. A morphological classification proposal for curimatá (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture research* 42(2):177-187.
- Murgas, LDS; Oliveira, AIGF; Lima, JAF. 2001. Desempenho reprodutivo de varrões híbridos alimentados com rações suplementadas com óleo de soja como fonte de ácidos graxos. *Revista Ciência e Tecnologia* 25:1423-1434.
- Murgas, LDS; Felizardo, VO; Ferreira, MR; Andrade, ES; Veras, GC. 2011. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 35(2):186-191.
- Navarro, RD; Matta, SLP; Lanna, EAT; Donzele, JL; Rodrigues, SS; Silva, RF; Calado, LL; Ribeiro Filho, OP. 2006. Níveis de energia digestível na dieta de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) no desenvolvimento testicular em estágio pós-larval. *Zootecnia Tropical* 24(2):153-163.
- Navarro, RD; Navarro, FKSP; Seixas Filho, JT; Ribeiro Filho, OP. 2010. Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. *Revista Augustus* (30):108-118.
- Navarro, RD; Navarro, FKS; Felizardo, VO; Murgas, LDS; Pereira, MM. 2014. Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis* spp.) fed diet with different oil sources. *Acta Scientiarum Technology* 36(3):399-404.
- Ng, WK; Lim, PK; Boey, PL. 2003. Dietary lipid palm oil sources affects growth, fatty acid composition and muscle α -tocopherol concentration of African catfish, (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 215(1-4):29-43.
- Oliveira, SL; Fialho, ET; Murgas, LDS; Lima, JAF; Freitas, RTF; Zangerônimo, MG. 2006. Efeito da inclusão de diferentes tipos de óleos na dieta de varrões sobre a qualidade do sêmen in natura. *Ciência e Agrotecnologia* 30(6):1205-1210.
- Pereira, SL; Leonard, AE; Mukerji, P. 2003. Recent advances in the study of fatty acids desaturases from animals and lower eukaryotes. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 68(2):97-106

SAS Institute. 2001. SAS/ACCESS® 9.0. Cary, North Carolina, USA. SAS, Institute Inc.

Strzezek, J; Fraser, L; Kuklinska, M; Dziekonska, A; Lecewicz, M. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology* 4(3):271-287.

Watanabe, T. 1985. Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture. *In* Cowey, CB; Mackie, AM; Bell, JG. (Eds.). *Nutrition and feeding in fish*. London, UK, Academic Press. p. 395-414.