

FERTILIZAÇÃO EM *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881,
COM SÊMEN CRIOPRESERVADO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO*

(Fertilization of *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, with cryopreserved sperm in liquid nitrogen)

Emico Taira KAVAMOTO¹
Washington FOGLI DA SILVEIRA¹
Heloisa Maria GODINHO²
Elisabeth ROMAGOSA¹

RESUMO

A fim de subsidiar os trabalhos de reprodução induzida, foram conduzidos experimentos de congelamento, criopreservação e fertilização com sêmen do curimatã, *Prochilodus scrofa*, no Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo" do Instituto de Pesca em Pirassununga (SP), no período reprodutivo da espécie de 1986. De um "pool" de sêmen de 29 machos, foram observadas as seguintes características espermáticas: motilidade espermática direta subjetiva, 90%; concentração de espermatozoides, $35,25 \times 10^6/\text{mm}^3$ e espermatozoides vivos obtidos pela coloração diferencial, 92,72%. O sêmen diluído foi congelado em vapores de nitrogênio e, em seguida, imerso em nitrogênio líquido (-196°C), permanecendo armazenado em "container" especial. Vinte e quatro horas após o congelamento, amostras de sêmen apresentaram ao redor de 35% de células espermáticas viáveis. Decorridos vinte dias, amostras de sêmen criopreservado foram adicionadas a óvulos frescos obtendo-se uma taxa de fertilização de 91,90%, enquanto que para o sêmen fresco utilizado como controle, o resultado foi 90,48%, as taxas de eclosão das larvas foram de 77,42% e 84,21%, respectivamente. Após dois anos de preservação criogênica do sêmen, realizaram-se dois testes de fertilização utilizando-se óvulos recém-coletados, cujas porcentagens de fertilização foram: 78,01%, 92,68% e de eclosão 54,78%, 84,27%. Para o sêmen fresco utilizado como controle, os resultados foram: 90,82% e 98,14% de óvulos fertilizados e as taxas de eclosão foram: 70,79% e 92,41%. Para obtenção de óvulos, as fêmeas foram induzidas à reprodução através de tratamento hormonal.

PALAVRAS-CHAVE: curimatã, *Prochilodus scrofa*, sêmen, criopreservação

ABSTRACT

Aiming at helping the induced spawning, freezing, cryopreservation and fertilization of "curimatã", *Prochilodus scrofa*, sperm were studied at the Biology Laboratory of Fresh water Fishes of the Instituto de Pesca in Pirassununga (São Paulo State, Brazil) during the reproductive season of 1986. The sperm from 29 males was collected and assembled in a pool obtaining the following data of percentage of sperm motility: 90%; sperm concentration: $35,25 \times 10^6/\text{mm}^3$; and live cells percentage by differential staining method: 92.72%. The diluted sperm was frozen and stored in the liquid nitrogen (-196°C). After twenty-four hours of freezing, it was thawed and examined under phase-contrast microscopy and presented an average of 35% live spermatozoa. After twenty days, the cryopreserved sperm was thawed and then fertilized, revealing a rate of fertility success of 91.90%; fresh sperm fertility was 90.48% and hatched egg rates were: 77.42% and 84.21% respectively. After two years of cryopreservation, two fertilization tests were done utilizing fresh eggs, revealing the following results, respectively: 78.01%; 92.68% and 54.78%; 84.27%. For the fresh sperm control the results were: 90.82% and 98.14% of fertilized eggs and 70.79% and 92.41% of hatching eggs. The obtained results suggest that sperm banks should be installed for the studied species.

KEY-WORDS: "curimatã", *Prochilodus scrofa*, sperm, cryopreservation

(1) Pesquisador Científico - Seção de Biologia Aquática - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca

(2) Pesquisador Científico - Assistência Técnica de Direção - Instituto de Pesca - Bolsista CNPq

(*) Apoio CNPq

1. INTRODUÇÃO

O congelamento e a criopreservação do sêmen de peixes têm sido objeto de razoável número de experimentos. A maior importância do processo de preservação de espermatozoides, além do interesse científico, está no fato de poder subsidiar aquacultura comercial empregando reprodutores selecionados e, conseqüentemente, obter plantéis em melhores condições genéticas.

A literatura estrangeira apresenta vários trabalhos sobre congelamento do sêmen de truta arco-íris, *Salmo gairdneri* através do gelo seco, destacando-se as publicações de BÜYÜKHATİPOĞLU & HOLTZ (1978); STOSS, BÜYÜKHATİPOĞLU & HOLTZ (1978); STEIN & BAYRLE (1978) e STOSS & HOLTZ (1981 a,b). Com a mesma espécie de peixe, encontram-se os trabalhos conduzidos por GRAYBILL & HORTON (1969) e OTT & HORTON (1971) que utilizaram vapores de nitrogênio líquido para o congelamento. Este mesmo processo foi empregado por MOCZARSKI (1976), quando congelou o sêmen da carpa capim, *Ctenopharyngodon idella*.

No Brasil, nestes últimos anos, os trabalhos relativos ao estudo das características seminais (FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA, 1981, 1985; KAVAMOTO et alii, 1985; KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA, 1986; KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODINHO, 1986) possibilitaram a condução de pesquisas de congelamento do sêmen de algumas espécies de água doce. Assim, FOGLI DA SILVEIRA, KAVAMOTO & NARAHARA (1981, 1985) conseguiram o congelamento em

gelo seco e a criopreservação em nitrogênio líquido do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii*. O mesmo método foi empregado para a truta arco-íris, *Salmo irideus* (FOGLI DA SILVEIRA et alii, 1984) e para o curimatá-pacu, *Prochilodus marginatus* (COSER & GODINHO, 1988). O congelamento em vapores de nitrogênio líquido foi empregado por COSER, GODINHO & RIBEIRO (1984), para o sêmen do curimatá, *Prochilodus scrofa*, e dourado, *Salminus maxillosus* e por COSER, GODINHO & TORQUATO (1988), para o sêmen do piau, *Leporinus silvestrii*.

O presente trabalho pretende estudar a técnica de congelamento do sêmen do curimatá, *Prochilodus scrofa*, em vapores de nitrogênio líquido, sua criopreservação e verificar os resultados de fertilização, com vistas à obtenção de tecnologia de reprodução e produção da espécie.

O curimatá, *Prochilodus scrofa*, dentre as espécies com potencial para a aquacultura, apresenta boa perspectiva de criação em cativeiro (LEITE et alii, 1984). Porém, tratando-se de espécie que não se reproduz naturalmente em ambientes estanques, necessita ser induzido à reprodução através do emprego de hormônios gonadotrópicos (FENERICH-VERANI; GODINHO & NARAHARA, 1984; GODINHO et alii, 1986). A rotina de reprodução de peixes tem mostrado a necessidade de se ter sêmen à disposição para garantir a fertilização. Assim, a estocagem do material fecundante sob congelamento profundo vem possibilitar a execução segura daquele processo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No início do mês de novembro de 1986, setenta (70) exemplares machos de curimatá, *Prochilodus scrofa*, foram capturados no Rio Mogi-Guaçu junto à Cachoeira de Emas, Município de Pirassununga, SP, e imediatamente transportados para o Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais "Dr. Pedro de Azevedo" do Instituto de Pesca. Estes peixes, com comprimento médio de 30 cm e peso médio de 350 g, fo-

ram estocados em um tanque de alvenaria de 50 m², onde receberam diariamente, como alimento, ração balanceada, na proporção de 3% do peso vivo do lote.

Aproximadamente 45 dias após captura, coletaram-se amostras de sêmen de vinte e nove (29) reprodutores, através de massagem abdominal no sentido ântero - posterior, em tubos graduados em décimos de ml, os quais

foram mantidas em recipiente contendo água com a temperatura ao redor de 26°C.

Do total de um "pool" de 9,0 ml de sêmen, separou-se 0,5 ml para avaliação das seguintes características seminais: motilidade celular direta subjetiva (SALISBURY & VANDEMARK, 1964); concentração de espermatozoides por mm^3 , pela contagem das células espermáticas em câmara de Neubauer, e exame das células vivas, pela coloração diferencial (BLOM, 1950).

O restante do sêmen, equivalente a 8,5 ml, foi diluído imediatamente na proporção de 1:3, no meio diluidor V_{20} (STEIN & BAYRLE, 1978) constituído de: NaCl = 750 mg, NaHCO_3 = 200 mg, KCl = 38 mg, glicose = 100 mg, gema de ovo = 20 ml, acrescido de 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) como crio-protetor. Após a mistura cuidadosa do diluente com o sêmen na mesma temperatura (26°C), colocaram-se, em cada tubo de ensaio, 5 ml deste sêmen diluído, fechados com rolha e fixados em estantes próprias, ("racks"), que foram colocadas dentro de um recipiente de isopor contendo cubos de gelo e água para a refrigeração gradual do sêmen diluído até atingir a temperatura de 4°C. Decorridos 30 minutos após a coleta do sêmen, os "racks" e tubos de ensaio contendo material espermático foram retirados do gelo (4°C) e colocados numa estante metálica recebendo vapores de nitrogênio líquido. Após seis minutos, todos os tubos foram imersos em nitrogênio líquido e, passados quinze minutos, transferidos para "container" especial (MOD - APOLO Sx 44) onde ficaram armazenados.

Vinte e quatro horas após congelamento, o sêmen foi descongelado e examinado sob microscópio de contraste de fase para verificação da porcentagem de células viáveis.

Neste mesmo período, seis (6) reprodutores machos receberam injeções intramusculares de HCG (gonadotropina coriônica humana) na dosagem de 5 IU/g de peso vivo. Esses exemplares foram mantidos em duas caixas de cimento amianto de 1000 litros, com temperatura da água a 24,5°C e aeração constante. Após quinze horas, coletaram-se, desses exemplares, 10,0 ml de sêmen que foram avaliados quanto às suas características. Os itens examinados, a metodologia empregada e o processo de con-

gelamento foram iguais aos utilizados para os peixes não injetados.

Para a realização dos testes de fertilização, os óvulos foram retirados por extrusão das fêmeas submetidas ao processo de reprodução induzida, segundo GODINHO et alii (1986). A seleção das fêmeas baseou-se não só na observação anatômica externa (ventre abaulado e papila urogenital dilatada), como também no grau de desenvolvimento dos ovócitos intra-ovários avaliados pelo método descrito por FENERICH-VERANI, GODINHO & NARAHARA (1984).

Foram realizados 4 (quatro) testes de fertilização:

1º teste: vinte dias após a criopreservação, amostra de 1 ml de sêmen de peixes não injetados foi descongelada num bequer de 250 ml contendo aproximadamente 1000 óvulos, e imediatamente homogeneizada com a solução de NaHCO_3 a 1%. A mesma metodologia foi utilizada para o sêmen fresco (controle).

Decorridos dois anos de preservação criogênica, outras amostras de sêmen foram descongeladas e utilizadas para outros dois testes de fertilização.

2º teste: A fertilização foi feita em 3 vidros com capacidade de 15 ml, onde se colocaram, em média, 122 óvulos e 0,8 ml de sêmen descongelado. O controle constituiu-se de 98 óvulos que foram fertilizados com 0,2 ml de sêmen fresco. A mistura dos óvulos com o sêmen descongelado, adicionado à solução de NaHCO_3 a 1%, foi mantida por 5 minutos. Após este período, os óvulos foram lavados em água e transferidos para mini-incubadoras mantidas imersas no tanque de 2000 litros de água, à temperatura de 26°C, aeração constante e água corrente.

3º teste: utilizaram-se, em média, 292 óvulos que foram fertilizados com 0,1 ml de sêmen fresco (controle). Foram realizadas 5 repetições.

O 4º teste de fertilização foi empregado na rotina da reprodução induzida na Estação Experimental de Pindamonhangaba. Foram utilizados 10 ml de sêmen de machos injetados que, após descongelamento, foram misturados em aproximadamente 60000 óvulos, sendo simultaneamente adicionada a solução de

NaHCO₃ a 1%. Paralelamente, cerca de 40000 óvulos foram fertilizados com 1,0 ml de sêmen fresco para controle. Cinco minutos após, os ovos foram colocados separados em duas in-

cubadoras utilizadas nos trabalhos de rotina da reprodução.

As taxas de fertilização e eclosão foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

$$\text{taxa de fertilização} = \frac{\text{número de óvulos fertilizados}}{\text{número total de óvulos}} \times 100$$

$$\text{taxa de eclosão} = \frac{\text{número de larvas eclodidas}}{\text{número de óvulos fertilizados}} \times 100$$

Para testar se houve ou não diferença estatística significativa entre as porcentagens de fertilização com sêmen fresco e congelado,

foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2), ao nível de 5% de significância (GOLDSTEIN, 1965).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame macroscópico, verificou-se que as amostras de sêmen coletadas de peixes que não receberam tratamento hormonal apresentavam cor branco leitosa e aspecto cremoso, enquanto que as amostras dos injetados apresentavam cor branca e aspecto fluido.

Os resultados das características seminais do "pool" de sêmen fresco de 29 peixes não injetados (Grupo A) e de 6 machos injetados com HCG (gonadotropina coriônica humana) (Grupo B) encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1
Avaliação espermática do "pool" de sêmen fresco dos exemplares de curimbatá - *Prochilodus scrofa* - não injetados (Grupo A) e injetados com HCG (Grupo B) Rio Mogi Guaçu - Pirassununga - 1986

	Nº de peixes	Volume total de sêmen (ml)	Motilidade espermática subjetiva (%)	Coloração diferencial (% de vivos)	Nº total de espermatozoides por mm ³ (1)
Grupo A	29	9,0	90	90,72	32,25
Grupo B	6	9,5	90	89,17	19,52

(1) Os valores devem ser multiplicados por 10⁶.

Considerando-se os peixes injetados e aqueles não injetados, as concentrações de espermatozoides mostraram-se diferentes. Isto deve explicar o aspecto mais fluido do sêmen nos peixes injetados devido à ação hormonal (HCG).

Neste experimento verificou-se, para ambos os casos (A e B), motilidade espermática

estimada em 90% no sêmen fresco. Após vinte e quatro horas de congelamento, em amostras de sêmen descongelado observou-se, ao exame "in vitro" sob microscópio de contraste de fase, cerca de 35% de células viáveis. Estes resultados estão próximos dos valores de 45%, descritos por OTT & HORTON (1971), para a truta arco-íris.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. & ROMAGOSA, E. 1989 Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 16(1):29-36, jan/jun.

Os resultados das características seminais observados na TABELA 1 podem ser confrontados com os resultados encontrados na literatura especializada (TABELA 2).

TABELA 2
Características do sêmen de peixes de água doce

Espécies	Motilidade espermática subjetiva (%)	Coloração diferencial (%) de vivos	Nº total de espermatozoides por mm ³ (1)	Referências
Goldfish <i>Carassius auratus</i>	—	97,01	—	FRIBOURGH (1966)
Bagre <i>Rhamdia hilarii</i> — injetados	72,00	76,09	55,80	FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARA- HARA (1981; 1985)
<i>Rhamdia hilarii</i> — não injetados	81,90	86,43	63,53	KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986)
Truta arco-íris <i>Salmo irideus</i>	69,80	72,30	17,22	KAVAMOTO et alii (1985)
Curimbatá <i>Prochilodus</i> <i>scrofa</i>	84,40	89,13	34,19	KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA & GODI- NHO (1986)
Curimbatá <i>Prochilodus</i> <i>scrofa</i> (reprodução induzida)	88,13	87,82	32,87	GODINHO et alii (1988)

(1) Os valores devem ser multiplicados por 10⁶.

FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA (1981), em nota preliminar, publicaram o resultado de 30% de formas viáveis pós-congelamento do sêmen do bagre *Rhamdia hilarii*, em gelo seco (-79°C), confirmando esses resultados após 36 meses de congelamento (FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO & NARAHARA, 1985).

Os resultados do 2º e 3º testes de fertilização com sêmen congelado e sêmen fresco, considerando-se o tempo de criopreservação e o volume de sêmen, estão expostos na TABELA 3. Verifica-se que não existe diferença estatística significativa ao nível de 5% entre as

porcentagens de fertilização com sêmen congelado e com sêmen fresco.

Embora a maioria dos trabalhos relativos a criopreservação de sêmen de peixes só estabeleça estimativas do exame "in vitro" de formas viáveis, TRUSCOTT et alii (1968) afirmaram que o verdadeiro teste de viabilidade dos espermatozoides seria através de sua capacidade de fertilização. FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984) apresentaram os primeiros resultados no Brasil, obtidos em termos de fertilização com o sêmen da truta arco-íris após congelamento em gelo seco (-79°C) e criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) (taxa média de fertilização = 10,55%).

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. & ROMAGOSA, E. 1989 Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 16(1):29-36, jan./jun.

TABELA 3

Porcentagem de fertilidade do sêmen congelado de Curimatá, *Prochilodus scrofa*, e respectivas taxas de eclosão – Laboratório de Biologia de Peixes Fluviais “Dr. Pedro de Azevedo” – Pirassununga – 1987/88

Teste	Idade da Fêmea	Tratamento (Tipo de Sêmen)	Volume de Sêmen (ml)	Nº de Óvulos Incubados	Nº de Ovos Embrionados	Taxa de Fertilização (%)	Taxa de Eclosão (%)	Nº de Larvas
2º	4	a	0,8	154	123	79,87	60,16	74
			0,8	96	76	79,17	51,32	39
			0,8	116	87	75,00	52,87	46
			$\bar{x}$ 0,8	122	95	78,01	54,78	53
		b	0,2	98	89	90,82	70,79	63
			0,4	287	282	98,26	91,49	258
			0,4	280	277	98,93	90,61	251
			0,4	291	240	82,47	77,08	185
3º	4	a	0,4	315	279	88,57	76,34	213
			0,4	289	275	95,16	85,82	236
			$\bar{x}$ 0,4	292	271	92,68	84,27	229
		b	0,1	322	316	98,14	92,41	292
			$\chi^2 = 0,16$					
			$\chi^2_{5\%} = 3,84$ (1 GL)					

$\bar{x}$ = média aritmética

a = sêmen descongelado

b = sêmen fresco (controle)

Para o 4º teste, realizado como rotina da reprodução induzida, 60000 óvulos recém-coletados foram fertilizados com 10 ml de sêmen diluído, descongelado, de machos injetados, enquanto outros 40.000 óvulos receberam sêmen fresco. Nas mesmas condições de manejo, os primeiros apresentaram 60% de fertilização e 26,40% de eclosão, enquanto que no segundo, o resultado não foi satisfatório.

As variações nas taxas de fertilização e eclosão encontradas, devem-se ao fato de serem utilizados óvulos de diferentes fêmeas.

Comparando-se os resultados médios de 87,67% de fertilização encontrados nestes trabalhos aos de GRAYBILL & HORTON (1969) e de FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984), que conseguiram, respectivamente, 18% e 10,55%,

para a truta arco-íris, pode-se considerar que os valores para *Prochilodus scrofa* foram bastante satisfatórios.

Os valores obtidos estão próximos dos resultados de STEIN & BAYRLE (1978); LEGENDRE & BILLARD (1980) e STOSS & HOLTZ (1981 a,b) que conseguiram 81,90%, 90,00%, 87,10%, respectivamente, de taxa de fertilização para truta arco-íris.

SCOTT & BAYNES (1980) afirmaram que pequena quantidade de sêmen fresco de boa qualidade é suficiente para alcançar alta taxa de fertilização, porém ressaltaram a importância de pesquisa no sentido de esclarecer qual o volume de sêmen descongelado necessário para um dado número de óvulos, para se obter uma boa fertilização.

4. CONCLUSÕES

Os altos valores médios da taxa de fertilização e de produção de larvas obtidos neste trabalho comprovam que o uso de sêmen criopreservado do curimatã, *Prochilodus scrofa*, poderá contribuir para o melhoramento genético

das suas linhagens, aumentando a produtividade em aquicultura.

Já é viável a instalação de um "banco" de sêmen nas centrais de incubação para ser usado quando e onde for necessário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração dos pesquisadores Marcos Antonio Cestaroli, Dulce Maria Antoniutti, Henrique Arruda Soares, aos

funcionários Jairo Felício, Hélio Sanches Mariscal, Antonio Aparecido Bueno de Souza e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOM, E. 1950 A one -minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility*, New York, 1(2):176-7.
- BÜYÜKHATİPOĞLU, S. & HOLTZ, W. 1978 Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*, Amsterdam, 14(1):49-56.
- COSER, A. M. L. & GODINHO, H. P. 1988 Capacidade de fertilização de ovócitos e sêmen de curimatã-pacu (*Prochilodus marginatus*) em condições experimentais. In: Resumos do 5º Encontro Anual de Aquicultura de M. G., ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA, Brasília, julho de 1988.
- COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P. & RIBEIRO, P. 1984 Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 37:387-90.
- COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P. & TORQUATO, V. C. 1988 Observações preliminares em sêmen congelado de piauí (*Leporinus silvestris*). In: Resumos do 5º Encontro Anual de Aquicultura de M. G., ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA, Brasília, julho - 1988.
- FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. M. & NARAHARA, M. Y. 1984 The size composition of the eggs of curimatã, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture*, Amsterdam, 42:(1984) 37-41.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T. & NARAHARA, M. Y. 1981 Avaliação qualitativa e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 33º Salvador, 1981. Resumo . . . Salvador, SBPC. p. 620.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T. & NARAHARA, M. Y. 1985 Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). *B. Inst. Pesca*, S.P., 12(4):7-11.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; PENTEADO L. A. & CARVALHO FILHO, A. C. 1984 Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no Brasil. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 11(único):131-36, dez.
- FRIBOURGH, J. H. 1966 The application of differential staining method of low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *The progressive fish culturist*, 28(4):227-31.
- GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLI, M. A.; RANZANI, M. J. T.; NARAHARA, M. Y.; SERRALHEIRO, P. C. S.; LEITE, R. G.; ANDRADE, E. F. de & GODINHO, C. 1988 Estudos morfológicos e reprodução induzida do curimatã, *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881, mantido em condições de cultivo experimental - In: ANAIS do VI Simpósio Latino Americano de Aquicultura e V Simpósio Brasileiro de Aquicultura, Florianópolis.
- GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; CESTAROLI, M. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PAIVA, P. de &

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. & ROMAGOSA, E. 1989 Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 16(1):29-36, jan./jun.

- SERRALHEIRO, P. C. S. 1986 Characteristics of spawners of curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, for induced spawning. Anais do 1st Inter American Congress of Aquaculture, Salvador, Bahia.
- GOLDSTEIN, A. 1965 *Biostatistics: an introductory text*. 2 ed. Nova York, Mac Millan, 272 p.
- GRAYBILL, J. R. & HORTON, H. F. 1969 Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryopreserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa, 26(5):1400-5, May.
- KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; ROGOLINO, M. G. & CARVALHO FILHO, A. C. 1985 Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 12(3):73-81, out.
- KAVAMOTO, E. T. & FOGLI DA SILVEIRA, W. 1986 Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) in field conditions. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 13(1):95-100.
- KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. & GODINHO, H. M. 1986 Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881. *B. Inst. Pesca*, S.P., 13(2):45-50.
- LEITE, R. G.; VERANI, J. R.; BASILE-MARTINS, M. A.; GODINHO, H. M.; FENERICH-VERANI, N. & CESTAROLLI, M. A. 1984 Estudos biométricos do curimatá, *Prochilodus scrofa*, em experimento de cultivo com suplementação alimentar (II) crescimento. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUACULTURA, 3, Anais.... São Carlos, SP. p. 345-365.
- LEGENDRE, M. & BILLARD, R. 1980 Cryoconservation du sperm de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bull. Fr. Pisc.*, Paris, 53(278):11-33, juil-sept.
- MOCZARSKI, M. 1976 Cryobiological factors in grass carp preservation. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin.* 8th. 1976 Val. 4 pp. 1030-33.
- OTT, A. G. & HORTON, H. F. 1971 Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryopreserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.* Ottawa, 28(12):1915-18, Dec.
- SALISBURY, G. W. & VANDEMARK, N. L. 1964 *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos*. Trad. D. José María Santiago Luque. Zaragoza Acribia, 707 p. Original Inglés.
- SCOTT, A. P. & BAYNES, S. M. 1980 A review of the biology handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish. Biol.*, 17:707-39.
- STEIN, H. & BAYRLE, H. 1978 Cryopreservation of the sperm of some fresh water teleosts. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4):1073-76 (Inst. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21) (Sept. 1977).
- STOSS, J.; BÜYÜKHATİPOĞLU & HOLTZ, W. 1978 Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18(4):1077-82. (Inst. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21) (Sept., 1977).
- STOSS, J. & HOLTZ, W. 1981a Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, Amsterdam, 22(1-2):97-104.
- STOSS, J. & HOLTZ, W. 1981b Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. *Aquaculture*, Amsterdam, 25(2-3):217-22, Aug.
- TRUSCOTT, B.; IDLER, D. R.; HOYLE, R. J. & FREEMAN, H. C. 1968 Sub-zero preservation of Atlantic Salmon sperm. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 25:363-372.