

Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae)

[Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the piabanha *Brycon insignis*]

E. Shimoda^{1,2,3}, D.R. Andrade⁴, M.V. Vidal Júnior⁴, H.P. Godinho³, G.S. Yasui⁴

¹Faculdade de Castelo – Castelo, ES

²Universidade Cândido Mendes – Campos dos Goytacazes, RJ

³Universidade Estácio de Sá – Rio de Janeiro, RJ

⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense – Campos dos Goytacazes, RJ

⁵Pontifícia Universidade Católica – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Determinou-se a razão ótima de espermatozoides por ovócitos da piabanha *Brycon insignis*, utilizando-se dois machos e duas fêmeas da espécie, submetidos ao procedimento de desova induzida. Os gametas foram extrusados manualmente 200 horas-grau após a aplicação do extrato bruto de hipófise. Os ovócitos foram misturados e deste *pool* retiraram-se amostras com 2g de ovócitos (701 ovócitos/g). O sêmen do *pool* foi diluído em solução de NaCl 1,2% de tal forma que, após a adição de 1ml do sêmen diluído aos ovócitos, fossem obtidas as seguintes razões espermatozoides por ovócitos em cada tratamento: T1=86.662, T2=173.324, T3=259.986, T4=346.648 e T5=433.310. A taxa de fertilização do sêmen não diluído usado como controle foi de 65,3%. Após ativação espermática com NaHCO₃ 1% e fecundação, os ovos foram transferidos para as incubadoras e nelas foram observadas as seguintes percentagens de fertilização em relação à do grupo-controle: T1=35,7%, T2=53,1%, T3=79,1%, T4=93,4% e T5=87,8%. A percentagem de fertilização (em relação ao controle) aumentou de forma linear, segundo a equação de regressão: $\hat{Y}=15,55+0,0002297X$ ($P<0,01$; $R^2=0,98$), até a proporção de 314.481 espermatozoides por ovócitos, após o que a taxa de fertilização se estabilizou no limite de 88%.

Palavras-chave: piabanha, *Brycon insignis*, razão ótima, espermatozoide, ovócito, fertilização

ABSTRACT

The optimum spermatozoa:oocyte ratio of piabanha *Brycon insignis* was studied. Two males and two females were induced to spawn, and the gametes were stripped after 200 hourgrades starting from the application of carp pituitary gland. Oocytes from two females were mixed, and samples of 2g (701 oocytes/g) were collected from the obtained pool and placed into plastic cups. The semen from the two males, after mixed to compose a pool, was diluted in NaCl solution (1.2%) so that, after the addition of 1ml of diluted sperm into the oocytes, the following spermatozoa:oocyte ratios (tri-replicated) were obtained: T1=86,662, T2=173,324, T3=259,986, T4=346,648 and T5=433,310. After the activation using 1% NaHCO₃ and fertilization, the eggs were transferred to incubators, and observed the percentages of fertilization relative to the control. T1=35.7%, T2=53.1%, T3=79.1%, T4=93.4% and T5=87.8%. Undiluted semen was used as "control", which showed 65% of fertilization. The percentage of fertilization (relative to the control) increased linearly according to the regression $\hat{Y}= 15.55 + 0.0002297X$ ($P<0.01$; $R^2=0.98$), until the proportion of 314,481 spermatozoa per oocyte, and, from this point, the fertilization rate maintained at 88%.

Keywords: piabanha, *Brycon insignis*, optimum ratio, spermatozoon, oocyte, fertilization

Recebido para publicação em 20 de outubro de 2005

Aceito em 17 de maio de 2007

Endereço para correspondência (corresponding address)

Rua Dr. Lacerda Sobrinho, 246 (casa 15) – 28010-077 – Campos dos Goytacazes, RJ

E-mail: eduardo_shimoda@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A piabanha *Brycon insignis* é uma espécie de peixe encontrada apenas na bacia do rio Paraíba do Sul (Nomura, 1984), cuja população vem reduzindo-se rapidamente, em função de ações antrópicas, ao ponto de ser considerada oficialmente como em extinção (Instrução..., 2004). Planos de recuperação da população da espécie têm sido implantados nos últimos anos, incluindo o desenvolvimento de estudos a respeito da produção de alevinos para repovoamento (Andrade-Talmelli et al., 2001a,b; Sousa, 2004).

O teste de fertilização constitui o método que melhor permite avaliar a qualidade seminal (Ribeiro, 2001), sendo seu resultado expresso em porcentagem de ovos que atingem a fase de fechamento do blastóporo. Embora os testes de fertilização tenham sido utilizados com frequência em experimentos de criopreservação de sêmen (Silveira et al., 1984, 1990; Kavamoto et al., 1989; Cóser et al., 1992; Silva, 2000), poucos são os trabalhos no Brasil que determinam a razão ótima de espermatozóides por ovócitos.

Devido à dificuldade de obtenção de ovócitos considerados de boa qualidade (perfeitamente esféricos, translúcido e sem espaço perivitelínico), a capacidade fecundante do sêmen criopreservado tem sido avaliada em poucas espécies de peixes (Suquet et al., 1995). Outra dificuldade encontrada na avaliação da capacidade fecundante é a coleta de quantidades precisas de ovócitos. Por exemplo, os mesmos autores, ao coletarem 9 amostras consecutivas com 800µl de ova, observaram alto coeficiente de variação (66,5%) no número de ovócitos em cada amostra.

Em truta *Oncorhynchus mykiss*, foi verificada correlação positiva entre porcentagem de fertilização e motilidade quando foram usadas proporções menores que 200.000 espermatozóides por ovócito (Moccia e Munkittrick, 1987). Essa proporção foi indicada como a ideal para *O. mykiss*, sendo verificado porcentual de fertilização de 80,4% em trabalho realizado por Silveira et al. (1988). Os resultados podem ser contrastantes, considerando a mesma espécie. Silveira et al. (1984) obtiveram, como maior média, 78% de fertilização ao utilizarem

13 milhões de espermatozóides por óvulo de *O. mykiss*.

Suquet et al. (1995) realizaram experimento com a espécie marinha *Scophthalmus maximus*, verificando os percentuais de fertilização utilizando diversas proporções espermatozóides/ovócitos e ovócitos em estádios diferentes de maturação. Utilizando ovócitos maduros (estádio 3), obtiveram porcentagens de fertilização que variaram entre 58,4% a 93,9% na proporção de 6000 espermatozóides/ovócito. Em proporções menores, o percentual de fertilização decresceu e o coeficiente de variação aumentou nos tratamentos. Em ovócitos em estágio 4, a variação na porcentagem de fertilização foi muito alta, independente da proporção espermatozóides/ovócito.

A razão ótima de espermatozóides por ovócito foi estudada em outras espécies como a *Thymallus thymallus* (Lahnsteiner, 2000), *Esox lucius* (Marcel, 1981), *Coregonus lavareus* (Lahnsteiner, 2000), *Hippoglossus hippoglossus* (Suquet et al., 1995), *Cyprinus carpio* (Marcel, 1981) e *S. maximus* (Suquet et al., 1995), sendo obtidos resultados que variaram de 6000 (*T. thymallus*) a 1.600.000 (*Scophthalmus maximus*).

A obtenção da quantidade de espermatozóides para fertilizar uma determinada massa de ovócitos é importante na rotina de reprodução artificial, por permitir a otimização do sêmen, reduzindo o número de reprodutores e a área e gastos demandados para manutenção destes. Além disso, seria evitada a utilização de menos sêmen do que o necessário, o que poderia implicar em menores porcentuais de fertilização. O objetivo deste trabalho foi determinar a razão ótima de espermatozóides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados exemplares de piabanha *Brycon insignis* de ambos os sexos, presentes na estação experimental do Projeto Piabanha, em Itaocara, RJ, e que se apresentaram no estágio de maturação gonadal avançada, sendo escolhidas as fêmeas que apresentaram abdômen abaulado e papila genital avermelhada, e os machos que apresentaram saída de sêmen mediante massagem abdominal no sentido antero-

Determinação da razão ótima de espermatozoides...

posterior. Estes exemplares foram transportados ao laboratório e submetidos ao procedimento de hipofiseação proposto por Woynarovich e Horvath (1983). As fêmeas receberam a dosagem preparatória de 0,5mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHc) por quilograma de peso vivo. Decorridas 12 horas, foram aplicadas a dosagem final de 5,0mg EBHc/kg peso vivo, nas fêmeas, e a dosagem única de 0,5mg EBHc/kg peso vivo, nos machos.

Após 200 horas-grau, procedeu-se a extrusão, primeiramente dos machos, sendo coletados 5ml de sêmen de cada macho em tubos de vácuo de 10ml, após secagem da papila genital e das áreas adjacentes. Logo após a coleta, seguiram-se a adição de duas gotas de solução de NaHCO₃ 1% a uma gota de sêmen e a verificação da motilidade espermática subjetiva. As duas amostras apresentaram mais do que 90% de motilidade. Posteriormente, as amostras seminais foram misturadas para constituição de um *pool*, cuja motilidade observada foi de 90%, a partir da qual se retiraram três alíquotas para determinação da concentração espermática. Procedeu-se, então, a pré-diluição da amostra, misturando-se 1ml do sêmen com 9ml de solução não ativadora, de NaCl 1,2% (pré-diluição = 10 vezes). Essa solução foi diluída novamente, nas seguintes proporções de volume de sêmen pré-diluído/volume de NaCl 1,2%: 1) 200µl/3800µl (diluição total = 200 vezes); 2) 400µl/ 3600µl (diluição total = 100 vezes); 3) 600µl/3400µl (diluição total = 66,7 vezes); 4) 800µl/3200µl (diluição total = 50 vezes); e 5) 1000µl/3000µl (diluição total = 40 vezes).

Realizou-se, então, a extrusão das fêmeas. Ambas se mostraram preparadas fisiologicamente para a desova, haja vista a facilidade para a extrusão dos ovócitos. A papila genital e as regiões adjacentes (abdômen e nadadeira anal) foram secas, sendo a desova coletada em bacias plásticas secas, uma para cada fêmea. A seguir misturaram-se as desovas para constituição de um *pool*, do qual se retiraram três subamostras, com 1g cada, que foram acondicionadas em tubos de vácuo de 10ml, com formol, para contagem do número de ovócitos, realizada após duas horas.

A partir da amostra composta inicial, foram retiradas também amostras com 2,0g cada, e estas colocadas em copos plásticos de 300ml numerados de acordo com o tratamento utilizado. Para estabelecimento dos tratamentos, em cada copo plástico, foi utilizado 1ml de uma das diluições, sendo que cada tratamento teve três repetições. Ato imediato ao acréscimo do sêmen diluído, foram adicionados, a cada copo plástico, 2ml de NaHCO₃ 1% para ativação dos espermatozoides.

As diluições a partir do sêmen a fresco foram consideradas em concentrações de $24,3 \times 10^9$ espermatozoides/ml e adicionados 1ml de sêmen diluído nos 2g de ovócitos (701 ovócitos/g), das quais se obtiveram as seguintes proporções de espermatozoides por ovócitos, utilizadas em cada tratamento: T1) 86.662; T2) 173.324; T3) 259.986; T4) 346.648; T5) 433.310.

Após a mistura do sêmen de cada tratamento com os ovócitos, para a fecundação, os ovos foram hidratados por 20min utilizando-se água destilada, após o que foram transferidos para as incubadoras. Cada repetição foi colocada em uma incubadora, constituída por uma garrafa transparente *pet* de 2l invertida, com tela para evitar a saída dos ovos. A entrada da água ocorreu pela parte inferior da garrafa invertida, ficando os ovos oxigenados e em suspensão durante seu desenvolvimento.

Os ovos permaneceram na incubadora na qual foi acompanhado o desenvolvimento embrionário, sendo que, nas primeiras 8 horas, foi realizada amostragem a cada duas horas e, posteriormente, a cada 30 minutos. Os primeiros ovócitos com fechamento de blastóporo foram observados após 8,5 horas de incubação. Decorridas mais de 1,5 horas, ou seja, 10 horas depois da colocação dos ovos na incubadora, foi verificada a percentagem de ovos fertilizados.

A seguir estimou-se a equação de regressão que melhor se ajustava aos dados, com as variações das taxas de fertilização (em relação ao controle) em função da quantidade de espermatozoides por ovócitos, sendo sua significância testada utilizando-se o aplicativo SAEG. Com base na equação, foi verificada a proporção ideal de espermatozoides por ovócitos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das taxas de fertilização dos ovos de piabanha, em função das diferentes proporções de espermatozóides por ovócito utilizadas, podem ser observadas na Tab. 1.

As taxas médias de fertilização aumentaram gradativamente até a proporção de 346.648 espermatozóides por ovócitos. Quando a proporção foi aumentada para 433.310, a percentagem de ovócitos fertilizados permaneceu praticamente a mesma. A tendência de estabilização torna-se mais nítida se for

verificada a média de fertilização do controle, em que foi usado 1ml de sêmen sem diluição. As taxas médias de fertilização na proporção de 433.310 espermatozóides por ovócito foram próximas das obtidas no tratamento-controle, constituído de sêmen não diluído.

Obteve-se a equação de regressão descontínua $\hat{Y} = 15,55 + 0,0002297X$ ($P < 0,01$; $R^2 = 98,3$), com platô iniciando-se 314.481 espermatozóides/ovócitos (87,8% de fertilização), e foi possível estimar as taxas de fertilização em função das proporções de espermatozóides por ovócitos (Fig. 1).

Tabela 1. Taxa de fertilização (%) ajustada em relação ao controle (média observada = 65,3%) da piabanha *Brycon insignis* (n=3) verificadas em diferentes proporções de espermatozóides (sptz) por ovócito

Tratamento	Proporção SPTZ / Ovócitos	Taxa de fertilização (%) em relação ao controle	
		médias±desvio-padrão	CV (%)
T1	86.662	35,7±18,1	50,7
T2	173.324	53,1±36,3	68,4
T3	259.986	79,1±21,5	27,2
T4	346.648	93,4±32,7	35,0
T5	433.310	87,8±24,3	27,7
controle	17.389.444	100,0±26,7	26,7

T1= proporção de sptz/ovócito de 86.662; T2= proporção de 173.324; T3= proporção de 259.986; T4= proporção de 346.648; T5= proporção de 433.310. CV= coeficiente de variação.

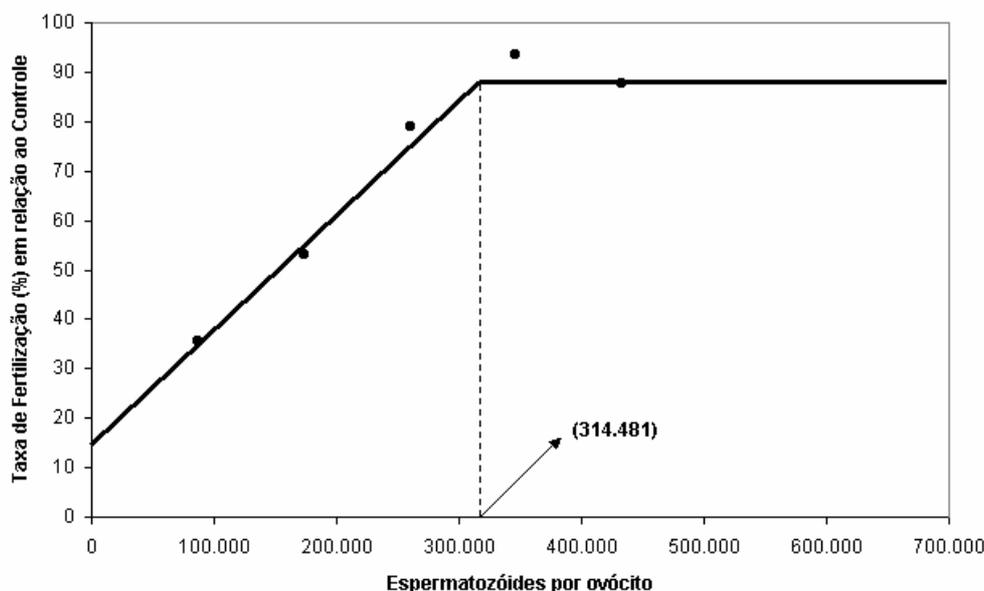


Figura 1. Equação de regressão descontínua (*linear response plateau*) da taxa de fertilização (ajustada em relação ao controle) em função da proporção de espermatozóides por ovócito de piabanha.

Determinação da razão ótima de espermatozoides...

Inicialmente, a taxa de fertilização (\hat{Y}), em relação ao controle, aumentou de forma linear com a proporção de espermatozoides por ovócito (X) seguindo a equação:

$$\hat{Y} = 15,55 + 0,0002297X, \text{ em que:}$$

\hat{Y} = taxa de fertilização e X = espermatozoides por ovócito.

A taxa de fertilização aumentou até atingir o valor de 87,8%, ajustado em relação ao controle, após o qual permaneceu constante neste platô (taxa máxima de fertilização). A mínima proporção necessária para que esse platô de 87,8% de fertilização seja atingido é de 314.481 espermatozoides/ovócito, considerada a razão ótima para que ocorra o máximo de fertilização dos ovos de piabanha.

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 o aparato micropilar e fecundá-lo. 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. No presente trabalho, o indicador do tamanho dos ovócitos foi a quantidade de ovócitos por grama. Embora o diâmetro do ovócito da piabanha não tenha sido medido no experimento de Sousa (2004), o autor verificou que, em situações experimentais, o ovócito mediu 1,3mm.

A razão ideal de aproximadamente 314×10^3 espermatozoides por ovócito obtida na piabanha, considerando que 1g (~1ml) de ova apresentou cerca de 700 ovócitos, é compatível com a tendência mostrada na Tab. 2, que demonstra que ovócitos maiores necessitam de mais espermatozoides para fecundação.

Tabela 2. Razão ótima de espermatozoides (spt_3) por ovócito de acordo com o tamanho dos ovócitos em algumas espécies. Espécies de peixe com ovócitos maiores do que a da piabanha são citadas acima desta e as com ovócitos menores, abaixo

Espécie	Indicativo do tamanho do ovócitos (ovócitos/ml ou diâmetro do ovócito)	Razão ideal $spt_3 \times 10^3$ /ovócito	Autor
<i>Thymallus thymallus</i>	40 ovócitos/ml	1200 – 1600	Lahnsteiner (2000)
<i>Esox lucius</i>	Diâmetro = 2mm	700	Marcel (1981)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Diâmetro = 4mm	200	Silveira et al. (1988)
<i>Coregonus lavaretus</i>	150 ovócitos/ml	300 – 500	Billard (1975)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Diâmetro = 3mm	1600	Lahnsteiner (2000)
<i>Brycon insignis</i>	701 ovócitos/g Diâmetro = 1,3mm	314	Suquet et al. (1995)
<i>Cyprinus carpio</i>	1500 ovócitos/g	13	Presente trabalho Sousa (2004)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Diâmetro = 1mm	6	Marcel (1981) Suquet et al. (1995)

As espécies *T. thymallus* (Lahnsteiner, 2000), *E. lucius* (Marcel, 1981), *C. lavaretus* (Lahnsteiner, 2000), *H. hippoglossus* (Suquet et al., 1995) apresentam ovócitos maiores que a piabanha e, provavelmente por isso, necessitam de mais células espermáticas para fecundar ovócitos. De forma análoga, as menores razões ótimas espermatozoides/ovócito verificadas no *S. maximus* (Suquet et al., 1995) e no *C. carpio* (Marcel, 1981) podem ser explicadas pelo fato de seus ovócitos serem menores que os encontrados na piabanha. A mesma relação não foi verificada

na truta *O. mykiss* que, apesar de apresentar ovócitos de maior diâmetro, mostrou proporção ótima espermatozoides/ovócito menor que a piabanha. Segundo Suquet et al. (1995), a distância a ser percorrida pelo espermatozoide, que depende da velocidade espermática e tempo de motilidade, influencia na capacidade fecundante. Assim, é possível que os espermatozoides de truta tenham movimento mais rápido e duradouro, sendo necessária menor quantidade para fecundar um ovócito.

Considerando-se que, em média, a concentração do sêmen da piabanha é de aproximadamente 25×10^9 espermatozoides/ml e que cada 1g de desova apresenta cerca de 700 ovócitos, recomenda-se, na rotina de desova induzida da piabanha, a utilização de, pelo menos, 0,9ml de sêmen para cada 100g de ovócitos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPERJ, pelo auxílio financeiro, e ao projeto Piabanha, por ceder o espaço físico e os peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T., ROMAGOSA, E. et al. Embryonic and larval development of the "piabanha", *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca*, v.27, p.21–28, 2001a.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. *Bol. Inst. Pesca*, v.27, p.149–154, 2001b.
- BILLARD, R. L'insemination artificielle de la truite, *Salmo gairdneri* Richardson. V. Effets de la dilution et définition du rapport optimum gamètes/dilueur. *Bull. Fr. Piscicult.*, v.257, p.121-135, 1975.
- BILLARD, R.; PETIT, J.; JALABERT, B. et al. *Artificial insemination in trout using a sperm diluent*. In: BLAXTER, J.H.S. (Ed.). *The early life history of fish*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1974. p.715-723.
- CÓSER, A.M.L.; GODINHO, H.P.; SATO, Y. Capacidade de fertilização do sêmen de *Prochilodus marginatus* (curimatá-pacu) congelados sob forma de "pellets". In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA, 10., Belo Horizonte, *Anais...*, Belo Horizonte, 2000. p.56-59.
- FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C. et al. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J. Fish Biol.*, v.54, p.356-369, 1999.
- INSTRUÇÃO normativa nº 05/04 – Reconhecimento como espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexploradas (invertebrados aquáticos e peixes). Brasília: Ministério do Meio Ambiente. *Diário Oficial da União*, Brasília, 21 Mai. 2004.
- KAVAMOTO, E.T.; SILVEIRA, W.F.; GODINHO, H.M. et al. Conservação em nitrogênio líquido do sêmen de *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881. *Bol. Inst. Pesca*, v.16, p.29-36. 1989.
- KAVAMOTO, E.T.; SILVEIRA, W.F.; RIGOLINO, M.G. et al. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. *Bol. Inst. Pesca*, v.14, p.51-62, 1987.
- LAHNSTEINER, F. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. *Aquac. Res.*, v.31, p.245-258, 2000.
- MARCEL, J. *Contrôle de la reproduction et gestions des gamètes de quelques espèces de poissons téléostéens*. Lyons: Ecole Pratique des hautes Etudes, 1981. 132f.
- MOCCIA, R.D.; MUNKITTRICK, K.R. Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and motility of spermatozoa. *Theriogenology*, v.27, p.679-688, 1987.
- NOMURA, H. *Dicionário dos peixes do Brasil*. Brasília: Editerra, 1984. 482p.
- RIBEIRO, R.I.M.A. *Criopreservação do sêmen do piau-açu Leporinus macrocephalus (Garavello e Britski, 1998)*. 2001. 65f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, E.B. *Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836)*. 2000. 49f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Bol. Inst. Pesca*, v.17, p.1-13. 1990.
- SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G. et al. Fertilidade do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. *Bol. Inst. Pesca*, v.15, p.51-57. 1988.
- SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G. et al. Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, v.11, p.131-136. 1984.
- SOUSA, G. *Indução à desova, ontogenia inicial, etologia larval e alevinagem da piabanha (Brycon insignis Steindachner, 1877)*. 2004. 73f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.
- SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J. et al. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture*, v.133, p.83-90, 1995.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.*, v.31, p.231-243, 2000.
- VAZZOLER, A.E.A.M. *Biologia e reprodução de peixes teleosteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem, 1996. 169p.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 200p.