

CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DO HÍBRIDO TAMBACU (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*)

Ricardo de Matos Morais¹; Cristielle Nunes Souto²; Lázara Aline Simões Silva³;
Delma Machado Cantisani Pádua^{4*}

SAP 16038 Data envio: 10/01/2017 Data do aceite: 04/07/2017
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 17, n. 1, jan./mar., p. 144-148, 2018

RESUMO - Objetivou-se com este trabalho determinar a melhor concentração espermática para fertilização dos ovócitos do híbrido tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*). Para isso, foram selecionadas duas fêmeas de tambaqui com maturação avançada, abdômen abaulado e papila genital avermelhada e quatro machos de pacu com liberação de sêmen mediante leve massagem abdominal no sentido crânio-caudal. As fêmeas e os machos foram induzidos à reprodução com extrato bruto de hipófise. As fêmeas liberaram em média 654 ± 182 g de ovócitos, sendo que cem gramas continham 1560 ovócitos, com uma razão de 170.040 ovócitos.kg⁻¹. Os ovócitos foram distribuídos em cinco tratamentos e três repetições: C1 = 1 g, C2 = 1,5 g, C3 = 2 g, C4 = 2,5 g e C5 = 3 g. Os machos produziram em média $2 \pm 0,3$ mL de sêmen com 10×10^9 espermatozoides.mL⁻¹ e média de 90% de motilidade. Para fertilização, utilizou-se 20 µL de sêmen fresco em cada repetição. A melhor relação espermatozoide/ovócitos foi encontrada no tratamento C4. Para melhorar a taxa de fertilização do híbrido tambacu recomenda-se 1 mL de sêmen de pacu para cada 125 g de ovócito do tambaqui.

Palavras-chave: espermatozoide, peixes, piscicultura, reprodução.

SPERM CONCENTRATION AND ARTIFICIAL FERTILIZATION OF TAMBACU HYBRID OVOCYTES (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*)

ABSTRACT - Our objective was to determine the best concentration of sperm fertilizing hybrid tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*), a female with advanced maturation, bulging abdomen and reddish genital papilla and a male pacu with the release of semen through light massage being selected abdominal in cranial-caudal direction. The female and the male were induced to play with pituitary extract: Female (1st dose of 0.5 mg.kg⁻¹ and 2nd dose 5 mg.kg⁻¹) and male (single dose of 3 mg.kg⁻¹). A female released in 1560 containing 654 g of oocytes oocytes / g with a rate of $170\ 040$ oocytes / kg, the oocytes were divided into five treatments and three replications: C1 = 1 g, C2 = 1.5 g, C3 = 2 g, C4 = 2.5 g and C5 = 3 g. The male semen produced with 2 mL 10×10^9 sperm.mL⁻¹, more than 90% motility. Fertilizer was used 20 µL of fresh semen on each repetition. The best ratio sperm / oocyte was found in C4 To better fertilization rate hybrid tambacu is recommended 1 mL of semen pacu for every 125 g of oocyte tambaqui.

Key words: aquaculture, fish, reproduction, sperm.

INTRODUÇÃO

Entre as principais técnicas de reprodução artificial destaca-se, de modo geral, a indução reprodutiva de peixes que habitam águas correntes (reofílicos), grupo onde se enquadram os peixes que realizam migração reprodutiva (piracema). Entre os peixes nativos brasileiros de interesse na piscicultura destaca-se o grupo popularmente conhecido como peixes redondos: tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e seu híbrido tambacu, que juntos representam 40,3% da produção nacional (IBGE, 2016). O híbrido tambacu é oriundo do cruzamento da fêmea do tambaqui com macho de pacu, que apresenta características desejáveis aos peixes cultivados como:

rusticidade, carne saborosa, tolerância a baixas temperaturas e reprodução artificial conhecida (VARANDAS et al., 2013).

A importância do conhecimento que envolve a reprodução de peixes é ressaltada devido ao interesse na reprodução artificial em cativeiro de muitas espécies, principalmente no que diz respeito às espécies de cultivo destinadas ao consumo humano. O conhecimento da reprodução artificial possibilita a aquisição de animais oriundos de sistemas de produção, evitando pesca predatória e conseqüentemente a exaustão de populações de peixes na natureza (MYLONAS et al., 2010).

Estratégias que visam otimizar o desempenho reprodutivo na reprodução artificial são cruciais para o

¹Zootecnista, Pontifícia Universidade Católica (PUC), Av. Engler, s/n, Jd. Mariliza, CEP 74705-006, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: rmatosmorais@hotmail.com

²Médica Veterinária, Mestre, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Goiás (UFGO), Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: cristielle_nunes@hotmail.com

³Acadêmica em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Goiás (UFGO), Campus Jataí, Jataí, Goiás, Brasil. E-mail: lazara.aline@gmail.com

⁴Professora, Departamento de Zootecnia, Pontifícia Universidade Católica (PUC), Av. Engler, s/n, Jd. Mariliza, CEP 74705-006, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: delmacp@gmail.com. *Autora para correspondência.

desenvolvimento da atividade piscícola e garantia da manutenção das espécies de peixes na natureza. Para tal, devem-se utilizar gametas de qualidade, promovendo máxima taxa de fertilização e subsequente desenvolvimento normal do embrião (BOBE e LABBE, 2010; ROMAGOSA et al., 2010).

Assim, visando à otimização do uso dos reprodutores na fertilização artificial, estudos com espécies nativas de peixes como o pacu [*Piaractus mesopotamicus*, (SANCHES et al., 2011)]; o tambaqui [*Colossoma macropomum*, (LEITE et al., 2013)]; o jundiá [*Rhamdia quelen*, (BOMBARDELLI et al., 2006; ADAMES et al., 2015)], o dourado [*Salminus brasiliensis*, (SANCHES et al., 2009)]; o cascudo-preto [*Rhinelepis aspera*, (BAGGIO et al., 2007)], a piabanha [*Brycon insignis*, (SHIMODA et al., 2007)] e a piracanjuba [*Brycon orbignyianus*, (FELIZARDO et al., 2010)], têm sido realizados afim de definir a proporção ideal de espermatozoides e ovócitos, também denominada dose inseminante, objetivando uma fertilidade adequada, pois quando esta é determinada de forma eficiente há uma melhora significativa da taxa de fertilização (ARAÚJO et al., 2016).

Assim, é importante o uso da reprodução artificial de forma eficiente, garantindo o fornecimento de alevinos e mitigando os custos de produção. Com base no exposto, neste trabalho, objetivou-se quantificar as proporções ideais de gametas masculinos (*P. mesopotamicus*) e femininos (*C. macropomum*) para melhor fertilização do híbrido tambacu.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Piscicultura da Estação Ambiental de Firminópolis (TURVALE), município de Firminópolis (GO), sob coordenadas geográficas de 16°36'19.9"S e 50°16'02.6"W. Quatro machos de Pacu com idade entre três e cinco anos e peso médio de $4,2 \pm 1,3$ kg e duas fêmeas de tambaqui entre quatro e seis anos e peso médio de $6,4 \pm 2,1$ kg foram utilizados. Os reprodutores estavam alojados em um viveiro de 1000 m², com densidade de 0,5 peixe/m² e fornecimento de ração comercial (contendo 28% de proteína bruta). Para indução hormonal, as fêmeas de tambaqui receberam uma dosagem de 0,5 mg de extrato de hipófise de carpa (EBHC)/kg de reprodutor na primeira aplicação e após 12 h foi aplicada a dosagem final de 5 mg EBHC/kg de reprodutor e concomitantemente a segunda aplicação das fêmeas os machos de Pacu receberam 3 mg EBHC/kg de reprodutor (dose única).

A desova ocorreu com nove horas após a segunda aplicação hormonal com temperatura da água de 28°C (252 h/grau). Durante o processo de extrusão das fêmeas, os ovócitos foram coletados em um recipiente seco e limpo de peso conhecido para posterior pesagem. O peso da desova de cada fêmea foi mensurado em balança digital. A partir do material coletado de ambas as fêmeas, formou-se um *pool* de ovócitos, do qual foram retiradas três amostras de 1 g e armazenadas em solução de formol (5%) para posterior contagem.

Os ovócitos foram distribuídos em 15 béqueres de 500 mL, sendo delineado experimentalmente em interações casualizados, contendo cinco tratamentos e três repetições, totalizando 15 unidades experimentais, variando de acordo com o peso dos ovos em cada tratamento, sendo C1 = 1 g de ovócitos, C2 = 1,5 g de ovócitos, C3 = 2 g de ovócitos, C4 = 2,5 g de ovócitos e C5 = 3 g de ovócitos. Posteriormente foi realizada a espermição manual nos machos. As amostras foram coletadas de quatro machos foram misturadas para a formação de um *pool* de sêmen do qual foi mensurada a concentração espermática. Para isto, 1 µL do *pool* foi diluído em 4 mL de solução formol-citrato-1% (1:4000) e analisado em câmara hematimétrica de Neubauer.

Uma alíquota de 20 µL de sêmen fresco foi cuidadosamente misturada com as amostras de ovócitos, e posteriormente foram acrescentados 200 mL de água do tanque (~28 °C), onde permaneceram por cinco minutos para a ativação dos espermatozoides e hidratação dos ovos. O momento da adição da água foi anotado e considerado o início da fertilização (tempo zero). Após a hidratação, os ovos foram transferidos para incubadoras de 2,5 L.

As taxas de fertilização foram mensuradas 11 h após o início da hidratação dos ovos, em microscópio estereoscópio (10 x), utilizando-se aproximadamente 1000 ovos em C1 e 3000 ovos no em C5, respeitando o mínimo (260 ovos) recomendado por Zaniboni Filho (1992). Os dados das taxas de fertilização foram submetidos à análise de variância e teste de comparação entre médias (teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro). Foi estimada a equação de regressão que melhor se ajustasse aos dados da variação nas taxas de fertilização em função da quantidade. Todos os dados foram analisados seguindo os procedimentos GLM do programa computacional SAS 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis físico-químicas da água em que os animais e ovos foram alojados apresentaram pequenas variações durante o experimento, porém mantiveram-se dentro dos padrões aconselháveis para as espécies (26 a 28,5°C para temperatura, oxigênio dissolvido de 5,3 a 6,8 mg.L⁻¹ e pH de 6,5 a 7,0).

A média de sêmen produzida pelos machos foi de $2,0 \pm 0,6$ mL. Esse volume não pode ser considerado o volume total do sêmen liberado pelo macho, uma vez que o método da extrusão não garante a liberação total do sêmen presente. O valor encontrado foi superior ao encontrado em piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) por Ribeiro e Godinho (2003). De acordo com Godinho (2000) o volume do sêmen produzido pelos peixes é muito variável, dependendo do tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta. Este mesmo autor relata que peixes de couro produzem maiores quantidades de sêmen quando comparados aos peixes de escama.

Os machos apresentaram sêmen de coloração branca e aparência viscosa, sendo coletado com relativa facilidade, evidenciando uma boa produção seminal a partir da indução hormonal. Foi encontrada uma concentração espermática de 10×10^9 espermatozoides.mL⁻¹

para o sêmem de pacu. Valores próximos ao encontrado por Maria et al. (2003) de $13,89 \pm 1,26 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹ para a mesma espécie e diferente dos valores encontrados tanto por Silveira et al. (1990), com médias de concentração de $28,07 \pm 8,2 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹ quanto por Miliorini et al. (2002), cuja média foi de $18,62 \pm 3,31 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹. Foi observada motilidade próxima a 90%, valor abaixo do encontrado para essa mesma espécie por Maria et al. (2003) e Miliorini et al. (2002) ($95 \pm 3,16\%$ e $99,16 \pm 0,83\%$, respectivamente).

A cada amostra de 1 g coletada obteve-se a média de 1560 ovócitos (± 208 ovócitos). As fêmeas apresentaram produção média de 170.040 ovócitos.kg⁻¹ de peixe vivo. No que diz respeito à taxa de fecundação máxima, o C4 (com proporção de proporção de 51.282 espermatozoides.g⁻¹ ovócitos) apresentou maior porcentagem de fecundação, mesmo não diferindo estatisticamente de C2, C3 e C5. Por outro lado, o C1, com maior proporção de espermatozoides por grama de ovócito, apresentou a menor taxa de fertilização (Tabela 1).

TABELA 1 - Taxa de fertilização (%) de ovos de tambaqui fertilizados com diferentes proporções de espermatozoides (sptz) por ovócito.

Tratamentos	Proporção sptz.g ⁻¹ ovócito	Taxa de fertilização (%)
1,0	128.205	30±1,7b*
1,5	85.470	36±1,9ab
2,0	64.102	59±2,8ab
2,5	51.282	93±1,1a
3,0	42.735	67±1,5ab

*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

O modelo de regressão que melhor se ajustou aos dados de taxa de fertilização foi o polinomial de segunda ordem, representado pela equação: $\hat{Y} = -15,143x^2 + 86,771x - 48,4$ ($P < 0,05$), em que \hat{Y} = taxa de fertilização e X = espermatozoides por grama de ovócito, alcançando-se um grau de correção entre as variáveis de $R^2 = 75\%$. A taxa de fertilização aumentou de forma linear até atingir a taxa máxima de 93% e diminuiu, finalizando na proporção de 42.735 espermatozoides.g⁻¹ ovócitos. Esse ponto representa a proporção máxima necessária para que a melhor fertilidade seja atingida.

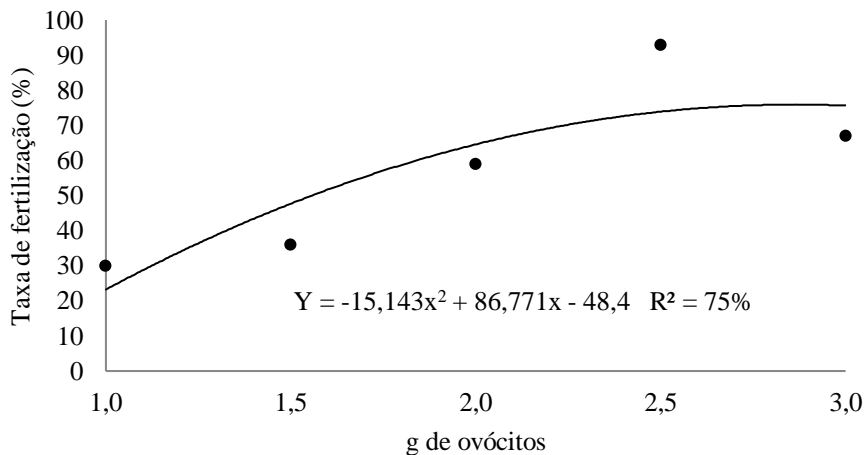


FIGURA 1 - Taxas de fertilização artificial de ovócitos de tambaqui (*C. macropomum*) fertilizados artificialmente com sêmem de pacu (*P. mesopotamicus*) em diferentes relações espermatozoides/ovócito.

Segundo Lahnsteiner (2000), a proporção ideal de espermatozoides por ovócito depende do diâmetro dos ovócitos. Espermatozoides de peixes fertilizam os ovócitos que entram por uma abertura denominada micrópila. Segundo Suquet et al. (1995), quanto menor o diâmetro do ovócito, maior a probabilidade de os espermatozoides alcançarem a estrutura micropilar e fecundá-la. Vazzoler

(1996) descreve que a quantidade de ovócitos por grama tem inversa correlação com o tamanho desses gametas. Assim, quanto menores os ovócitos, maior a quantidade de ovócitos por grama e menor o seu diâmetro.

A razão de 51.282 espermatozoide/ovócito encontrado para fertilização do híbrido tambacu é proporcional aos dados apresentados por Vieira et al.

(1999) em que ovócitos menores como é o caso do tambaqui, necessitam de menor quantidade de espermatozoides para fecundação. As espécies *Thymallus thymallus* (LAHNSTEINER, 2000), *Coregonus lavaretus* (LAHNSTEINER, 2000), *Hippoglossus hippoglossus* (SUQUET et al., 1995) apresentam ovócitos maiores que o tambaqui e, provavelmente por esse motivo, necessitam de mais células espermáticas para fecundar ovócitos.

A menor taxa de fertilização encontrada no C1 pode ser explicada pelo aumento no número de espermatozoides na micrópila, gerando poliespermia e/ou competição entre os espermatozoides, conforme relatado por Kwantong e Bart (2009). Esse efeito negativo do excesso de espermatozoides já foi relatado em estudo com dourado (*Salminus brasiliensis*), espécie também pertencente à família Characidae, em que doses inseminantes acima da ideal (~30.000 espermatozoides/ovócito) promoveram redução das taxas de fertilização, a ponto de proporcionar resultado nulo para a dose de 6×10^6 espermatozoides/ovócito (SANCHES et al., 2009). Sanches et al. (2011) determinaram que a razão ideal de espermatozoide/ovócito foi de 105.481 e 210.963 para pacu (*P. mesopotamicus*). Em outro trabalho, Leite et al. (2013) determinaram que a melhor relação espermatozoides/ovócitos foi de 100.000 para o tambaqui (*C. macropomum*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, M.S.; TOLEDO, C.P.R.; NEUMANN, G.; BUZZI, A.H.; BURATTO, C.N.; PIANA, P.A.; BOMBARDELLI, R.A. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.161, n.1, p.119-128, 2015.

ARAÚJO, M.S.O.; SALMITO VANDERLEY, C.S.B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; LOPES, J.T.; CASTRO, L.V.L. Dose inseminante e resfriamento de embriões de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.1, p.35-40, 2016.

BAGGIO, D.M.; SANCHES E.A.; SYKORA R.M.; BOMBARDELLI R.A.; SOUZA B.E.; VIDAL, E. Relação espermatozoide: ovócito na fertilização de ovócitos do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 2007. **Anais...Dourados: CBPPNAD**, 2007.

BOBE, J.; LABBE, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, Filadélfia, v.165, n.1, p.535-548, 2010.

BOMBARDELLI, R.A.; MORSCHBACHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPPERRECK, M.A. Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.4, p.1251-1257. 2006.

O presente trabalho apresentou relação consideravelmente menor (51.282 espermatozoides/g de ovócito) quando comparados a trabalhos para as mesmas espécies. Essa diferença pode estar atribuída a solução ativadora e ao volume de solução utilizado. A diluição e a ativação dos gametas têm duas importantes implicações sobre as taxas de fertilização: o uso de pouca solução ativadora, além de comprometer a ativação espermática, pode proporcionar um meio inadequado para o encontro dos gametas; e o volume de água em excesso pode diluir demasiadamente o meio, impedindo o espermatozoide de alcançar a micrópila durante o curto período de tempo de ativação que adquirem (SANCHES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2016).

Neste sentido, alguns autores sugeriram que estas diluições não devem ser inferiores a 1:1000 (sêmen: solução ativadora), pois não garantem a eficiente diminuição da viscosidade seminal, afetando assim a completa ativação dos espermatozoides (ARAÚJO et al., 2016).

CONCLUSÃO

Recomenda-se a utilização de 1 mL de sêmen de pacu para cada 125 g de ovócito de tambaqui para melhor taxa de fertilização do híbrido tambacu.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; DRUMOND, M.M.; SILVA, J.A. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, Viçosa, v.57, n.5, p.648-652, 2010.

GODINHO, H.P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.203, p.16-20, 2000.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.43, p.1-49, 2016.

KWANTONG, S.; BART, A.N. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). **Aquaculture Research**, Oxford, v.40, n.1, p.292-297, 2009.

LAHNSTEINER F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. **Aquaculture Research**, v.31, n.3, p.245-258, 2000.

LEITE, L.V.; MELO, M.A.P.; OLIVEIRA, F.C.E.; PINHEIRO, J.P.S.; CAMPELLO, C.C.; NUNES, J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.421-429, 2013.

MARIA, A.N.; MURGAS, L.D.S.; SILVA, M.O.B.; MILIORINI, A.B.; FRANCISCATTO, R.T.; LOGATO, P.V.R. Influencia da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus*

- mesopotamicus* - holmberg, 1887). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.191-194, 2004.
- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M.; FRANCISCATTO, R.T.; SILVA, M.O.B.; MARIA, A.N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfoxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.209-211, 2002.
- MYLONAS C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, Filadélfia, v.165, p.516-534, 2010.
- RIBEIRO, R.I.M.A.; GODINHO, H.P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piauaçu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.5, n.1, p.75-79, 2003.
- ROMAGOSA, E.; SOUZA, B.E.; SANCHES, E.A.; BAGGIO, D.M.; BOMBARDELLI, R.A. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. **Journal of Applied Ichthyology**, Malden, v.26, n.5, p.678-681, 2010.
- SANCHES, E.A.; BAGGIO D.M.; PIANA, P.A.; SOUZA, B.E.; BOMBARDELLI, R.A. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume, and *in natura* semen preservation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.1-6, 2011.
- SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SOUZA, B.E. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2091-2098, 2009.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL, M.V.; GODINHO, H.P.; YASUI, G.S. Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the piabanha *Brycon insignis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.877-882, 2007.
- SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.17, p.1-13, 1990.
- SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, Amsterdam, v.133, p.83-90, 1995.
- VARANDAS, D. N.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; RAMOS, F.M.; SANTOS, R.F.B.; FUJIMOTO, R.Y. Pesque-solte: pesca repetitiva, variáveis hematológicas e parasitismo no peixe híbrido tambacu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.3, 2013.
- VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá, PR: EDUEM, 1996.
- VIEIRA, F.E.; ISAAC, V.J.; FABRÉ, N.N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v.29, p.625-638, 1999.
- ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Larvicultura na CEMIG. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA DE MINAS GERAIS, 10., 1992. **Anais...**Belo Horizonte: Associação Mineira de Aquicultura, p.36-42, 1992.
- ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, n.4, p.655-659, 1996.