

**MISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PEIXES CONTINENTAIS
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio**

**FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL E QUALIDADE DOS GAMETAS DA PIRACANJUBA
Brycon orbignyanus E PIABANHA *Brycon insignis*.**

**Bolsista: Daniela José de Oliveira
Orientador: Dr. José Augusto Senhorini**

**PIRASSUNUNGA-SP
JULHO/2011**

RESUMO

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em megadiversidade, porém são grandes os problemas enfrentados para conservação e manutenção das espécies. O presente estudo tem como objetivo avaliar a qualidade dos gametas e fertilização artificial da piracanjuba *Brycon orbignyianus* de ocorrência ampla na Bacia do Prata e da piabanha *Brycon insignis*, endêmica da Bacia do rio Paraíba do Sul, como subsídios para programas de reintrodução das espécies em ambiente natural e formação de bancos genéticos “ex situ”. O trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA – ICMBio. De cada exemplar foi analisado o seu peso, volume de sêmen liberado, a partir de cada amostra foram avaliados concentração espermática espermatócrito na câmara de Neubauer e na lâmina de K-cell, motilidade, alterações morfológicas após coloração com Giemsa e viabilidade espermática através de coloração de eosina e nigrosina. Para a avaliação da fertilização artificial foi avaliado a taxa de eclosão da espécie. A piabanha *Brycon insignis* não atingiu a primeira maturação sexual em cativeiro, o que não nos permite ainda uma conclusão sobre seu desempenho reprodutivo. As espécimes de piracanjuba *Brycon orbignyianus* destinados ao banco genético do CEPTA/ICMBio, possuem gametas viáveis, permitindo a criação de juvenis, subsidiando assim a programas de conservação da espécie.

Abstract

Brazil is one of the richest countries in the world megabiodiversity, but the problems are great for maintenance and conservation of the species. This study aims to evaluate the quality of sperm and artificial reproduction of *Brycon orbignyanus* and *Brycon insignis* such as subsidies to the species reintroduction programs in the natural environment, and formation of gene banks “ex situ”. The study was conducted at the Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA – ICMBio. Of each specimen was analyzed and the weight and volume of semen released from each sample were assessed by sperm concentration Neubauer chamber and blade of K-cell, sperm concentration through the spermatocrit, percentage of motility, duration of sperm motility morphological changes after staining with giemsa and sperm viability by eosin staining and nigrosin. For the evaluation of fertilization rates were evaluated on the hatching of the species. The piabanha *Brycon insignis* not reached sexual maturity in captivity, we do not yet allow a conclusion about their reproductive performance. The findings of this study show that the specimens of *Brycon orbignyanus* for the gene bank of CEPTA / ICMBio, have viable gametes, allowing the creation of juveniles. These results will enable us to further analyze inbreeding and possible reintroduction into the natural environment, supporting the maintenance and conservation of this species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplar de <i>Brycon orbignyana</i> (Valenciennes, 1849)	7
Figura 2.	Exemplar de piabanha <i>Brycon insignis</i> (Steindachner em 1876) endêmica da Bacia do Rio Paraíba do Sul	8
Figura 3.	Foto da coleta de sêmen de <i>Brycon orbignyana</i> .	12
Figura 4.	Foto mostrando procedimento de avaliação de motilidade.	13
Figura 5.	Material preparado para análise: A) Esfregaços de sêmen corados com Nigrosina e Eosina para verificação vitalidade; B) Esfregaço de sêmen para análise morfológica; C) Capilar com sêmen para realização de espermátocrito.	14
Figura 6.	Lâmina K-cell usada para contagem de sedimentos urinários.	16
Figura 7.	Extrusão de ovócitos de piracanjuba <i>Brycon orbignyana</i> induzida hormonalmente.	17
Figura 8.	Fertilização de <i>Brycon orbignyana</i> .	18
Figura 9.	À esquerda: <i>Brycon insignis</i> com vísceras e gônada imatura em destaque; à direita foto somente da gônada imatura.	19
Figura 10	Foto de gônada imatura com 0,92gramas.	19
Figura 11	Esfregaço de espermatozóides de <i>Brycon orbignyana</i> corados com Giemsa para avaliação de morfologia.	21
Figura 12	Esfregaço de espermatozóides de piracanjuba <i>Brycon orbignyana</i> coradas com Nigrosina e Eosina para aferição de espermatozóides vivos e mortos. As setas indicam espermatozóides vivos.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características seminais de <i>Brycon orbignyana</i> _____	20
-----------	--	----

SIGLAS

CESP

Companhia Energética de São Paulo

IGS

Índice Gonadossomático

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
SIGLAS	5
SUMÁRIO	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E METODOS	11
3. RESULTADOS	18
3.1. Piabanha <i>Brycon insignis</i>	18
3.2. Piracanjuba <i>Brycon orbignyana</i>	20
3.2.1. Características seminais	20
3.2.2. Morfologia e Viabilidade de espermatozoides de <i>Brycon orbignyana</i>	22
3.2.3. Reprodução Artificial	22
4. DISCUSSÃO	22
5. AGRADECIMENTOS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

O Brasil abriga a biota mais diversa entre os 17 países megadiversos do planeta (LEWINSOHN e PRADO, 2002), os peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados. Froese e Pauly (2003) determinaram que há um total de espécies de 3.148 peixes, incluindo espécies marinhas 885 e mais de 2.100 espécies de água doce (BUCKUP e MENEZES, 2003), que representa quase 21 % de todas as espécies de peixes do mundo e uma grande parte 8.000 milhares são espécies encontradas na América do Sul (REIS et al., 2003).

Fatores como a destruição das matas ciliares, aumento da demanda alimentar, pesca predatória, construção de barragens de hidroelétricas e a poluição dos ecossistemas aquáticos interferem no comportamento migratório dos peixes, ocasionando o desaparecimento de algumas espécies e a diminuição de populações de espécies de importância econômica e ecológica (NINHAUS-SILVEIRA, 2007). Dentre as espécies denominadas de grandes migradores, o gênero *Brycon* é o mais representado no **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção** (MMA, 2008) com seis espécies, sendo que a piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Figura 1) e piabanha *Brycon insignis* (Figura 2) estão entre elas. Estas espécies possuem hábito alimentar omnívoro/frugívoros e são sensíveis as ações antrópicas.



Figura 1 – Exemplar de *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849)



Figura 2 – Exemplar de piabanha *Brycon insignis* (Steindachner em 1876) endêmica da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Fonte: Tatiana Mira.

As espécies possuem a seguinte divisão taxonômica:

Classe: Osteichthyes
Subclasse: Actinopterygii
Infraclasse: Teleostei
Superordem: Ostariophysi
Ordem: Characiformes
Família: Characidae
Subfamília: Bryconinae
Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon orbignyanus*

Espécie: *Brycon insignis*

Piabanha é espécie de peixe de água doce classificada como *Brycon insignis* por Steindachner em 1876 (FOWLER, 1950). O período reprodutivo da espécie estende-se de dezembro a fevereiro. O macho está apto a reproduzir-se no segundo ano de vida, quando alcança cerca de 20 cm de comprimento e a fêmea, a partir do terceiro ano de vida, após atingir 25 cm de comprimento total (SALGADO et al., 1997). Quanto aos hábitos alimentares

é tida como principalmente ictiófaga e carnívora (insetívora) na fase juvenil, enquanto na fase adulta é principalmente herbívora e frugívora (MAGALHÃES, 1931; GIRARDI et al., 1993).

A sobrevivência dessa espécie encontra-se ameaçada pela poluição do Rio Paraíba através do lançamento de esgoto doméstico, industrial e agropecuário, como também pela introdução do dourado (*Salminus maxillosus* atualmente de *Salminus brasilienses*) (SALGADO et al., 1997), um voraz predador. Estes fatores associados à construção de sucessivas usinas hidrelétricas alteram a dinâmica do rio e seus tributários, impedindo que as espécies reofílicas realizem migração reprodutiva comprometendo seriamente a perpetuação dessa espécie (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001), e outras espécies.

Já a piracanjuba *Brycon orbignyanus* é nativa das bacias formadas pelos Rios Uruguai e Paraná (CAVALCANTI, 1998). É encontrada em locais de águas claras, onde as árvores se deitam sobre o rio assim facilitando a obtenção de alimento (VAZ et al., 2000). Geralmente em ambiente natural o macho atinge a maturidade sexual aos dois anos de idade, quando atingem 20 cm e apresentam neste período dimorfismo sexual (nadadeira anal áspera). As fêmeas atingem a maturidade com cerca de três anos e 25 cm de comprimento total (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003), sua desova é sazonal com pico, a fecundação é externa e não cuidam da prole. As principais causas de seu desaparecimento são: barragens ao longo da bacia (CECÍLIO et al., 1997), enorme consumo de água (GODOY, 1975; SENHORINI, 1999) eliminação da mata ciliar (CONTE et al., 1995; RODRIGUES, 2001), introdução de espécies exóticas (TAYLOR et al. 1984; WELCOMME, 1998; NEVILLE e MURPHY, 2001; CAMBRAY, 2003; NILSSON et al. 2005; MOURA-BRITTO e PATROCÍNIO, 2005), sensibilidade a mudanças dinâmicas da água (CONTE et al., 1995; CECÍLIO e AGOSTINHO, 1997), hibridação (PONZETTO et al. 2009), pesca (GODOY, 1975; CONTE et al., 1995) e repovoamento inadequado (LOPERA-BARREIRO 2005; SONSTEBO et al., 2007; POVH, 2007).

A manutenção da fauna e da flora em seu habitat natural é denominada de conservação *in situ*. Essa é incontestavelmente a melhor estratégia para a preservação da diversidade biológica, pelo fato de permitir a continuação dos processos evolucionários naturais. Existem varias espécies que ainda não foram nomeadas, nem descritas, em varias partes do mundo, inclusive no Brasil. Somente a conservação *in situ* permitira que se conhecesse mais dessas espécies para que seja possível desenvolver estratégias de conservação para elas (PRIMACK; RODRIGUES, 2002). A conservação *ex situ* é uma alternativa para a preservação de banco genético (DEGREEF et al. 2002), uma forma de escape à ameaça de extinção pela perda de habitat (POMPELLI & GUERRA 2004), sendo assim destinada a conservação de espécies de ambientes degradados.

Os peixes reofilicos em sua maioria não se reproduzem naturalmente em cativeiro, sendo necessária a indução a desova através do uso de hormônios hipotalâmicos e gonadotróficos (NINHAUS-SILVEIRA, 2007). Muito embora exista tecnologia de propagação artificial para diferentes espécies nativas e esta tecnologia vem sendo relativamente desenvolvida no Brasil. A concentração de estudos foca espécies com potencial para aquicultura, sendo escassas pesquisas voltadas para “conservação”. A qualidade dos gametas e os métodos de fertilização artificial veem sendo avaliados por parâmetros que influenciam diretamente nas taxas de fertilização, como a duração da motilidade espermática, relação espermatozóide: ovócito (BOMBARDELLI et al. 2006). Esses parâmetros quando empregados corretamente melhoram as taxas de fertilização e contribuem diretamente em programas de conservação da biodiversidade genética por meio do fornecimento de informações básicas e necessárias em programas de criopreservação. Estas variações podem ser ocasionadas devido à variabilidade genética, sazonalidade ou ainda pelo tipo de técnica utilizada para se coletar o sêmen (RANA, 1995). Um aspecto importante na rotina de reprodução em qualquer espécie animal é a avaliação das características seminais (SILVEIRA

et al., 1987). Para descrição seminal são analisadas características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e ainda as características morfológicas dos espermatozoides (FONSECA et al., 1992) e de sobrevivência.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a qualidade dos gametas e reprodução artificial da piracanjuba *Brycon orbignyanus* de ocorrência ampla nas Bacias Paraná e Uruguai e da piabanha *Brycon insignis*, endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul, como subsídios para programas de reintrodução das espécies em ambiente natural e formação de bancos genéticos “ex situ”.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA – ICMBio localizado a 21°55'48" latitude sul 47°22'28,1" longitude oeste.

Foram utilizados 16 reprodutores F1, 12 ♂ e 3 ♀ de piracanjuba e 1 ♀ de piabanha, mantidos em cativeiro no CEPTA. A piracanjuba é oriunda de reprodução realizada de 10 casais selvagens na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da CESP de Jupia - SP. A piabanha é originária de cruzamento de espécimes também selvagens realizados na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da CESP de Paraibuna - SP. Os peixes foram selecionados, levados para o laboratório de reprodução e submetidos ao processo reprodutivo conforme Ceccarelli e colaboradores (2005), entretanto os machos já estavam espermiando sobre leve pressão e não foram induzidos hormonalmente.

Para cada indivíduo analisou-se o peso e o volume de sêmen liberado (Figura 3) e de cada amostra foram avaliadas: a concentração espermática, alterações morfológicas, viabilidade espermática, porcentual de motilidade e o tempo de duração da motilidade espermática conforme descritos em Wirtz & Steinmam (Figura 4 e 5).

Coleta de sêmen

Para a coleta de sêmen cada peixe foi envolvido por toalha seca, que também auxiliava em sua contenção. Neste momento o corpo do peixe e sua papila genital foram secos para evitar possível contato com água. O peixe foi massageado levemente na parede celômica no sentido crânio-caudal. A amostra seminal de cada espécime foi coletada em um tubo falcom graduado com capacidade de 15 ml e registrado o seu volume. Imediatamente após a coleta,

fizeram-se testes para avaliar inatividade dos espermatozoides. Em caso de estarem ativados na coleta, identificada pela presença de motilidade espermática, este sêmen seria descartado.



Figura 3 – Foto da coleta de sêmen de *Brycon orbignyanus*.

Motilidade espermática e tempo de ativação

Para determinar a motilidade dos espermatozoides, foi colocada em uma lâmina de microscopia 10 μ l de sêmen fresco e misturado juntamente com 10 μ l de água (solução ativadora) proveniente do sistema de incubação. A solução foi rapidamente homogeneizada e observada em microscópio óptico comum. O tempo e a porcentagem da motilidade dos espermatozoides foram registrados. O tempo de motilidade foi considerado desde a ativação até o momento em que as células espermáticas cessavam os movimentos, medida com auxílio de um cronômetro. A análise da porcentagem de motilidade dos espermatozoides baseou-se

na estimativa da porcentagem de células móveis no campo focalizado, utilizando uma escala arbitrária de 0 a 100%.

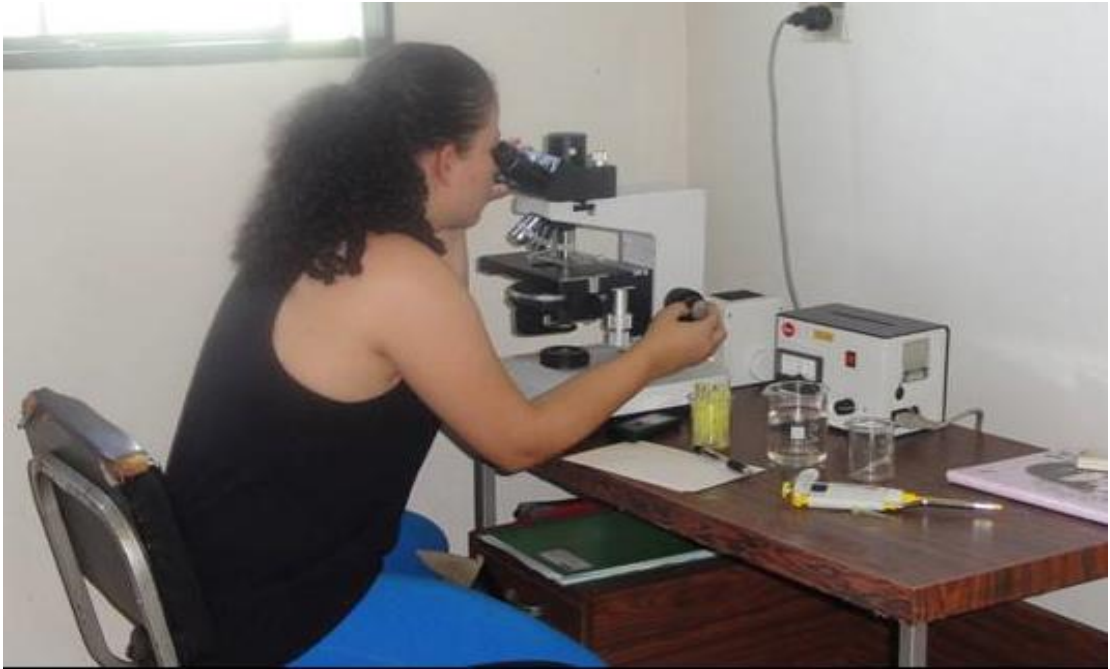


Figura 4 – Foto mostrando procedimento de avaliação de motilidade.

Viabilidade

Para a determinação da viabilidade (porcentagem de espermatozóides vivos e mortos), 10 μ l de sêmen foi misturado com 10 μ l de Eosina e 10 μ l Nigrosina e realizado um esfregaço. Em microscópio com utilização de óleo de imersão registrou-se a porcentagem de espermatozóides vivos (translúcidos) e a porcentagem de espermatozóides mortos (corados) através da contagem de 200 células, tendo-se por base a classificação de células espermáticas íntegras e células espermáticas danificadas.

Morfologia

Para análise histológica dos espermatozoides foram feitos esfregaços de sêmen e fixados em metanol por 10 minutos, corados com Giemsa e analisados em microscópio óptico.

Espermatócrito

O espermatócrito foi determinado a partir das amostras não diluídas. Alíquotas de sêmen foram coletadas em tubos capilares de 75 mm e analisadas em micro-centrífuga portátil equipada com um rotor de tubos capilares, durante 15 minutos, sendo o resultado expresso em percentagem de volume ocupado pelo precipitado em relação ao volume total.

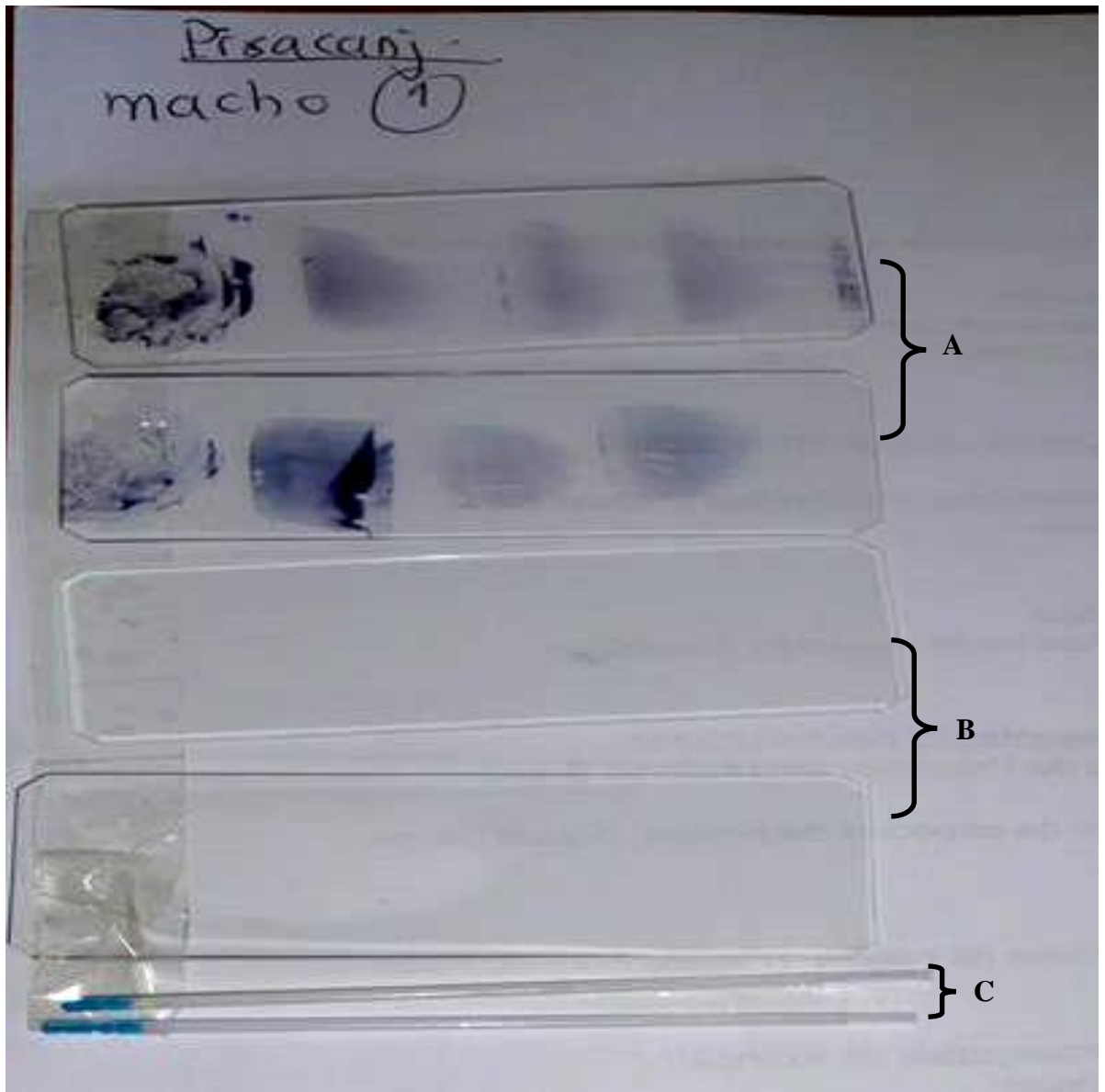


Figura 5 – Material preparado para análise: A) Esfregaços de sêmen corados com Nigrosina e Eosina para verificação de índice de sobrevivência; B) Esfregaços de sêmen para análises morfológicas; C) Capilar com sêmen para realização de espermócrito.

Concentração espermática

Além do uso da câmara de Neubauer para aferição da concentração de espermatozoides também foi usada a lâmina de K-cell (Figura 6) utilizada para contagem de sedimentos urinários como novo método de contagem de espermatozoides. Dentro de cada câmara há duas séries de nove círculos cada, totalizando 18 círculos facilmente visíveis em uma

amplificação de 40x ao microscópio. Estes círculos marcam um volume preciso e assim permitem o cálculo do número de elementos presentes em 1µl, através de um procedimento simples.

Para o cálculo de concentração o sêmen foi diluído em uma proporção final de 1:8000 (sêmen: água destilada), tanto para câmara de Neubauer como para K-cell.

O cálculo de concentração na lâmina de K-cell foi realizado com a seguinte equação:

$$\sum 9 \text{ círculos} \times 10.000 = \text{sp/ml}$$

A fórmula utilizada para o cálculo do número de espermatozoides na câmara de Neubauer foi:

~~Cálculo~~

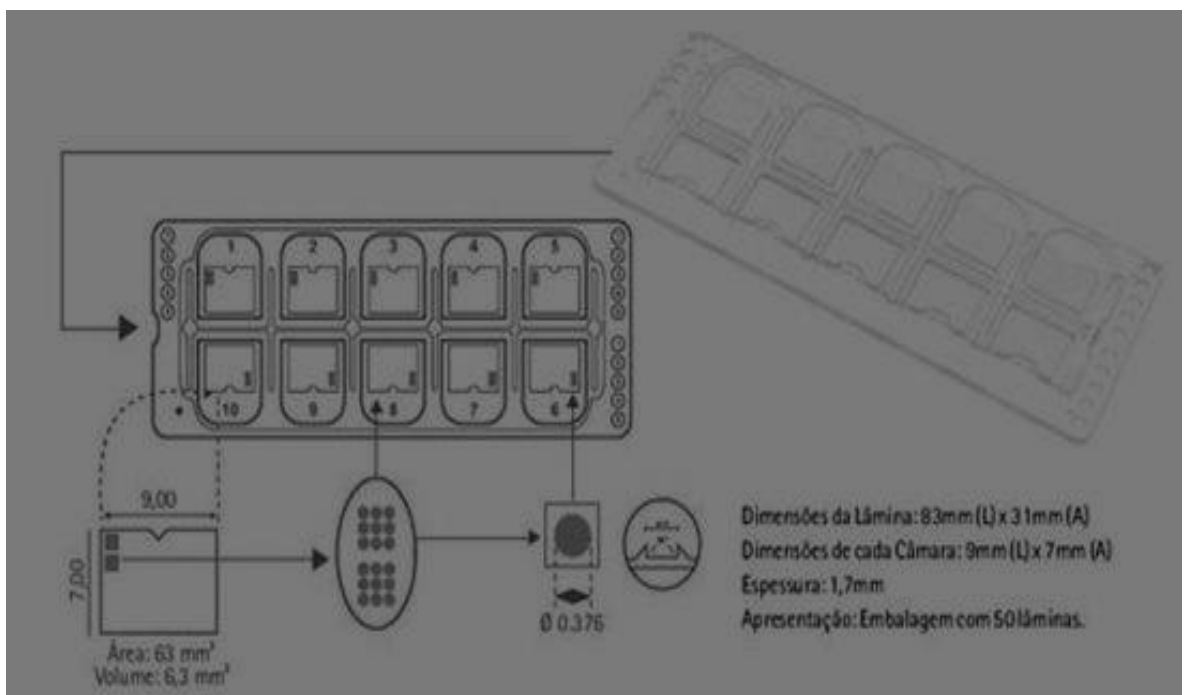


Figura 6 - Lâmina de K-cell usada para contagem de sedimentos urinários.

Reprodução artificial

Capturados os peixes a pré-seleção foi realizada no próprio viveiro, com base nas características extragenitais presentes no período reprodutivo. Os machos maduros pressionados levemente na cavidade celômica deixaram fluir o líquido espermático de aspecto branco leitoso e considerável viscosidade e, além disso, a piracanjuba apresenta dimorfismo sexual, pois os machos apresentam a nadadeira anal áspera, próximo ao período de desova.

Após a separação dos reprodutores por sexo e em macas de tecido de algodão suave, os mesmos foram transportados em sacos plásticos, com suplementação de aeração ou oxigenação, para o laboratório de reprodução. Durante esse transporte foi evitado ao máximo estresse aos peixes e exposição à luz solar.

As fêmeas foram injetadas com hormônio ovopel na dosagem de 0,5 mg/kg primeira dose e 5,0 mg/kg após 12 horas.

Após extrusão dos ovócitos feitos individualmente de cada fêmea em recipientes plásticos (Figura 7), estes foram pesados para estimativa do peso de ovócitos produzido, após isso foi realizado a fertilização dos ovócitos (Figura 8) e 16 horas após a eclosão foi estimado a porcentagem total de larvas eclodidas (SANCHES, 2009; JEZIERSKA et al., 2000). As larvas foram criadas por um período de 21 dias, até a fase de juvenil, objetivando obter dados sobre a taxa de sobrevivência e crescimento final, segundo Senhorini e colaboradores (2002).



Figura 7 – Extrusão de ovócitos de piracanjuba *Brycon orbignyanus* induzidas hormonalmente.



Figura 8 - Fertilização de *Brycon orbignyanus*.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à estatística descritiva e expressados como $\text{meia} \pm \text{desvio padrão de erros}$. Para comparar a concentração obtida na câmara de Neubauer vs. K-cell, os resultados foram submetidos à ANOVA, com previa validação da normalidade dos dados e homogeneidade da variância, seguido de um teste de comparação de Tukey-Kramer, com um nível de significância de $p < 0.05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad InStat*® (Version 3.06).

3. RESULTADOS

3.1. Piabanha *Brycon insignis*

Os exemplares de piabanha *Brycon insignis* foram avaliados no dia 27 de dezembro de 2010 e não apresentavam papila dilatada, nem vertência de sêmen sob pressão ventral. Por este motivo foi sacrificado um exemplar com superdosagem de benzocaína conforme método utilizado por Mojica (2004), para analisar o estado de maturação aparente de suas gônadas (Figura 9), onde foi possível constatar que era uma fêmea imatura. A fêmea possuía peso de 240g e um comprimento total de 32,5 cm e suas gônadas de 0,92g (Figura 10). Apresentando um índice gonadossomático ($\text{IGS} = \text{peso da gônada} / \text{peso do peixe} \times 100$) de 0,38%.



Figura 9 - À esquerda: *Brycon insignis* com vísceras e ovário imaturo em destaque; à direita foto somente da gônada imatura.



Figura 10 - Foto de gônada imatura com 0,92 gramas.

3.2 Piracanjuba *Brycon orbignyana*

3.2.3. Características seminais

A tabela 1 apresenta os dados das características espermáticas da piracanjuba *Brycon orbignyana* coletados nos dias 10, 22 e 23 de dezembro de 2010.

Tabela 1 – Características espermáticas de *Brycon orbignyana*

	Media \pm Desvio Padrão	Máxima	Mínima
Peso (g)	765,0 \pm 31,8	900	600
Volume (ml)	5,43 \pm 0,73	11,5	2,5
Coloração	Esbranquiçado		
Aspecto	Leitoso		
Espermatocrito (%)	15,13 \pm 0,99	25,00	7,69
Motilidade (%)	78,03 \pm 2,84	95	40
Tempo de Ativação (s)	54,08 \pm 2,52	84	30
Milhões de espermatozoides/ml (Câmara de Neubauer)	18.311 \pm 3.338*	40.800	6.600
Milhões de espermatozoides/ml (Lâmina de K-cell)	16.311 \pm 3.020*	33.840	4.800

*Indica diferença não significativa ($p > 0.05$) entre os métodos de contagem de espermatozoides.

3.2.2. Morfologia e Viabilidade de espermatozoides de *Brycon orbignyana*

Através da coloração utilizada, foi possível avaliar a cabeça dos espermatozoides de *Brycon orbignyana* que se apresentavam arredondadas (Figura 11) e não foi possível observar os flagelos, pois não foram corados. Não apresentaram nenhuma alteração morfológica aparente.

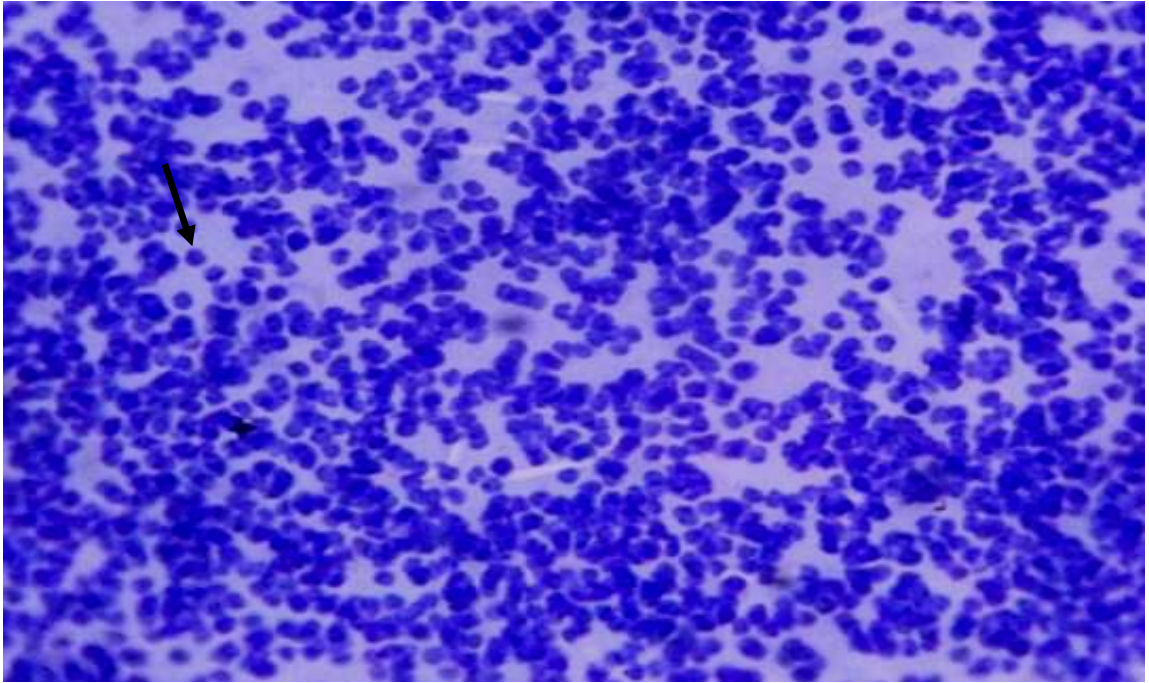


Figura 11 - Lamina de espermatozoides de *Brycon orbignyanus* corados do Giemsa para avaliação de morfologia.

As análises feitas para aferição de vivos e mortos apresentou 1% de espermatozoides mortos (n=2400 espermatozoides; 200 para cada macho).

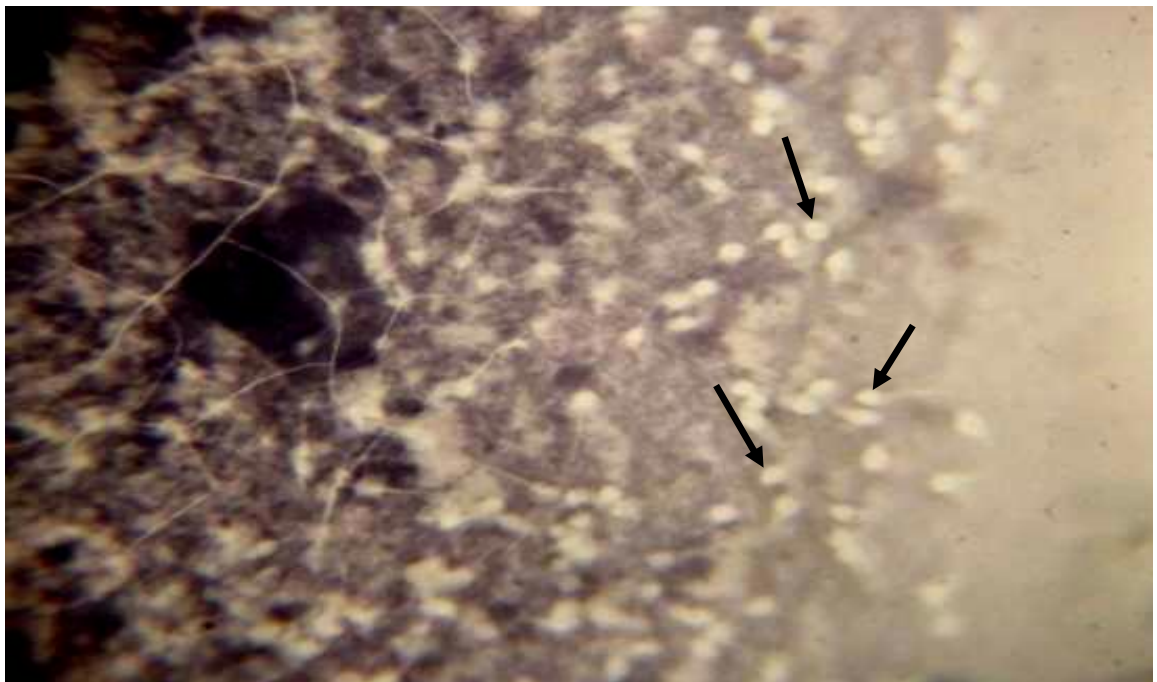


Figura 12 – Lamina de espermatozoides de piracanjuba *Brycon orbignyanus* coradas com Nigrosina e Eosina para aferição de espermatozoides vivos e mortos. As setas indicam espermatozoides vivos.

3.2.3. Reprodução Artificial

As fêmeas foram injetadas com hormônio ovopel na dosagem de 0,5 mg/kg na primeira dose e 5,0 mg/kg após 12 horas, respondendo após 180 horas-grau a uma temperatura de 29°C.

Os ovos recém extrusados apresentaram coloração verde oliva, que persistiu durante todo processo embrionário. Seu peso variou entre 78,5 g e 86 g. Os pólos animal e vegetal foram observados com 35 minutos e a eclosão da maioria das larvas ocorreu com 10 horas e 30 minutos de fertilização, sendo exibido o canibalismo na sua fase inicial com 36 horas de vida. Na desova das três fêmeas os resultados obtidos foram uma porcentagem de eclosão de 52% das larvas e após 21 dias a taxa de crescimento final foi de $54,4 \pm 4,0$ mm.

4. DISCUSSÃO

Vários são os fatores que influenciam no momento da primeira maturação sexual dos peixes, entre os quais podem-se citar as diferenças entre as espécies, idade e tamanho e as características individuais. Quanto a esse aspecto entende-se a migração como o espaço vital requerido pelas espécies durante seu ciclo de vida, especificamente as espécies tidas como grandes migradoras (AGOSTINHO et al., 2007)

As espécies do gênero *Brycon* são peixes reofílicos, portanto fazem anualmente migração ascendente ao curso do rio, durante a primavera para realizar a liberação de seus gametas entre os meses de novembro e fevereiro, quando ocorrem as chuvas, as cheias dos rios e as altas temperaturas do ano. A liberação dos gametas ocorrerá em dias favoráveis, quando acontece um sincronismo entre as condições endógenas do peixe e exógenas do meio ambiente (GODOY, 1975).

A piabanha *Brycon insignis* selecionada para indução não apresentava maturação reprodutiva, pois a manutenção de espécies reofílicas em cativeiro faz com que os peixes

permaneçam reclusos em ambientes lênticos, que não apresentam as condições do ambiente natural. Tal condição interfere bruscamente no processo de desenvolvimento gonadal, isso explica o retardo na maturação das gônadas da *Brycon insignis* mantida no CEPTA. Em condições normais a espécie se reproduz com cerca de 20 a 25 cm de comprimento total, Andrade-Talmelli (2001) conseguiu reproduzir exemplares com de 24 cm obtendo sucesso.

Carvalho e Urbinati (2005) estudaram o crescimento e o desenvolvimento gônadal de *Brycon cephalus* (atualmente *Brycon amazonicus*) onde encontraram um índice Gonadossomático (%) de $0,26 \pm 0,17$ em novembro $2,2 \pm 0,84$ em dezembro e $3,1 \pm 0,97$ em janeiro. Este índice é bem diferente ao encontrado neste trabalho para a *Brycon insignis* de 0,38% confirmando um baixo índice para o período reprodutivo.

Volume espermático

O volume de sêmen encontrado por Andrade-Talmelli e colaboradores (2001) para *Brycon insignis* variou de 4,41 a 4,96 ml, sendo inferior ao volume encontrado em *Brycon nattereri* ($7,6 \pm 1,1$ ml) por Oliveira e colaboradores (2007), porem ambos são superiores aos obtidos com *Rhamdia hilarii* (1,15 mL) (FOGLI DA SILVEIRA et al. 1985) e em *Prochilodus scrofa* 1,10 ml (KAVAMOTO et al., 1986), injetados com hCG. Os resultados encontrados por Mojica (2004) no estudo com sêmen de *Brycon orbignyanus* ($5,85 \pm 3,62$ ml) diferem dos resultados encontrados para a piracanjuba neste trabalho ($5,4 \pm 0,73$ ml) e ambos os animais não sofreram indução hormonal. Todavia, foi próximo aos coletados dos exemplares de *Piaractus mesopotamicus* (5,02 ml), que receberam aplicação de hormônio (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1990). Romagosa (1998) verificou que os machos de *Brycon amazonicus* produzem em média 7,0 ml de sêmen, após 4 horas de ação hormonal.

A injeção de hormônios indutores leva a um aumento do volume de sêmen liberado alterando conseqüentemente a concentração espermática. Isto deve explicar o aspecto mais fluido do sêmen nos peixes injetados (KAVAMOTO et al., 1989). Streit Jr. et al., (2006) observou que a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa não causou alterações significativas para os parâmetros qualitativos, motilidade progressiva, vigor espermático, tempo de vida, porcentagem de espermatozóides normais e para anormalidades leves e graves no sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), porém ficou constatada a incidência elevada de patologias graves em seu sêmen, especialmente, cauda enrolada, quebrada e corrugada. Neste trabalho não foi possível esta observação, uma vez que o método de coloração utilizado não corou o flagelo.

Motilidade espermática e tempo de ativação

A qualidade do sêmen geralmente é avaliada pela intensidade de motilidade, baseada na porcentagem de células espermáticas móveis observadas no campo microscópico, como descrito em KAVAMOTO et al. (1996). Atualmente, diversos pesquisadores realizam essa avaliação utilizando programas de computador (RAVINDER et al., 1997). A motilidade é o fator mais utilizado para avaliar a qualidade espermática entre as espécies, embora espermatozóides inférteis possam apresentar algum tipo de motilidade (BILLARD et al, 1995).

A qualidade do sêmen em termos de motilidade espermática é usualmente expressa pela porcentagem de espermatozóides móveis adequadamente ativados. Mojica em 2004 avaliou a motilidade de três espécies *Rhamdia quelen* ($91,6 \pm 4,08$ %), *Brycon hilarii* ($88,6 \pm 7,89$ %) e *Brycon orbignyanus* que apresentou menor valor de porcentagem de motilidade espermática ($77,0 \pm 6,74$ %). Entre as espécies avaliadas e comparadas com este estudo há uma grande

similaridade com os resultados obtidos para *Brycon orbignyianus* ($78 \pm 2,83\%$) e a piracanjuba em relação às duas outras espécies permanece com menor porcentagem. A motilidade espermática média do sêmen *in natura* de *Brycon orbignyianus* encontrada por Murgas et al (2004) foi de $94 \pm 5,48\%$. A duração da motilidade espermática em teleósteos de água doce é muito curta se comparada com espécies marinhas (LEGENDRE et al., 1996; COSSON et al., 1999. Quando o sêmen é diluído em água doce ou água destilada, a duração da motilidade é de aproximadamente 40 segundos. O período de motilidade é curto devido à incapacidade de a mitocôndria satisfazer a elevada demanda energética do flagelo (BILLARD, 1992)

Sanabria (2002), trabalhando com matrinxã *Brycon amazonicus*, reportou uma duração da motilidade média em torno de $75,18 \pm 29,66$ segundos, semelhante ao encontrado no trabalho realizado por Mojica (2004) ($76,3 \pm 23,93$ segundos), porém os resultados encontrados neste estudo também para a piracanjuba foi menor ($53,8 \pm 2,52$ segundos). Entretanto, Andrade-Talmelli e colaboradores (2001) observaram em piabanha, *Brycon insignis* valores ainda menores de motilidade espermática, aproximadamente de 40 segundos. Segundo Sant'anna (2009) algumas espécies migradoras podem ter baixa fecundidade por apresentarem valores de motilidade baixas como exemplo o dourado que apresenta motilidade de ± 35 segundos.

Os fatores mais importantes na determinação da ativação espermática são: pressão osmótica, composição iônica e o pH, sendo que a mudança na pressão osmótica é o fator que mais influencia a ativação dos espermatozoides (BILLARD et al, 1995), fatores estes que devem ser elucidados para a piracanjuba.

Concentração espermática

A produção espermática de peixes é muito alta, devido ao grande número de divisões espermatogoniais, entretanto, é difícil obter-se uma verdadeira análise quantitativa da espermatogênese em teleósteos, especialmente naqueles em que o testículo é lobular (BILLARD, 1990). Segundo Salisbury e Vandemark (1964), a determinação da concentração espermática é um dado fundamental na rotina da reprodução artificial, no sentido de se conhecer a quantidade de material fecundante. Porém, sêmen muito concentrado nem sempre oferece elevada motilidade ou altas taxas de fertilização (WILLIOTET et al., 2000).

A utilização da câmara de Neubauer, entretanto, apresenta alguns inconvenientes, como a necessidade de esperar a precipitação dos espermatozóides e a realização de altas diluições, o que pode incorrer em erros (TAITSON e GODINHO, 2003). Neste estudo os dados obtidos para concentração tanto através da câmara de Neubauer (18.311 ± 3.338 milhões de espermatozóides/ml) e a lâmina de K-cell (16.311 ± 3.020 milhões de espermatozóides/ml) foram superiores aos encontrados por Mojica (2004), $2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$ sp/ml.

Andrade-Talmelli et al. (2001) em pesquisas com sêmen de piabanha *Brycon insignis*, encontraram concentrações espermáticas entre 24,43 e 25,10 milhões de espermatozóides/ml durante de exames direto e objetivo de animais induzidos com hormônio. Navarro et al. (2004), obtiveram concentrações espermáticas médias na avaliação de sêmen de cachama branca (*Piaractus brachypomums*) de $17 \pm 1,8$ bilhões de espermatozóides/ml, o sêmen do tambaqui *Colossoma macropomum* apresentou concentração espermática media em torno de 35×10^9 espermatozóides por mililitro (MENEZES et al., 2008). Oliveira e colaboradores tiveram um resultado de concentração espermática média de $30,0 \times 10^9 \pm 5,6 \times 10^9$ espermatozóides/ml com trabalho realizado para *Brycon nattereri*. A concentração espermática de encontrada por Amaral (2009) para a piabanha foi de 28×10^9 espermatozóides /ml um resultado próximo ao encontrado por Shimoda et al. (2007), porém diverge do

resultado encontrado por Maria et al. (2006) quando a concentração de *Brycon orbignyianus* foi de $5,88 \times 10^9$ espermatozoides /ml.

Atualmente métodos alternativos têm sido empregados para análise da concentração espermática, como a contagem na câmara de Makler (TAITSON & GODINHO, 2003), o espermatócrito (RIBEIRO, 2003). A concentração espermática pode ser estimada em número de espermatozoide/ml de sêmen, número de espermatozoides/kg de peso corporal e número de espermatozoides/peixe. O número de espermatozoides por ml de sêmen é mais apropriado, podendo ser complementado pelo volume total de sêmen (MARIA et al, 2006).

Dados como estes demonstram que é de grande importância o conhecimento dos valores para que possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e com isso, aperfeiçoar o processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005). A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa e rotina de avaliação do sêmen de peixes de fecundação externa ou interna, para maximizar o aproveitamento do material fecundante e para se obter melhores resultados na fertilização (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1987).

Quando comparadas as concentrações entre a câmara de Neubauer (18.311 ± 3.338 milhões de espermatozoides/ml) com a Lâmina de K-cell (16.311 ± 3.020 milhões de espermatozoides/ml) através do teste de comparação de Tukey, estatisticamente não houve diferença significativa, podendo assim concluir que a Lamina de K-cell pode ser utilizada como método de contagem de espermatozoides, sem prejudicar os resultados e ainda facilitar o manuseio, pois são avaliadas 10 amostras por lamina e não necessita esperar precipitação dos espermatozoides, além de ter um baixo custo e fácil aquisição.

Os resultados obtidos tanto na câmara de Neubauer como na lâmina de K-cell confirmam que a concentração espermática nos peixes é bastante variável, principalmente entre as diferentes espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Isto é possível

devido à variação da estação do ano, clima, estágio de maturação sexual e ao método de coleta (FELIZARDO, 2008).

Morfologia

Segundo Nagahama (1983), os espermatozoides de peixes podem ser divididos morfologicamente em cabeça, peça intermediária e cauda. A falta de acrossoma na maioria dos peixes é compensada pela presença da micrópila no ovócito, facilitando assim a entrada do espermatozoide (COSSON et al., 1999).

neste trabalho a análise morfológica através de coloração de Giemsa foi possível observar apenas as cabeças dos espermatozoides redondas, não sendo possível analisar os flagelos que não foram corados. Através deste método de coloração não foi identificada nenhuma alteração morfológica. Aires (1998) descreve a cabeça dos espermatozoides como arredondadas e sem vesícula acrossomal assim como foram observadas neste trabalho.

Viabilidade Seminal

A técnica de viabilidade permite a análise de informações importantes, utilizado para avaliar a qualidade do sêmen, pois tem relação direta com a motilidade espermática (KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA, 1986). Neste trabalho foi observado uma alta viabilidade seminal semelhante ao encontrado em Sanches (2009) para o jundiá ($99,83 \pm 0,14$ %) e superior ao encontrados por Bombardelli et al. (2006), com 96% de espermatozoides vivos.

Reprodução Artificial

Os ovos recém extrusados apresentaram coloração verde oliva que persistiu durante todo processo embrionário. Dumont - Neto e colaboradores (1997) obtiveram a extrusão dos ovócitos de *Brycon orbignyianus* entre quatro e cinco horas após a hipofisação com temperatura média de 26,7°C. A coloração dos ovócitos em seu trabalho foi desde vinho a azul escuro.

Neste trabalho a piracanjuba teve uma taxa de eclosão de 52%, baixa, mas em comparação com trabalhos realizados com outros Bryconídeos foi maior, pois a taxa de eclosão média para pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus* foi de 40% (NAGAHARA, 2002), para *Brycon amazonicus* foi igual (40%) valor observado por Romagosa (1998) e bem próximo ao encontrado por Andrade-Talmelli (1997) para *Brycon insignis* (41,8%).

Diante disto, podemos concluir que as espécimes de piracanjuba *Brycon orbignyianus* destinados ao banco genético do CEPTA/ICMBio, possuem gametas viáveis, o que contribui para a formação de bons bancos genéticos da espécie e subsídios aos programas de conservação da espécie. A piabanha *Brycon insignis* neste estudo não atingiu a primeira maturação sexual em cativeiro, o que não nos permite uma conclusão sobre seu desempenho reprodutivo.

Em termos metodológicos para a concentração espermática as lâminas de K-cell mostraram-se tão eficientes quanto à câmara de Neubauer. Portanto, já que o primeiro método é mais fácil e mais barato que o segundo, para as análises futuras, recomenda-se a utilização do método de K-cell.

Quanto a variabilidade genética dos exemplares, estes apresentaram uma heterozigose baixa e um alto endocruzamento (ASHIKAGA et al., 2010), sendo que a perda de variabilidade pode aumentar a probabilidade de diminuição das populações.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Augusto Senhorini pela dedicação, paciência, carinho, amizade e por me incentivar sempre a seguir em frente.

A doutoranda Tatiana María Mira López pela grande ajuda e paciência na realização do trabalho.

As analistas ambientais Rita de Cássia G. A. Rocha e Carla N. M. Polaz pela amizade e auxílio sempre que necessitei.

A todo pessoal de campo e laboratório que colaboraram com o trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, CEPTA/ICMBio por me receber sempre de portas abertas e permitir este grande aprendizado.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa.

6. ETAPAS E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PLANO DE TRABALHO

Etapa 1 – Realização de levantamento bibliográfico (CONCLUÍDA).

Etapa 2 – Realização do experimento (indução hormonal, desova) (CONCLUÍDA)

Etapa 3 – Elaboração do primeiro relatório de acompanhamento da bolsista. (CONCLUÍDA)

Etapa 4 – Interpretação dos resultados. (CONCLUÍDA)

Etapa 5 – Elaboração do relatório final e encaminhamento do trabalho para publicação.
(CONCLUÍDA)

Etapa	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8	Mês 9	Mês 10	Mês 11	Mês 12
1	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆					
2				◆	◆	◆	◆					
3					◆	◆						
4						◆	◆	◆	◆	◆		
5											◆	◆

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Eduem, Maringá, 2007. 501p.

AIRES, E. D. **Características morfológicas e histofisiológicas da via espermática da Piracanjuba, *Brycon orbignyana* (Pisces: Teleostei)**. Tese (Doutorado em Anatomia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências – Botucatu - SP. 69p. 1998.

AMARAL, T. B. **Resfriamento e criopreservação de sêmen do peixe teleósteo piabanha *Brycon insignis***. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 61p. 2009.

ANDRADE-TALMELLI, E. F. **Indução reprodutiva e ontogenia inicial da piabanha, *Brycon insignis*, (Steindachner, 1876 (*Characiformes, Bryconinae*), mantida em confinamento – Vale do Paraíba, SP**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1997. 185p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, 1997.

ANDRADE-TALMELLI, EF., KAVAMOTO, EM. and FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Bol. Inst. Pesca**, vol. 27, no. 2, p. 149-154. 2001.

ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; SENHORINI, J. A; OLIVEIRA, C. e FORESTI, F. Análise genética de linhagens de *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) para fins de conservação. **Anais do XIX Encontro Brasileiro de Ictiologia**. 2011.

BILLARD, R. & COSSON. M.P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fishes. **Journal of Experimental Zoology** 261:122-131, 1992.

BILLARD, R. Artificial Insemination in Fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall' s Physiology of Reproduction**. 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, Chapter 9, p.870-887. 1990.

BILLARD, R., COSSON, J., CRIM, L.W., SUQUET, M. Sperm Physiology and Quality in: **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. Blackwell Science. 424 p, 1995.

BILLARD, R., COSSON, M.P., PERCHEC, G., LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture v.129** p.95-112, 1995.

BOMBARDELLI R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BUCKUP, P. A., MENEZES, N. A. & GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional' Rio de Janeiro. 2007. 195p.

CAMBRAY, J. A. The need for research and monitoring on the impacts of translocated sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*, in South Africa. **African Journal of Aquatic Science** 28' p. 191-195. 2003.

CAVALCANTI, C. A. **Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyana* Eigenmann, 1909) e aplicação da técnica de digestibilidade "in vitro"**. Florianópolis' Dissertação de Mestrado em Aqüicultura - Universidade Federal de Santa Catarina. 101p. 1998.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; REGO, R. F. Piracanjuba, *Brycon orbignyana* (Valenciennes, 1849). In' BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 1 ed. Santa Maria/RS' Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2005. p.121-147.

CECILIO, E. B.; AGOSTINHO, A. A.; JULIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S. Colonização ictiofaunística do reservatório de Itaipu e áreas adjacentes. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 14 n. 1. p. 1-14. 1997.

CONTE. L.; BOZANO, G. L. N.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba *Brycon orbignyana*, em gaiolas. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v. 8, p. 49-59, 1995. Único.

COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSSON, J., BILLARD, R., CIBERT, C., DRÉANNO, C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: **The Male Gamete**. Chapter 16:161-186, 1999.

DEGREEF, J.; ROCHA, O. J.; VANDERBORGHT, T.; BAUDOIN. J. P. Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of lima bean (Fabaceae): Considerations for in situ and ex situ conservation. **American Journal of Botany** **89 (10)**: 1644–1650. 2002.

DUMONT-NETO, R.; PELLI, A.; FREITAS, J. L.; COSTA, C. L.; FREITAS, A. E.; BARBOSA, N. D. C. Reprodução induzida da piracanjuba (*Brycon orbignyana*, Valenciennes, 1903), durante a primeira maturação sexual, cultivada em cativeiro, na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta Grande - CEMIG. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, n. especial, p.105-107, 1997.

FELIZARDO, V. O. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*brycon orbignyana*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) LAVRAS, MINAS GERAIS. 99p. 2008.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., RIGOLINO, M. G., TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.14, p.69-73, 1987.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 17(único), p. 1-3, 1990.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de “pellets” do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840), **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12, n.4, p.7-11, 1985.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G. et al. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.15, n.1, p.51-54, 1988.

FOWLER, H. W. **Os Peixes de Água Doce do Brasil**. Arquivos de Zoologia, São Paulo 1950. v. 6, p.333-340.

GIRARDI, L., C. A. DE FARIA E P. P. DO SANTOS. Reprodução induzida, larvicultura e alevinagem de piabanha (*Brycon insignis*) na Estação de Aqüicultura de Paraibuna DESP/SP. São Paulo, in: **Resumos do X Encontro Brasileiro de Ictiologia**. 1993.p. 92.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil' subordem Characoidei; bacia do Rio Mogi Guassu**. Ed. Franciscana, Piracicaba, 1975. v. 1, p. 1-216.

JEZIEWSKA, B.; LUGOWSKA, K.; WITESKA, M.; SARNOWSKI, P. Malformations of newly hatched common carp larvae. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries**, v.3, n.2. 2000.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas de sêmen do Bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **B. Inst. Pesca** 13(1):95-100, 1986.

KAVAMOTO, E. T., NARAHARA, M. Y., MAINDARES-PINTO, C. S. R., ANDRADE-TALMELLI, E. F., FERAZ, E. DE M. Efeito do hCG na produção de sêmen do curimatá (*Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881). **Revista Ceres** 43(245):76-85, 1996.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 16, n.1, p. 29-36, 1989.

LEGENDRE, M., LINHART, O., BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquat. Living Resour.**, v.9, p.59-80, 1996.

LEWINSOHN, T. M. & P. I. PRADO. **Biodiversidade brasileira' síntese do estado atual do conhecimento**. Editora Contexto, São Paulo. 176p. 2002.

LOPERA-BARRERO, N.M. **Diversidade genética de populações de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com a técnica de RAPD**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 45 p. 2005.

MAGALHÃES, A. C. **Monographia brasileira de peixes fluviaes**. São Paulo' Graphicans. 1931. 260p.

MARIA, A.; VIVEIROS, A.T.M.; FREITAS, R.; OLIVEIRA, A. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v.260, p.298-306, 2006.

MENEZES, J. T. B., QUEIROZ, L. J.; COSTA, D. C. R. E MENEZES, J. R. J. B. Avaliação espermática pos-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), **Acta Amaz.**v.38 n2 Manaus. 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção**. Ângelo Barbosa Monterio Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia (Eds). – 1 ed. – Brasília, DF' MMA; Belo Horizonte, MG' Fundação Biodiversitas, 2008.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. Dissertação e Mestrado (Programa de Pós - graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura) UNESP, Campus de Jaboticabal.2004. 82p.

MOURA-BRITTO, M.; PATRÓCINIO, D. N. M. A fauna de espécies exóticas no Paraná' contexto nacional e situação atual. In' **Unidades de Conservação' Ações para valorização da biodiversidade**. Instituto Ambiental do Paraná – IAP. Curitiba/PR, 2005. p. 53-91.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A.B.; FRANCISCATTO, R.T.; MARIA, A. N. viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In Hoar, W.S., RANDALL, D.J., DONALDSON, E.M. (ed.) **Fish Physiology**. New York, Academic Press, 1983.

NAVARRO, O. J.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y .M.; CRUZ-CASALLAS, P. E., Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Rev. Col. Cienc. Pec.** v.17, p.53–59, 2004.

NEVILLE, L. E.; MURPHY, S. Invasive Alien Species' Forging Cooperation to Address a Borderless Issue. **International Association for Ecology (INTECOL) Newsletter**, Spring/Summer' p. 3-7. 2001.

NILSSON, C.; REIDY, C. A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow regulation of the World's large river systems. **Science**, v. 308 p. 405-408. 2005.

NINHAUS-SILVEIRA, A. Preservação dos gametas de peixes e suas aplicações. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**. p.516-517, 2007.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen em pirapitinga (*Brycon nattereri*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.1509-1515, 2007.

PERCHEC, P. G., COSSON, J.; ANDRÉ, F., BILLARD, R. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). **J. Appl. Ichthyol.**, v.9, p.129-149, 1993.

PONZETTO, J. M.; POLAZ, C. N. M.; ROCHA, R. C. G. A.; SENHORINI, J. A.; PORTO-FORESTI, F; FORESTI, F. Reprodução induzida de híbridos do gênero *Brycon* em cativeiro' Potencialidades e ameaças a conservação das espécies nativas. In' **8ª. Jornada Científica e Tecnológica da UFSCar**, 2009, São Carlos. Anais de Eventos da UFSCar 2009, v. 5.

POVH, J. A. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 75p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 2007.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2002. 327 p.

RANA, K. Preservation of gametes. In' BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.) **roodstock management and egg and larval quality**. London' Blackwell Science, 1995. p.53 – 75.

RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMDAR, K. C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **J. Fish Biol.**, v.50 :1309-1338. 1997

REIS, R. E.; S. O. KULLANDER & C. J. FERRARIS JR. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre' Edipucrs, 2003.742p.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleosteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, jan. /fev. 2003.

RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In. RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. (Ed.) **Matas Ciliares' conservação e recuperação**. São Paulo' EDUSP, p.235-247. 2001.

ROMAGOSA, E. **Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinhã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro, Vale do Ribeira, São Paulo**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – SP 218p., 1998.

SALGADO, F. G. A., M. G. CHAIN, L. GIRARDI E C. A. FARIA. O salvamento de uma espécie em extinção' A conservação da Piabanha (*Brycon insignis*) na Bacia do Rio Paraíba do Sul. **Relatório Técnico da CESP - Companhia Energética de São Paulo**. 28p. 1997.

SALISBURY, G. M. e VANDEMARK, N. L. **Fisiología de la reproducción y de la inseminación artificial de los bóvidos**. Zaragoza, Acribia, 1964 707 p

SANABRIA, A. I. **Efeito da restrição alimentar no desempenho reprodutivo de machos de matrinxã, *Brycon cephalus***. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura –Jaboticabal – SP 60 p., 2002.

SANCHES, E. A. **Efeito da estocagem a curto prazo e da temperatura sobre gametas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)**. Jaboticabal/SP. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista – Centro de Aquicultura, 88p. 2009.

SENHORINI, J. A. **Biologia larval do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) e do piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), (Pisces Characidae) em viveiros**. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 1999.

SENHORINI, J. A.; GASPAR, L. A.; FRANSOZO, A.. Crescimento, sobrevivência e preferência alimentar de larvas de matrinxã (*Brycon cephalus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) em viveiros. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, SP, v. 15, p. 9-21, 2002.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides na truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim da Indústria da Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 69-73, 1987.

SONSTEBEBO, J. H.; BORGSTROM, R.; HEUN, M. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta L.*) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 33-44. 2007.

STREIT-JR, D. P.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; MENDEZ, L. V.; GALLO, J. M.; DIGMAYER, M.; POVH, J. A. CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) APÓS INDUÇÃO HORMONAL. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 22, n. 3, p. 119-125, Sept./Dec. 2006.

TAITSON, P. F.; GODINHO, H. P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 2, p. 238-239, mar./abr. 2003.

TAYLOR, J. N.; COURTENAY, J. R., W. R.; MCCANN, J. A. Known impacts of exotic fishes in the continental United States. p. 322-373. In W. R. COURTENAY JR. E J. R. STAUFFER (Eds.) **Distribution, Biology, and Management of Exotic fishes**. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1984. 430 p.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VIVEIROS, A. T. M. . Criopreservação de sêmen de peixes. In: **XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 2005, Goiania. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Goiania, 2005. v. CD.

WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. **FAO Fisheries Technical Paper 294**, FAO, Roma, Italia 1998. 318p.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E. F.; GONCHARO, B. F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, n. 1/2, p. 53-61, Sept. 2000.

WIRTZ, S.; STEINMANN, P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Biology**, v.68, p.1896-1902,2006.

ZANIBONI FILHO, E. ; NUÑER, A. P. de O. ; REYNALTE-TATAJE, D. A.; HERMES-SILVA, S.; MEURER, S. Alterações espaciais e temporais da estrutura da comunidade de peixes em decorrência da implantação do reservatório de Itá (Alto Rio Uruguai). In' EVOY ZANIBONI-FILHO; ALEX PIRES DE OLIVEIRA NUÑER. (Org.). **Reservatório de Itá' estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna**. Florianópolis' Editora da UFSC, 2008, p. 21-48.

ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory Fishes of the Uruguay River. In' CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C. AND BAER, A. (Eds.) **Migratory Fishes of**

the South America' Biology, Social Importance and Conservation Status. World Fisheries Trust. Victoria, Canada, 2003, p. 157-194.