

# INDUCCIÓN DE TRIPLOIDÍA EN *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE)

Pedro Alejandro VOZZI <sup>1,2</sup>; Sebastián SÁNCHEZ <sup>3</sup>; Enrique Darío PERMINGEAT <sup>1</sup>

## RESUMEN

La técnica de inducción de triploidía en *Rhamdia quelen* fue estandarizada mediante la aplicación de choques térmicos calientes de diferente duración y aplicados en distintos momentos pos fecundación. La supervivencia al choque térmico fue determinada al momento de la eclosión de las larvas. Para la identificación de peces triploides la determinación del nivel de ploidía se realizó a través de recuento del número máximo de nucleolos en núcleos interfásicos. De acuerdo con las variables analizadas se determinó el mejor tratamiento para inducir triploidía en *Rhamdia quelen*, como también aquella variable que produjo mayor tasa de supervivencia al tratamiento térmico elegido en el trabajo - temperatura de choque:  $36 \pm 1$  °C; duración de choque térmico: 5 minutos; momento de choque térmico: 5 minutos pos fecundación, con valores de triploidía del 74,8% y de supervivencia relativa del 33,4%.

**Palabras claves:** triploidía ; choque térmico; jundiá; *Rhamdia quelen*

## INDUCTION OF TRIPLOIDY IN *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE)

### ABSTRACT

The triploidy induction technique in *Rhamdia quelen* was standardized by the application of heat shocks, with different durations, and in different moments post fecundation. The survival to the heat shock was measured at the moment of larvae eclosion. In order to identify the triploid fishes, the rate of ploidy was calculated by recounting the maximum number of nucleolus in interphase nuclei. The best method to induce triploidy in *Rhamdia quelen* was determined based on the values of the variables analysed in this paper. The variable that produced the greatest rate of survival to the heat shock was also indicated - temperature of the shock:  $36 \pm 1$  °C; duration of the temperature shock: 5 minutes; moment of the shock temperature: 5 minutes post fecundation, with triploidy and survival rates of 74.8% and 33.4%, respectively.

**Key words:** triploidy; nucleolus; heat shocks; cat fish; *Rhamdia quelen*

## INDUÇÃO DE TRIPLOIDIA EM *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE)

### RESUMO

A técnica de indução de triploidia em *Rhamdia quelen* foi padronizada mediante aplicação de choques térmicos quentes de diferentes durações, em diferentes momentos pós-fecundação. A sobrevivência ao choque térmico foi determinada no momento da eclosão das larvas. Para identificação dos peixes triploides, a determinação do nível de ploidia foi realizada através da contagem do número máximo de nucléolos em núcleos interfásicos. Com base nas variáveis analisadas no trabalho, determinou-se o melhor tratamento para induzir triploidia em *Rhamdia quelen*, como também aquele que produziu maior taxa de sobrevivência ao tratamento térmico utilizado no trabalho - temperatura de choque:  $36 \pm 1$  °C; duração de choque térmico: 5 minutos; momento de choque térmico: 5 minutos pós-fecundação, com taxas de triploidia e de sobrevivência de 74,8% e 33,4%, respectivamente.

**Palavras-chave:** triploidia; choque térmico; jundiá; *Rhamdia quelen*

---

Artigo: Recebido em 13/05/2003 - Aprovado em 03/11/2003

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Misiones, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales  
Dirección/Address/Endereço: Rivadavia 2370 (3300). Posadas, Misiones, Argentina

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética  
Dirección/Address/Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - CEP: 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Veterinarias, INICNE  
Dirección/Address/Endereço: Sargento Cabral 2139 (3400). Corrientes, Argentina

## INTRODUCCIÓN

El jundiá, *Rhamdia quelen*, es una especie de pez neotropical que se distribuye desde México hasta el centro - norte de la Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Su cultivo en estaciones de piscicultura se encuentra en amplia expansión, especialmente en el sur de Brasil, dado las características biológicas favorables que presenta la especie como son su buena adaptación a los sistemas de cultivo tradicionales y rusticidad (LUCHINI, 1990; CARVALHO GOMEZ *et al.*, 1999). El crecimiento de *Rhamdia quelen* aumenta con la temperatura del agua y es pronunciado en los primeros años de vida. Los machos crecen más que las hembras hasta el tercer o cuarto año de vida, posteriormente la situación se invierte, llegando las hembras a medir 66,5 cm y pesar 3 kg y los machos 52 cm pesando aproximadamente 2,5 kg. (NARAHARA *et al.*, 1985a).

La madurez sexual es alcanzada tempranamente, antes del primer año de vida en ambos sexos (NARAHARA *et al.*, 1985b). Tal precocidad reduce el crecimiento somático, al mismo tiempo, el desarrollo de las gónadas es acompañado de una drástica alteración endócrina (PEREZ *et al.*, 1999), lo que supone cambios en la composición corporal y en el comportamiento de los peces.

Dentro de las técnicas existentes para controlar la madurez sexual precoz, principalmente en hembras, la técnica de inducción de triploidía es el camino correcto para solucionar el problema en especies precoces sexualmente. La inducción de triploidía tiene como objetivo producir esterilidad gamética y/o gonadal dada la formación de trivalentes en la primera división meiótica de los peces triploides resultantes del tratamiento. El proceso citológico consiste en bloquear la segunda división meiótica (por retención del segundo cuerpo polar) mediante la aplicación de choques físicos y químicos a huevos recién fecundados (CHOURROUT, 1987), formando un cigoto triploide con tres pares de cromosomas. La presencia de trivalentes en la meiosis impide casi por completo la maduración sexual en hembras y parcialmente en machos (CHERFAS *et al.*, 1981; BASAVARAJU *et al.*, 2002).

La disrupción en la maduración sexual hace posible la redistribución de la energía metabólica utilizada en la maduración gonadal, la que pasa a ser utilizada en el crecimiento somático (THORGAARD, 1986).

Los tratamientos térmicos son los más aplicados a escala comercial e incluyen choques térmicos fríos

(LINCOLN *et al.*, 1974; CHEVASSUS *et al.*, 1984; PIFERRER *et al.*, 2000) y calientes (CHERFAS *et al.*, 1981; CHEVASSUS *et al.*, 1983; BENFEY y SUTTERLIN, 1984), los que son aplicados a huevos recién fecundados, obteniendo considerables niveles de peces triploides y aceptables tasas de supervivencia al choque térmico.

El objetivo del trabajo es estandarizar la técnica de inducción de triploidía en *Rhamdia quelen* mediante choques térmicos calientes, evaluar el porcentaje de triploides obtenido en diferentes tratamientos como así la supervivencia de los cigotos al tratamiento físico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Captura y reproducción de los animales

Los peces utilizados como reproductores fueron capturados en lagunas marginales de la ruta Nacional 12 (km 1307), provincia de Corrientes, Argentina, entre los meses de febrero y diciembre del 2000, trasladados al laboratorio y alojados en acuarios de 130 L con sistemas de filtración biológica y renovación de agua del 10-15% diario. Los mismos fueron mantenidos a temperaturas entre 25 y 28 °C y alimentados diariamente con ración balanceada.

Para proceder a la inducción hormonal se modificó la técnica propuesta por RUDUNZ NETO (1981) y LUCHINI (1990). Los reproductores fueron mantenidos en acuarios con agua bien oxigenado a una temperatura similar en la que fueron incubados los huevos posteriormente ( $26 \pm 1$  °C). Tanto machos como hembras fueron inducidos hormonalmente a liberar sus gametas mediante inyecciones intraperitoneales de Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG), con 1000 UI de hormona por kilo de peso.

En cada experiencia se utilizó el semen de un macho y los huevos de dos hembras.

Las hembras recibieron una dosis preparatoria de HCG correspondiente al 10% del total de la dosis. Transcurridas 12 horas se procedió a dar la segunda dosis con la totalidad de la hormona. Transcurridas 300 °C horas se procedió a extraer los ovocitos artificialmente. Los machos recibieron una sola dosis de hormona (con la totalidad de la dosis), simultáneamente con la segunda dosis de las hembras.

La obtención de huevos y esperma se realizó mediante la aplicación de masajes abdominales, los gametas fueron colectados en un recipiente limpio y

seco donde fueron fecundados y posteriormente hidratados los huevos. Por último los huevos fecundados fueron colocados en incubadoras flotantes individuales de 2 L de capacidad a razón de 300 huevos por incubadora, dando a cada incubadora un tratamiento diferente.

### Inducción de poliploidía y diseño experimental

Se indujo triploidía mediante la aplicación de choques térmicos calientes ( $36 \pm 1$  °C) sobre huevos recién fecundados, con un diferencial de temperatura de 10 °C sobre la temperatura de incubación.

Las jaulas de incubación fueron trasladadas a un baño termostático a una temperatura de 36 °C en el momento de aplicación del choque térmico, permaneciendo allí durante diferentes tiempos (tratamientos). Concluido el choque térmico los cigotos retornaron a la temperatura de incubación normal de  $26 \pm 1$  °C.

Dos variables fueron analizadas para una temperatura de choques térmicos constante de  $36 \pm 1$  °C:

- a) Duración de choque térmico: 5 y 10 minutos
- b) Momento de choque térmico: comenzando al minuto 1 pos fecundación y concluyendo al minuto 25, con 5 minutos de intervalo entre cada tratamiento (1, 5, 10, 15, 20, 25 minutos pos fecundación).

El análisis de supervivencia fue realizado en larvas al momento de la eclosión, la cual denotó principalmente la resistencia de los huevos al choque térmico, dado que la menor supervivencia de los triploides respecto a los diploides se debe al stress producido durante el choque térmico y no por la condición triploide *per se* (THORGAARD, 1986).

Cada experiencia fue realizada con 5 réplicas. El análisis estadístico fue realizado mediante la aplicación de Análisis de Variancia (ANOVA).

### Determinación del nivel de ploidía

El nivel de ploidía de las larvas fue determinado mediante el recuento del número máximo de nucleolos

por núcleo, siguiendo la técnica propuesta por PHILLIPS *et al.* (1986) para la identificación de peces triploides a partir de núcleos interfásicos en especies que presentan una sola Región Organizadora de Nucleolos (NOR) por complemento haploide.

Para la obtención de suspensiones celulares se modificó la técnica propuesta por KLIGERMAN y BLOOM (1977). Las larvas fueron colocadas en solución hipotónica (KCl al 0,075 M) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se fijaron en metanol-ácido acético (3:1) en frío por dos horas, realizando dos cambios de fijador.

Individualmente, el saco vitelino de cada larva fue removido y posteriormente fueron colocadas en un portaobjetos excavado con una solución de ácido acético al 50% agitando suavemente durante 2-3 minutos a fin de obtener una suspensión celular. Con un capilar para microhematocrito se goteó sobre un vidrio precalentado a 40-50 °C, coloreándose con Giemsa al 10% durante 10 minutos.

Para denotar la presencia de nucleolos se siguió la técnica propuesta por HOWEL y BLACK (1980).

Se analizaron 10 larvas por tratamiento y un total de 50 núcleos por larva.

Para cada reproductor fue analizado el número máximo de nucleolos presentes por núcleo a partir de suspensiones celulares de riñón para comprobar la ausencia de Regiones Organizadoras Nucleolares múltiples (NORs), evitando falsos positivos.

## RESULTADOS

### Identificación y obtención de triploides

Se determinó como triploide aquellos individuos que mostraron en sus núcleos hasta 3 nucleolos (Figura 1) y como diploides aquellos individuos que presentaron como máximo 2 nucleolos por núcleo (Figura 2).

En la tabla 1 se indica el resultado del ANOVA entre los diferentes bloques.

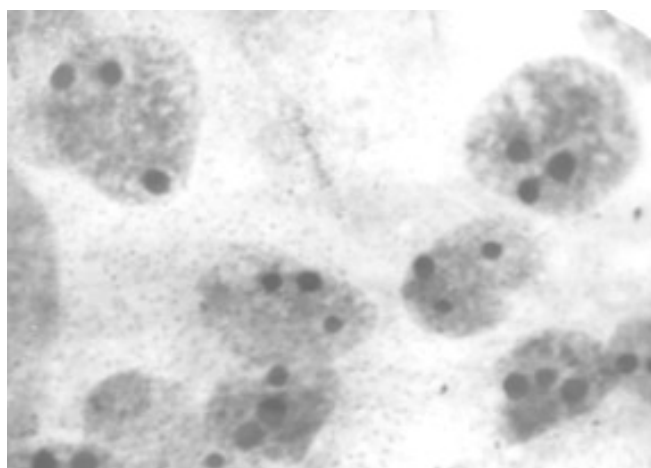
El Análisis de Variancia demostró un comportamiento y resultados similares en las 5

**Tabla 1.** Resultado del Análisis de Variancia entre Bloques, en *Rhamdia quelen*

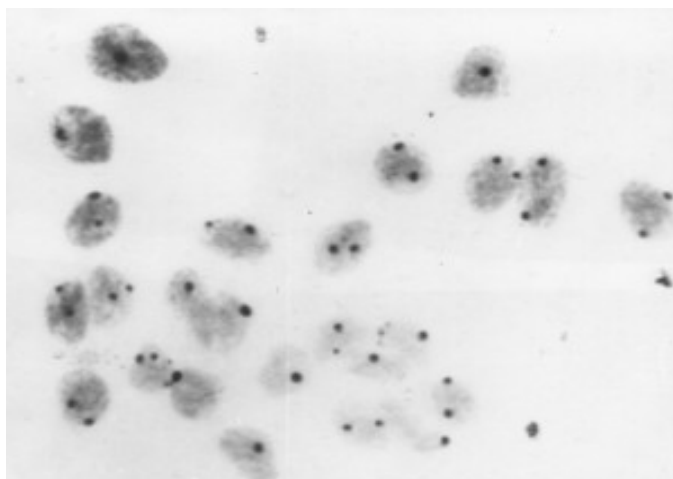
	MS	gl	MS		
Efecto	Efecto	Error	Error	F	P
Bloque	0,535113	362	0,310675	1,722418	0,144381

MS: Suma de cuadrados

gl: Grados de libertad



**Figura 1.** Núcleos interfásicos triploides (3X) teñidos con nitrato de plata, en *Rhamdia quelen*



**Figura 2.** Núcleos interfásicos diploides (2X) teñidos con nitrato de plata, en *Rhamdia quelen*

experiencias (bloques) realizadas ( $p > 0,05$ ), por los que resultados y comportamientos similares fueron observadas en la obtención de triploides realizando las mismas experiencias con distinto material genético.

En la figura 3 se indica el porcentaje de triploides obtenidos en diferentes tratamientos.

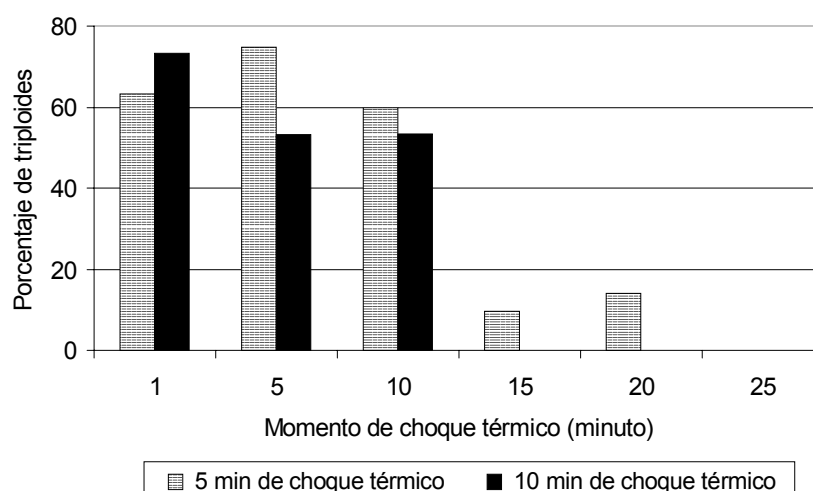
Como se observa en la figura 3, el mayor porcentaje de triploides fue obtenido aplicando choques térmicos entre el minuto 1 y 10 pos fecundación, tanto con 5 como con 10 minutos de duración del mismo, respectivamente con valores de 74,8 y 53,2% de peces triploides obtenidos.

No existieron diferencias significativas en la aplicación de choques térmicos entre los minutos 1 y 10 pos fecundación ( $p > 0,05$ ), mientras que mediante

la aplicación *a posteriori* del Teste LSD entre los minutos 1 - 10 y los minutos 15 - 25 se determinó la existencia de diferencia significativa en lo que respecta al porcentaje de triploides obtenidos aplicando choques térmicos en diferentes momentos pos fecundación ( $p < 0,05$ ).

Diferentes duraciones de choque térmico (5 y 10 minutos) no afectaron significativamente la obtención de triploides entre los minutos 1 y 10 pos fecundación ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2), determinándose *a posteriori* diferencias significativas mediante la aplicación del Teste LSD cuando el choque térmico fue aplicado entre los minutos 15 y 25 ( $p < 0,05$ ).

En la tabla 2 se presentan los resultados del ANOVA para Duración de choque térmico, Momento de choque térmico y la Interacción entre los dos



**Figura 3.** Porcentaje de triploides obtenidos mediante la aplicación de choques térmicos calientes de distinta duración en diferentes momentos pos fecundación, en *Rhamdia quelen*

**Tabla 2.** Resultado del Análisis de Variancia (ANOVA) dentro y entre variables, en *Rhamdia quelen*

	MS	GI	MS		
Efecto	Efecto	Error	Error	F	P
Duración de choque	0,882612	353	0,237699	3,71314	0,054788
Momento de choque	3,374472	353	0,237699	14,19639	0,000001
Interacción	0,382796	353	0,237699	1,61042	0,143183

tratamientos. La interacción entre ambos tratamientos resultó no ser significativa, por lo que el efecto de cada tratamiento en sus diferentes aplicaciones actuó de manera independiente del otro.

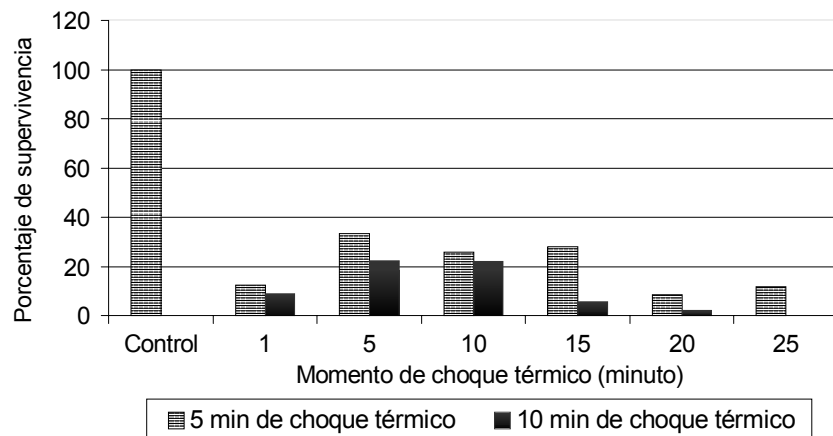
#### Análisis de supervivencia

Como se observa en la figura 4, el choque térmico caliente afectó significativamente la supervivencia de las larvas tanto cuando fue aplicado en diferentes momentos pos fecundación como cuando se aplicaron diferentes duraciones de choque térmico ( $p < 0,05$ ) (Tabla 3). El mayor porcentaje de supervivencia (33,40%) respecto al control fue observado cuando se aplicaron choques térmicos de 5 minutos de duración, 5 minutos después de la fecundación.

Respecto al momento pos fecundación de aplicación del choque térmico no existieron diferencias significativas cuando se aplicaron choques térmicos al minuto 1, 5, 10, 15 ( $p > 0,05$ ), aunque mostraron mayor tasa de supervivencia las larvas que tratadas a los 5 minutos.

Si bien en la variable Duración de choque existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), mediante la realización *a posteriori* del teste LSD se determinó que tales diferencias existieron entre el control y los tratamientos de 5 y 10 minutos de duración de choque térmico, indicando que cualquiera de estos tratamientos reduce significativamente la supervivencia de los embriones, no existiendo diferencias significativas la supervivencia de las larvas aplicando choques térmicos de 5 y 10 minutos ( $p > 0,05$ ).

Respecto a la variable Momento de choque también fueron observadas diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), evidenciando *a posteriori* mediante la aplicación del Test LSD que esta diferencia ocurrió entre el control y todos los tratamientos, observándose nuevamente el efecto nocivo del choque térmico sobre la supervivencia de las larvas. En tanto los choques térmicos aplicados entre el minuto 1 y 15 fueron mejor tolerados por los embriones respecto a los tratados entre el minuto 20 y 25 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4.** Efecto del choque térmico caliente pos fecundación sobre la supervivencia de las larvas (respecto al control) al momento de la eclosión, en *Rhamdia quelen*

**Tabla 3.** Resultados del Análisis de Variancia para Duración de choque térmico y Momento de aplicación y su efecto sobre la supervivencia de las larvas de *Rhamdia quelen*

	MS	Gl	MS		
Efecto	Efecto	Error	Error	F	P
Duración de choque	0,2383	0,377	0,17701	13,4399	0,00001
Momento de choque	0,081471	72	0,017661	4,61301	0,000263

#### Distribución nucleolar en reproductores y larvas

En las tablas 4 y 5 se indica la distribución nucleolar (en porcentaje) para larvas al momento de la eclosión y para reproductores, respectivamente.

Como se observa en la tabla 4, la frecuencia de núcleos con 3 nucleolos en larvas triploides fue

menor a la frecuencia observada de núcleos con 1 y 2. Resultados similares fueron encontrados por PHILLIPS *et al.* (1986) en salmónidos. La frecuencia de nucleolos observada en larvas diploides y en reproductores (tablas 4 y 5) fue aproximadamente 1:1.

**Tabla 4.** Distribución nucleolar en larvas diploides y triploides de *Rhamdia quelen*

Ploidía	Número de nucleolos	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Standard
Diploide	1	23,80	15	37	3,68
	2	26,01	13	35	3,77
Triploide	1	20,94	10	36	3,68
	2	22,05	6	32	3,77
	3	6,97	2	2	2,43

**Tabla 5.** Distribución nucleolar observada en núcleos de suspensiones celulares de riñón en reproductores de *Rhamdia quelen*

Ploidía	Número de nucleolos	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Standard
Diploide	1	23,9	11	30	3,54
	2	26,1	22	31	2,99

## DISCUSIÓN

Escasos relatos en la literatura existen respecto a la inducción de poliploidía en especies neotropicales (FORESTI *et al.*, 1994), siendo las variables usadas en el trabajo variantes de las utilizadas en estudios realizados en salmónidos (CHOURROUT, 1987) y ciprínidos (BASAVARAJU *et al.*, 2002) donde se indujo poliploidía aplicando choques térmicos calientes.

Futuros trabajos deberán ser concentrados en aumentar el porcentaje de triploides inducidos y también la supervivencia al tratamiento térmico dentro de los tiempos pos fecundación analizados en el trabajo, ya que a una similar temperatura de trabajo, VALCARCEL *et al.* (1994) observaron que la liberación del segundo cuerpo polar en *Rhamdia sapo* ocurría aproximadamente 10 minutos después de la fecundación. Tal resultado es concordante con la frecuencia de triploides encontrado en el trabajo, ya que la mayor cantidad de los mismos se obtuvo cuando los choques térmicos fueron aplicados entre el minuto 1 y 10 después de ocurrida la fecundación, por tanto antes de que se produzca la liberación del segundo cuerpo polar. La utilización de choques hipotérmicos o hiperbáricos puede ser el camino para aumentar la frecuencia de triploides y la supervivencia de los huevos al tratamiento físico.

Dada la presencia de un solo par de NORs (por tanto dos nucleolos como máximo en núcleos interfásicos), ausencia de polimorfismos numéricos respecto a las NORs (FENOCCHIO *et al.*, 2000) y la presencia máxima de dos nucleolos por núcleo interfásico en los reproductores usados en el trabajo, el protocolo para identificar peces triploides constituyó un método económico y rápido para identificar triploidía en *Rhamdia quelen*.

Según PHILLIPS *et al.* (1986), la distribución nucleolar en larvas diploides y triploides varía entre especie y principalmente con la edad del individuo por lo que las frecuencias de distribución nucleolar obtenidas en el trabajo corresponden a larvas vitelinas pos eclosión y no deben ser considerados como padrón para la especie.

## CONCLUSIONES

Las primeras informaciones para inducir triploidía en *Rhamdia quelen* son presentadas en este trabajo. Se obtuvieron niveles de triploides similares a los encontrados en la bibliografía aunque con niveles de supervivencia de mediana a baja magnitud. Choques hipotérmicos aplicados momentos después

de la fecundación afectaron significativamente el desarrollo de los huevos en todas las variables analizadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASAVARAJU, Y.; MAIR, G.; MOHAN KUMAR, H.M.; PRADEEO KUMAR, S.; KESHAVAPPA, G.Y.; PENMAM, D.J. 2002 An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. *Aquaculture*, 204: 407-418.
- BENFEY, T.J. y SUTTERLIN, A.M. 1984 Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 36(4): 359-367.
- CARVALHO GOMEZ, L.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPARI GOMEZ, A.; BALDISSEROTO, B. 1999 Biología do jundiá *Rhamdia quelen* (Telostei, Pimelodidae). Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, Santa Maria, 30:179-185.
- CHERFAS, N.B.; GOMELSKY, B.I.; EMELJANOVA, O.V.; REKOURBRANISKY, A.V. 1981 Triploidy in reciprocal hybrids obtained from crucian carp and carp. *Genetica*, Moscow, 17(6): 1136-1139.
- CHEVASSUS, B.; QUILLET, E.; CHOURROUT, D. 1983 Obtention d'animaux triploides chez la truite arc-en-ciel. *Bull. Fr. Piscic.*, 290: 161-164.
- CHEVASSUS, B.; QUILLET, E.; CHOURROUT, D. 1984 La production de truites stériles par voie génétique. *La pisciculture française*, 78: 10-19.
- CHOURROUT, D. 1987 Genetics manipulation in fish: Review of methods. In: WORLD SYMPOSIUM ON SELECTION, HYBRIDIZATION, AND GENETIC ENGINEERING IN AQUACULTURE, 17-30 may, 1987, Bordeaux. *Anais...* Berlin. v. 2
- FENOCCHIO, A.S.; BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; CAMACHO, P.M. 2000 B chromosome in two species Genus *Rhamdia* (Siluriformes Pimelodidae). *Folia biologica*, Kraków, 48(3-4): 105-109.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; CARVALHO, E.D. 1994 Ploidy evaluation in the pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes). *Rev. Brasil. Biol.*, 54(1): 31-37.

- HOWELL, W.H. y BLACK, D.A. 1980 Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- KLIGERMAN, A.D. y BLOOM, S.E. 1977 Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 266-269.
- LINCOLN, R.F.; AULSTAD, D.; GRAMMELTVEDT, A. 1974 Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture*, 4: 287-297.
- LUCHINI, L. 1990 *Manual para el cultivo del bagre sudamericano Rhamdia sapo*. Santiago de Chile: RLAC/90/16- PES-20, FAO. 60p.
- NARAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M.; FENERICH-VERANI, N.; ROMAGOSA, E. 1985a Relação peso-comprimento e fator de condição de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). *B. Inst. Pesca*, 12(4): 13-22.
- NARAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E. 1985b Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). *B. Inst. Pesca*, 12(3): 123-137.
- PÉREZ CARRASCO, L.A.; PENMAN, D.J.; BROMAGE, N. 1999 Parâmetros morfométricos de interés comercial en trucha arcoiris triploide, *Oncorhynchus mykiss*. *Revista Aquatic*, 6: febrero. Disponible el 10/04/2003 en URL: [www.revistaaquatic.com](http://www.revistaaquatic.com)
- PHILLIPS, R.B.; ZAJICEK, K.D.; IHSEN, P.E.; JOHNSON, O. 1986 Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture*, 54: 313-319.
- PIFERRER, F.; CAL, R.; ALVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; SÁNCHEZ, L.; MARTINEZ, P. 2000 Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) I. Ploidy determination and effects of cold shocks. *Aquaculture*, 188: 79-90.
- RUDUNZ NETO, J. 1981 *Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas e alevinos de jundiá (Rhamdia quelen)*. Santa Maria. 77p. (Dissertação de Mestrado. Curso de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria- RS)
- SILFVERGRIP, A.M.C. 1996 *A systematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (Telostei, Pimelodidae)*. Stockholm, Sweden. 157p. [PhD. Thesis. (Tese de Doutorado.)].
- THORGAARD, G.H 1986 Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture*, 57: 57-64.
- VALCARCEL, A.; GUERRERO, G.; MAGGESE, M.C. 1994 Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of the catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae), and its photoreactivation. *Aquaculture*, 128: 21-28.