

# Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

Viviane de Oliveira Felizardo<sup>1,2</sup>, Luis David Solis Murgas<sup>3</sup>, Mariana Martins Drumond<sup>4</sup>, Juliana de Aquino Silva<sup>5</sup>

## RESUMO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849) é uma espécie de peixe migratória, ameaçada de extinção. O objetivo do presente estudo foi determinar a dose inseminante na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba. Para isso, utilizou-se delineamento em blocos casualizados, com quatro tratamentos e três repetições. Três casais de piracanjuba, selecionados dos tanques de reprodutores da Estação Ambiental de Itutinga (EAI – CEMIG), no período de piracema 2006/2007, receberam aplicação de hormônio extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para obtenção dos gametas. Adotaram-se quatro tratamentos diferentes para a fertilização de 0,1 grama de ovócitos: 10µL, 20µL, 30µL e 40µL de sêmen. As amostras foram ativadas com 5 mL de água do próprio tanque e, em seguida, levadas para incubadoras, dotadas de renovação constante de água, à temperatura de 28°C. Após 8 e 16 horas, analisaram-se as taxas de fertilização (ovos viáveis) e de eclosão dos ovos, respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados pelo teste de Tukey a 5%. As relações sêmen-ovócitos testadas não alteraram as taxas de fertilização e eclosão ( $P>0,05$ ). O número de espermatozoides-ovócitos, variando de  $10,4 \times 10^5$  a  $41,6 \times 10^5$ , foi eficiente para obtenção de boas taxas de fertilidade.

**Palavras-chave:** Reprodução, gametas, peixes, taxas de eclosão.

## ABSTRACT

### Insemination dose used in the artificial fertilization of piracanjuba ovocyte (*Brycon orbignyanus*)

Piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849) is an migratory fish listed as an endangered species. The aim of this study was to determine the insemination dose for *in vitro* fertilization of piracanjuba oocytes. The experiments were arranged in a randomized block design with four treatments and three replications. Three piracanjuba couples selected from the breeding tanks at the Itutinga Environmental Station (IES-CEMIG), Minas Gerais State, Brazil, in the spawning period of 2006-2007, were applied crude extract of carp pituitary hormone for the production of gametes. Four different treatments were used for fertilization of 0.1 gram of oocytes: 10 µL, 20 µL, 30 µL and 40 µL of sperm. The samples were activated with 5 mL of water from the tank and then taken to a hatchery with constant water flow and temperature at 28 °C. After 8 and 16 hours, the rates of fertilization (viable eggs) and hatching eggs were analyzed, respectively. The results were compared by Tukey test at 5% probability level. Tested sperm/oocyte ratios did not alter the rates of fertilization and hatching ( $P>0.05$ ). The sperm/oocyte ratio ranging from  $10.4 \times 10^5$  to  $41.6 \times 10^5$  was efficient to achieve good fertility rates.

**Key words:** Gametes, fish, hatching rates, reproduction.

Recebido para publicação em março de 2008 e aprovado em agosto de 2010

<sup>1</sup> Extraído de dissertação do primeiro autor, financiado pela FUNDAÇÃO O Boticário e CAPES.

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia. Rua João Mattioli, 542, Centro, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. viviofbio@yahoo.com.br.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Doutor. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Veterinárias. Caixa postal: 3037, Centro, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. lsmurgas@ufla.br Autor para correspondência

<sup>4</sup> Bióloga, Mestre. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, caixa postal: 3037, Centro, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. mmdrumond@hotmail.com.

<sup>5</sup> Zootecnista, Mestre. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, caixa postal: 3037, Centro, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. jmilanas@hotmail.com.

## INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie reofílica originária da bacia do Paraná-Uruguai, principalmente dos rios Grande e Paraná (Castagnolli, 1992). Apresenta rápido crescimento, podendo atingir até 80 centímetros de comprimento corporal e 10 quilogramas. É uma espécie onívora, alimentando-se, eventualmente, de peixes, frutos e insetos. O macho reproduz-se a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, enquanto a fêmea o faz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento (Vaz *et al.*, 2000). Apresenta grande interesse comercial, graças aos bons índices zootécnicos e à qualidade da carne, contribuindo, assim, para a pesca predatória da espécie e, conseqüentemente, para a redução dos estoques naturais.

A construção de barragens hidroelétricas também é outro fator que tem contribuído para a diminuição dos exemplares dessa espécie, pois ela interrompe o ciclo natural de reprodução dos peixes de piracema (Vaz *et al.*, 2000). Como medida reparadora, a prática de peixamentos tem sido adotada para recuperação de estoques pesqueiros que, no caso da piracanjuba, tem sido eficiente, visto que, até poucos anos atrás, a espécie já não era mais encontrada no Alto Rio Grande, sendo, agora capturada por pescadores da região em decorrência da sua soltura em peixamentos.

O desenvolvimento de técnicas de reprodução induzida tem colaborado com a prevenção da extinção da piracanjuba, por meio da obtenção de alevinos para posterior recuperação da população natural da espécie e sua conservação em locais de risco para a sua sobrevivência (Murgas *et al.*, 2004).

O conhecimento da correta relação espermatozoide-ovócito apresenta grande importância para o desenvolvimento de programas de criopreservação de sêmen ou ovócitos, destinados tanto para fins de conservação da biodiversidade da espécie, quanto para o uso em programas de melhoramento genético em pisciculturas (Denniston *et al.*, 2000).

A razão ótima de espermatozoides por ovócito foi estudada em outras espécies como a piabanha (*Brycon Insignis*) (Shimoda *et al.*, 2007), *Rhamdia quelen* (Bombardelli *et al.*, 2006) e curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Souza *et al.*, 2007). A obtenção da quantidade de espermatozoides 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 os gastos demandados para manutenção desses animais. Além disso, seria evitada a utilização de menor quantidade de sêmen do que o necessário, o que poderia implicar em menores percentuais de fertilização (Shimoda *et al.*, 2007). Diante disso, este trabalho teve como objetivo determinar a dose inseminante na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, em Itutinga, durante o período de piracema nos meses de dezembro de 2006 a janeiro de 2007.

Foram selecionados três casais de piracanjuba, com peso de 1650±430 g e 1400±320 g para machos e fêmeas, respectivamente. Os reprodutores apresentavam características sexuais secundárias como: presença de orifício genital avermelhado e cavidade celomática abaulada (fêmeas) e liberação de sêmen sob compressão na parede celomática (machos).

Os animais selecionados foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo em dois aquários, dotados de aeração e com troca constante de água. Para a indução de liberação de gametas, aplicou-se injeção intramuscular de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) por kg de peso corporal. Nas fêmeas, foi aplicada uma dose prévia de 0,5 mg/kg e, doze horas após a primeira, foi aplicada uma segunda dose de 5 mg EBHC/kg. Para os machos, foi ministrada uma dose única de 1 mg/kg de EBHC, na hora em que as fêmeas receberam a segunda dose, conforme protocolo utilizado na piscicultura da CEMIG.

Aproximadamente 196 horas após a aplicação do hormônio, foi realizada a coleta de gametas a seco (enxugando as genitálias e regiões adjacentes dos reprodutores), mediante massagem na região ventral do animal, no sentido crânio-caudal. O sêmen foi coletado em tubos de ensaio esterilizados e a desova em béqueres limpos e secos. Logo após a coleta, foi verificada a ausência de contaminantes, como fezes, urina ou sangue, no sêmen. Uma alíquota de sêmen foi coletada para se estimar a concentração espermática. Foram coletados dados dos machos utilizados na fertilização, como peso corporal e motilidade do sêmen *in natura*.

Do material coletado de cada fêmea, foram separadas 12 amostras de 0,1 g de ovócitos cada, acondicionadas em copos plásticos de 50 mL. As amostras foram fertilizadas com quatro volumes diferentes de sêmen (10 µL, 20 µL, 30 µL e 40 µL), sendo realizadas três repetições para cada dose. Foi coletado 0,1 g de ovócitos, para estimar seu número nesse volume. Posteriormente à mistura do sêmen e ovócitos a seco, os gametas foram ativados com 5 mL de água do próprio tanque onde estavam os reprodutores, com uma temperatura de 28°C. Após a fertilização, os ovos foram distribuídos nas incubadoras de PVC, com capacidade de um litro. A temperatura da água dos tanques manteve-se constante, em média de 28°C.

As taxas de fertilização foram avaliadas oito horas após a ativação dos gametas, em microscópio estereoscópico binocular, por meio da fórmula empregada por Silva (2007):

TF = [E / (E+I)] x 100, em que

TF: taxa de fertilização;

E: número de embriões viáveis;

I: número de ovos inviáveis.

A taxa de eclosão das larvas foi avaliada 16 horas após a ativação dos gametas. Foram contadas todas as larvas em microscópio estereoscópico binocular. A taxa de eclosão foi estimada utilizando a fórmula:

TE = LA / TF x 100, em que

TE: taxa de eclosão;

LA: número de larvas;

TF: taxa de fertilização.

A avaliação da concentração espermática foi realizada no laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA, com o auxílio de câmara hematimétrica tipo Neubauer. Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi acrescentada a 990 µL de solução de formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 mL). Dessa diluição, foram retirados 10 µL e rediluídos em 990 µL de solução de formol citrato, resultando em uma diluição final de 1:10<sup>4</sup>. Uma alíquota de sêmen diluído foi colocada na câmara de Neubauer ao microscópio óptico e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50.000, encontrando-se, assim, a quantidade de células por mm<sup>3</sup>. A transformação em espermatozoides/mL foi realizada multiplicando-se os valores encontrados por 10<sup>3</sup>.

O número de espermatozoides-ovócitos foi estimado pela equação

EO = ET / O, em que

EO: número de espermatozoides por ovócito;

ET: número total de espermatozoides para cada tratamento; O número de ovócitos em 0,1 g, pela equação

ET = E/1000 x DT, em que

E: espermatozoides por mL (divide-se por 1000 para se encontrar o valor em µL);

DT: dose do tratamento.

O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos casualizados, com quatro tratamentos (doses de 10 µL, 20 µL, 30 µL e 40 µL) e três repetições. O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$y_{ijk} = \mu + t_i + b_j + tb_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , em que

$y_{ijk}$  é o valor da variável dependente na k-ésima repetição do j-ésimo casal que recebeu a i-ésima diluição, com k=1, 2, 3;

$\mu$  é uma constante inerente a cada observação;

$t_i$  é o efeito da i-ésima diluição, com i = 1, ..., 4;

$b_j$  é o efeito do j-ésimo casal considerado como bloco, com j = 1, 2, 3;

$tb_{ij}$  é o efeito da interação da i-ésima diluição com o j-ésimo casal, considerado erro experimental;

$\varepsilon_{ijk}$  considerado erro amostral, considerado aleatório, normalmente distribuído, com média zero e variância  $\sigma^2_e$ .

Todas as variáveis dos experimentos foram analisadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1999). Antes de todas as análises, as variáveis foram investigadas quanto à homogeneidade da variância e à normalidade dos resíduos.

As médias dos volumes de sêmen utilizados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados e as características seminais dos três machos utilizados na fertilização de ovócitos de piracanjuba estão apresentados na Tabela 1. A concentração espermática média avaliada dos reprodutores foi de 10,4 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/mL (variando de 7,3 a 13,6 x 10<sup>9</sup>). Este resultado é superior ao encontrado por Maria *et al.* (2006) para a mesma espécie, que obtiveram uma média de concentração espermática de 5,4 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/mL; Murgas *et al.* (2004) encontraram média de 8,21 ± 2,26 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/mL. A média encontrada em 0,1 g de material colhido das fêmeas foi de 100 ovócitos.

A taxa de fertilidade média não apresentou efeito significativo (P>0,05) entre os tratamentos (Tabela 2), sugerindo que o número de espermatozoides-ovócitos, variando de 10,4 x 10<sup>5</sup> a 41,6 x 10<sup>5</sup> (Tabela 3), é eficiente para obtenção de boas taxas de fertilidade e, ainda, que altas taxas de fertilização podem ser obtidas dentro um amplo intervalo de doses inseminantes. Efeito semelhante foi observado por Tvedt *et al.* (2001), que avaliando doses de sêmen na taxa de fertilização de *Atlantic halibu*, não evidenciaram efeito das doses inseminantes no intervalo de 9 x 10<sup>5</sup> a 5 x 10<sup>8</sup> espermatozoides-ovócitos.

Shimoda *et al.* (2007), avaliando a melhor proporção espermatozoide-/ovócito para piabanha (*Brycon insignis*), em experimento em que os tratamentos variavam de 8,6 x 10<sup>4</sup> a 43,3 x 10<sup>4</sup> espermatozoides-ovócitos, observaram que as taxas médias de fertilização aumentaram gradativamente até a proporção de 34,6 x 10<sup>4</sup> espermatozoides-ovócitos. Quando a proporção foi aumentada para 43,3 x 10<sup>4</sup>, a percentagem de ovócitos fertilizados permaneceu praticamente a mesma, concluindo haver uma tendência à estabilização.

**Tabela 1.** Dados e características seminais dos machos utilizados na fertilização de ovócitos de piracanjuba

Animal	Data de Fertil.	Motil.(%)	Peso (g)	Conc.sptz/mL (x 10 <sup>9</sup> )
1	07/12/06	100	1500	7,3
2	17/12/06	100	1300	13,6
3	11/01/07	100	1500	10,3

Fertil. Fertilidade; motil. Motilidade; conc. Concentração; sptz. Espermatozoides.

**Tabela 2.** Valores médios de percentagem de ovos viáveis (erro padrão) em função dos tratamentos – fertilização

Diluições	Blocos <sup>1</sup>			Médias <sup>1</sup>
	C1	C2	C3	
10	38,98 b	87,00 a	48,84 a	58,27 a
20	45,03 ab	90,66 a	37,86 a	57,85 a
30	50,34 ab	76,96 a	38,08 a	55,12 a
40	69,75 a	84,88 a	32,70 a	62,44 a
Médias <sup>2</sup>	51,02 B	84,87 A	39,37 B	

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. C- casal.

**Tabela 3.** Número médio de espermatozoides-ovócitos encontrados em cada tratamento utilizado

Tratamentos (µL de sêmen)	Nº de sptz/ovócito <sup>1</sup> (x10 <sup>5</sup> )
10	10,4
20	20,8
30	31,2
40	41,6

<sup>1</sup> sptz. Espermatozoides.

Bombardelli *et al.* (2006), trabalhando com cinco concentrações diferentes de sêmen de *Rhamdia quelen*, obtiveram efeito entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ), sugerindo um comportamento linear positivo para taxa de fertilização até a dose de  $8,94 \times 10^4$  de espermatozoides-ovócitos. Estes autores verificaram ainda um *plateau*, ou seja, o aumento da concentração de espermatozoides acima desse valor não apresentou efeito sobre esta taxa, permanecendo constante.

Souza *et al.* (2007) observaram que as relações de espermatozoide-ovócito que proporcionaram as melhores taxas de fertilização para o curimatá foram de  $1 \times 10^{5,5}$  a  $1 \times 10^{6,5}$ . Rana & McAndrew (1989) verificaram que doses inseminantes ideais para Turbot (*Scophthalmus maximus*) foram aquelas acima de  $9 \times 10^3$  espermatozoides-ovócitos. Para carpa comum (*Ciprinus carpio*), Chereguini *et al.* (1999) recomendam doses de  $8,49 \times 10^3$  a  $23,67 \times 10^3$  espermatozoides-ovócitos.

Embora não se tendo encontrado diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, quando se calculou, a média geral dos casais avaliados, pôde-se observar o efeito dos tratamentos no casal 1, no qual o volume de 40 µL apresentou maior eficiência significativa ( $P < 0,05$ ) na taxa de fertilização em relação ao volume de 10 µL. Este fato pode ser explicado pela influência da concentração espermática (7,3 – Tabela 2), que foi a menor em relação às demais, necessitando assim de uma dose maior de sêmen para se obter

máxima eficiência. Silva (2007) afirma que a concentração espermática pode ser influenciada pelo período de reprodução em que o macho espermeia.

Em curimba (*Prochilodus lineatus*), esse autor relata que, ao final do ano reprodutivo, em janeiro, os machos de curimba apresentaram o sêmen com maior concentração de espermatozoides/mm<sup>3</sup>. Estes estudos ainda não foram realizados para a piracanjuba, mas sugere-se um comportamento semelhante, quando há um período ótimo para reprodução.

A taxa de fertilização, obtida do restante dos gametas do casal 3, foi de 45%, sendo neste experimento o casal que apresentou as menores taxas de fertilidade e eclosão, em relação aos demais (Tabela 2 e 4). A análise prévia do sêmen *in natura* indicou que estava em ótimas condições (motilidade 100%) para ser utilizado na fertilização dos ovócitos. Este fato leva a pressupor que as taxas de fertilização e eclosão obtidas podem ter sido influenciadas pela qualidade da desova, visto que a extrusão dos ovócitos foi dificultada nesta fêmea. A seleção dos reprodutores aptos a receber a indução hormonal é visual, o que pode proporcionar a seleção de fêmeas que já passaram do seu período ótimo para receber a indução hormonal.

Baldisserotto (2002) relata que as características utilizadas para seleção dos reprodutores aptos à reprodução são genéricas, para a maioria dos teleósteos, e podem promover a seleção de reprodutores que já passaram do período ótimo para a indução de reprodução, resultando numa menor viabilidade dos ovos.

É provável que o tempo de motilidade espermática influencie as taxas de fertilidade em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), por ser bastante reduzido (de 36 a 113 segundos; Murgas *et al.*, 2004, quando comparado ao de outras espécies, como o Turbot (*Scophthalmus maximus*), de 1 a 17 min; Chereguini *et al.*, 1999). Neste experimento,

**Tabela 4.** Valores médios de porcentagem de eclosão (erro padrão) em função dos tratamentos

Diluições	Blocos <sup>1</sup>			Médias <sup>1</sup>
	C1	C2	C3	
10	59,37	87,92	37,91	61,73
20	75,94	82,51	32,12	63,52
30	66,06	84,59	27,58	59,41
40	82,94	92,87	39,05	71,62
Médias	71,08 B	86,97 A	34,16 C	

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – casal.

todos os procedimentos foram executados em menor tempo possível, para evitar que o tempo gasto com a manipulação dos gametas masculinos e femininos viesse a influenciar os resultados negativamente. Huergo (2004), em estudo com triploidia em *Rhamdia quelen*, no qual foram testados dois controles de fertilização, um antes e outro após os tratamentos, verificou diminuição de 74 para 55% nas taxas de fertilização ao longo do tempo.

A taxa de eclosão não apresentou diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos estudados, mostrando que os volumes de sêmen utilizados são eficientes na obtenção de larvas de piracanjuba (Tabela 4).

O casal 2 foi o que apresentou as melhores taxas de fertilização e eclosão ( $P<0,05$ ). Esses resultados parecem estar relacionados com a concentração espermática apresentada pelo sêmen utilizado na fertilização, que foi a maior entre os animais utilizados neste experimento. Isto nos leva a sugerir que sêmen com concentrações mais elevadas de esperma proporcionam maior taxa de fertilização.

A capacidade de fertilização dos peixes pode variar entre espécimes, pois vários fatores podem interferir no processo, entre eles, o tamanho e qualidade do ovócito, o tempo de motilidade espermática e a distância percorrida pelos espermatozoides. Cada reprodutor deve ter seus gametas analisados para determinar seu potencial ótimo de fertilização (Suquet *et al.*, 1995).

## CONCLUSÃO

Para que haja um maior proveito de gametas na reprodução induzida de piracanjuba, é aconselhável a utilização de  $10,4 \times 10^5$  de espermatozoides-ovócitos.

## REFERÊNCIAS

- Baldisserotto B (2002) Fisiologia de peixe aplicada à piscicultura. Santa Maria, UFSM. 212p.
- Bombardelli RA, Morschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA & Sypereck MA (2006) Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia, 35:1251-1257.
- Castagnolli N (1992) Piscicultura de água doce. Jaboticabal, FINEP, 189p.
- Chereguini O, De La Banda IG, Rasines I & Fernandez A (1999) Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. Aquaculture Research, 30:319-324.
- Denniston RS, Michelet S & Godke RA (2000) Principles of Cryopreservation. In: Tiersch TR & Mazik PM (Eds.). Cryopreservation in aquatic species. Morgantown, The World Aquaculture Society. p.59-74.
- Huergo GPCM (2004) Indução à triploidia no jundiá *Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, (1824) através do choque de pressão hidrostática. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 42p
- Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF & Oliveira AV (2006) Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture, 260:298-306.
- Murgas LDS, Miliorini AB, Franciscatto RT & Maria AN (2004) Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. Revista Brasileira de Zootecnia, 33:1361-1365.
- Rana KJ & Mcandrew BJ (1989) The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture, 76:335-345.
- SAS Institute. SAS Procedures guide for computers (1999) 6 ed. Cary, NC. 373p.
- Shimoda E, Andrade DR, Vidal Júnior MV, Godinho HP & Yasui GS (2007) Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócito de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 59:877-882.
- Silva JMA (2007) Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 75p.
- Souza BE, Sanches EA, Baggio DM, Romagosa E, Bombardelli RA, Piana PA & Vidal E (2007) Interação entre a relação de espermatozoides. ovócito e o volume de água empregados na fertilização artificial de ovócitos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) In: I Congresso Brasileiro De Produção De Peixes Nativos De Água Doce, Dourados. Anais, EMBRAPA Agropecuaria Oeste. CD-ROM.
- Suquet M, Billard R, Cosson J, Normant Y & Fauvel C (1995) Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. Aquaculture, 133:83-90.
- Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ & Power J (2001) The relationship between sperm density, spermocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture, 194:191-200.
- Vaz MM, Torquato VC & Barbosa NDC (2000) Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte, CEMIG/CETEC. 144p.