

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA

ELÉXIO VIDAL

Efeito da amônia sobre a fertilização artificial de ovócitos e no desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae)

Toledo

2012

ELÉXIO VIDAL

Efeito da amônia sobre a fertilização artificial de ovócitos e no desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Co-orientador: Prof. Dr. Gilmar Baungartner

Toledo
2012

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

V648e Vidal, Eléxio
Efeito da amônia sobre a fertilização artificial de ovócitos
e no desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*;
Siluriformes, Heptapteridae) / Eléxio Vidal. -- Toledo, PR : [s.
n.], 2012.
32 f. : il. (algumas color.)

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Coorientador: Prof. Dr. Gilmar Baumgartner
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do
Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências
Exatas.

1. Jundiá (*Rhamdia quelen*) – Reprodução – Água
contaminada 2. Peixes – Fertilização artificial 3. Reprodução
animal – Peixes 4. Inseminação artificial animal 5. Amônia –
Efeito fisiológico I. Bombardelli, Robie Allan, Orient II.
Baumgartner, Gilmar, Orient. III. T

CDD 20. ed. 639.3752
597.52

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELÉXIO VIDAL

Efeito da amônia sobre a fertilização artificial de ovócitos e no desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Fábio Meurer
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovado em: 22 de fevereiro de 2012.

Local de defesa: Auditório da Gerpel/*Campus* de Toledo.

Efeito da amônia sobre a fertilização artificial de ovócitos e no desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de amônia, sobre os parâmetros de motilidade espermática, a fertilização artificial e o desenvolvimento inicial do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae). O sêmen foi ativado utilizando a diluição de 1:70 (sêmen:água) e avaliado pelo método CASA. Foi considerado como tratamento água contendo 0,06; 0,28; 0,50; 0,77 e 0,84 mg de amônia total.L de água⁻¹, tanto para ativação espermática quanto para fertilização e incubação dos ovócitos. A incubação era composta por um sistema de recirculação de 250L para cada tratamento, com quatro incubadoras, sendo que cada incubadora tinha volume útil de 2,5L com aproximadamente 3.800 ovos. Foram avaliados os parâmetros de motilidade espermática, de taxa de fertilização, unidade térmica acumulada para início e término da eclosão, taxa de eclosão, desenvolvimento embrionário e percentual de larvas normais. Os resultados foram submetidos a análise de variância e a análise de regressão a um nível de 5% de probabilidade. Os níveis de amônia presentes na água não interferiram sobre os parâmetros avaliados ($p>0,05$), exceto quanto ao desenvolvimento embrionário inicial, onde os embriões expostos aos maiores níveis de contaminação por amônia apresentaram maiores ($p<0,05$) taxas de fechamento do blastóporo. De modo geral, a presença de até 0,84mg de amônia total.L de água⁻¹ acelera o desenvolvimento inicial embrionário mas não interferem nas taxas de fertilização e eclosão.

Palavras-chave: amônia, embrião, larvas, peixe, poluente.

Effect of ammonia on the artificial fertilization of oocytes and early development of jundia (*Rhamdia quelen*, Siluriformes, Heptapteridae)

ABSTRACT

The aim study it had as objective to evaluate the effect of different ammonia levels, on the parameters of sperm motility, the artificial fertilization and the early development of jundia (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae). The semen was activated using the dilution of 1:70 (semen:water) and evaluated by the CASA method. It was considered as treatment water containing 0,06; 0,28; 0,50; 0,77 and 0,84 mg of total ammonia.water⁻¹ L, so for sperm activation as for fertilization and incubation of the oocytes. The incubation was composed for a recirculation system of 250L for each treatment, with four incubators, being that each incubator approximately had useful volume of 2,5L with 3,800 eggs. Had been evaluated the parameters of sperm motility, fertilization rate, thermal unit accumulated for beginning and ending of the hatching, hatching rate, embryonic and percentile development of normal larvae. The results had been submitted the analysis of variance and the analysis of regression to a 5% of probability level. The ammonia levels gifts in the water did not interfere on the evaluated parameters ($p > 0,05$), except about to the early embryonic development, where the embryos displayed to the biggest levels of contamination for ammonia had presented greater ($p > 0,05$) closing of the blastopore rates. In general way, the presence of until 0,84mg of total ammonia. Water-1 L speeds up the embryonic early development but they do not interfere with the fertilization and hatching rates.

Keywords: embryo, larvae, nitrogen, fish, pollutant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 A espécie estudada.....	9
2.2 Amônia	11
2.3 Métodos de reprodução artificial	13
3 METODOLOGIA.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5 CONCLUSÃO.....	23
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 Introdução

A exploração comercial de peixes vem se expandindo muito nos últimos anos, segundo a FAO (2010) a produção mundial na aquicultura em 2009 foi de 55,1 milhões de toneladas, dos quais 54,7% representam o cultivo de peixes de água doce. No Brasil, diversas espécies nativas de peixes apresentam potencial de ser exploradas pela piscicultura.

De acordo com MAFFEZZOLLI E NUÑER (2006), uma espécie que vem despertando grande interesse para a piscicultura da região sul do Brasil, por seu crescimento acelerado, inclusive nos meses mais frios, é o jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824). Esta espécie teve sua produção entre 2007 e 2009, correspondente a 1089 t. (MPA, 2009). Esta espécie apresenta importância não só econômica, mas também ecológica (MIRON et al., 2008) por apresentar uma estratégia alimentar generalista (KÜTTER et al., 2009) e pela sua ampla distribuição geográfica, sendo encontrada do México até a Argentina (PERDICES et al., 2002).

O jundiá assumiu seu status produtivo devido a características relacionadas o ao relativo domínio da tecnologia de sua criação (BOMBARDELLI et al., 2006). Contudo, alguns aspectos referentes a reprodução artificial destes peixes ainda são pouco compreendidos, a exemplo dos fatores influentes na fertilização artificial dos ovócitos e o desenvolvimento inicial dos embriões e das proles, que podem depender da nutrição dos reprodutores (TESSARO et al., 2012). Estudos recentes têm mostrado que fatores ambientais como a temperatura (SANCHES et al, 2011), a presença de metais pesados como o chumbo e o cádmio (HILBIG et al., 2008; WITECK et al, 2011) interferem nos parâmetros anteriormente citados.

A amônia presente na água pode ser um fator limitante ao desenvolvimento e até para a sobrevivência de peixes (WANG & WALSH, 2000), seja em ambiente artificial ou natural. A origem de compostos nitrogenados na água pode ser de efluente da própria aquicultura (BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2004), proveniente da alimentação e/ou excreção dos peixes (PEREIRA & MERCANTE, 2005). A amônia na forma não ionizada (NH_3) pode ser absorvida pelo epitélio branquial (SILVA & JARDIM, 2006) e promover alterações fisiológicas como alteração do pH sanguíneo (BECKER et al, 2009), danos neurais (RAABE & LIN, 1985) e até morte (RAMDAL & TSUI, 2002). Sabe-se que os níveis tóxicos de amônia para peixes varia de 0,15 a 1,00 mg L^{-1} (OSTRENKY & BOEGER, 1998) em fase de juvenil a adultos, acima disso já pode ser letal. Poucas informações são disponíveis na literatura sobre os níveis toleráveis ou seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos ou sobre o desenvolvimento inicial desta espécie.

Neste sentido o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos de diferentes níveis de amônia total na água, sobre os parâmetros espermáticos, a fertilização artificial de ovócitos, a eclosão de ovos e o desenvolvimento embrionário do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*; Siluriformes, Heptapteridae).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 A espécie estudada

O *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824), mais conhecido como jundiá cinza, é classificado como um siluriforme e pertencente à família Heptapteridae (BOCKMANN & GUAZELLI, 2003). A espécie possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (GOMES et al., 2000).

É considerada uma espécie rústica, de rápido crescimento e que suporta bem as baixas temperaturas, aceita bem dietas artificiais formuladas com diferentes ingredientes de origem animal e vegetal (PARRA, 2007). Ainda que as respostas biológicas às técnicas de criação ainda sejam pouco conhecidas (GOMES et al., 2000; PARRA, 2007), o jundiá possui alto rendimento de carcaça e sua carne é apreciada pelo sabor e textura (FERREIRA et al., 2001), características que promovem boa aceitação pelos consumidores (MARCHIORO & BALDISSEROTTO, 1999). A manipulação reprodutiva também é, relativamente, bem sucedida em cativeiro (BOMBARDELLI et al., 2006), sendo cultivada principalmente no sul do Brasil (PIAIA & BALDISSEROTTO, 2000).

Possui hábito noturno e bentônico, preferindo fundos próximos a margem e vegetação (GOMES et al., 2000) com seixos e troncos submersos (SCHULZ & LEUCHTENBERGER, 2006), pois é nesses locais que se encontram invertebrados (crustáceos, anelídeos e insetos), restos vegetais, sedimentos, escamas e peixes, caracterizando um hábito alimentar onívoro e generalista (GOMIEIRO et al., 2007).

A espécie atinge sua primeira maturação gonadal com aproximadamente um ano de idade (NARAHARA et al., 1985), e é em época de altas temperaturas (GHIRALDELLI et al., 2007), que ocorre a formação de cardumes nas áreas de desova que em geral acontece em águas rasas, limpas, com pouca corrente e fundo pedregoso (GOMES et al., 2000). Há um grande sincronismo de machos e fêmeas durante a desova que acontece de forma parcelada, ou seja, ocorre mais de uma vez dentro do mesmo período reprodutivo (GOMES et al., 2000), apresentando picos no verão e na primavera (GOMIEIRO et al., 2007)

Esta espécie é ovulípara com ovos esféricos, demersais e não adesivos com espaço perivitelino evidente e córion resistente (PEREIRA et al., 2006). A eclosão

ocorre cerca de 26h após a fertilização (AMORIM et al., 2009) e o crescimento é rápido e acentuado nos primeiros meses de vida (GOMES et al., 2000).

O jundiá é produzido principalmente no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Em 2009, foram produzidos 1089 toneladas (MPA, 2009). A principal forma de criação do jundiá acontece em viveiros escavados (BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2004), contudo, formas mais intensivas de cultivo vêm sendo implantadas (SCORVO-FILHO, 2004), como o cultivo desta espécie em tanques-rede (BALDISSEROTTO e RADUNZ NETO, 2004; REIDEL, 2007).

2.2 Amônia

Em geral as dietas são formuladas com o objetivo de atender as exigências mínimas dos peixes (MEYER & FRACALOSSO, 2004) ou maximizar seu desempenho reprodutivo, utilizando diversas fontes proteicas (LAZZARI et al., 2007). Porém os elevados níveis de proteína que são fornecidos aos peixes, são eliminados na forma de nitrogênio orgânico ou amônia, que é a principal forma de excreção dos peixes (BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2004), e o excesso destes compostos na água pode ser tóxico para muitas espécies de peixes (WANG & WALSH, 2000).

A amônia e os demais compostos nitrogenados também podem ser provenientes de fontes industriais, da agricultura e de esgotos, e em algumas bacias, da degradação de matéria orgânica no sedimento (FINN, 2007; FERRETI, 2005). A uréia é usada como agente neutralizador na indústria de petróleo, como gás de refrigeração (LIMA et al, 2009) e também na agricultura e junto com o sulfato de amônio, constituem as principais fontes de N pois, após o período de chuvas podem ser levados para os corpos d'água, sofrem reações e produzem amônia e íons amônio, respectivamente (SILVA & VALE, 2000)

Esses resíduos causam a eutrofização do ambiente aquático, e o excesso de nutrientes provoca um aumento da produção primária, e consequentemente a redução da luminosidade e da taxa de oxigênio dissolvido (MACEDO & SIPAUBA-TAVARES, 2010). Sendo um dos fatores limitantes na produção aquícola (HARGREAVES & KUCUK, 2001) e em sistemas de cultivo intensivo esse problema pode ser ainda maior, devido a alta concentração de organismos e baixa taxa de renovação de água.

Diversos autores já observaram os possíveis efeitos da amônia sobre o desenvolvimento e a sobrevivência dos peixes. Estudando juvenis de *Rhamdia quelen* MIRON et al. (2008) afirmam que a amônia causa a degradação do glicogênio, causando danos nos tecidos muscular, fígado e brânquias.

ABDALLA & MACNABB (1998) relataram que a concentração letal de amônia não ionizada para peixes varia 0,32-3,10 mg L⁻¹ por 96 horas de exposição aguda. Esses níveis podem variar de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento dos peixes. LAMARIÉ et al. (2004), por exemplo, consideram que 0,26 mg de N-NH₃.L⁻¹ é a concentração máxima aceitável para manter o desempenho de ganho de peso em juvenil de robalo da Europa *Dicentrarchus labrax*. No entanto esse componente se mostrou relevante no desenvolvimento de outras espécies, como relata FRANCES et al. (2000) que com a inclusão de 0,06 mg de N-NH₃.L⁻¹ observaram uma redução de 5% na taxa de crescimento de juvenis *Bidyanus bidyanus*.

FOSS et al. (2003) observaram que juvenis de *Anarhichas minor*, a princípio apresentaram crescimento reduzido, quando a inclusão de amônia na água foi acima de 0,25 mg.L⁻¹, no entanto no segundo período do experimento as taxas de crescimento aumentaram, sugerindo uma certa adaptação dos peixes ao ambiente. De acordo com HARGREAVES & KUCUK (2001) a exposição à amônia pode tanto reduzir o apetite, o consumo voluntário de ração, explicando assim o crescimento reduzido dos peixes.

EL-SHAFAI et al. (2004) também observaram que a inclusão de 0,26 mg de N-NH₃.L⁻¹ não mata, mas afeta negativamente a eficiência protéica de alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus*. WICKS & RANDALL (2002), também registraram que 0,8 mg de N-NH₃.L⁻¹ prejudica natação de juvenis de *Oncorhynchus kisutch*.

Contudo, o efeito da amônia no desenvolvimento embrionário de peixes neotropicais ainda é pouco estudado. LUCKENBACH et al (2001; 2003) dizem que altos níveis de amônia podem afetar o início do desenvolvimento embrionário, e em concentrações subletais causar retardo do desenvolvimento e redução do crescimento.

2.3 Métodos de reprodução artificial

A reprodução artificial do jundiá é realizada por meio da indução hormonal, podendo ser empregada a fertilização seminatural (BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2004; 2005) ou a seco (BOMBARDELLI et al., 2006a; SAMPAIO & SATO, 2006). Os machos liberam fluido seminal a partir de leve pressão abdominal, sem a necessidade de indução hormonal (FERREIRA et al., 2001), entretanto, respondem bem ao processo de hipofiseação (GUILHERME et al., 2007), aumentando o fluido seminal após uma dose única de 0,5 a 3,0 mg de extrato de hipófise de carpa por kg de reprodutor (EHC.kg⁻¹) (BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2005; CARNEIRO & MIKOS, 2008). Deve-se destacar que, a realização da indução hormonal é praticada com intuito de garantir um maior volume de sêmen, facilitando sua manipulação em procedimentos de reprodução artificial (CARNEIRO & MIKOS, 2008).

Fêmeas de jundiá podem apresentar repostas satisfatórias quando submetidas a aplicação de 4,0 mg de EHC.kg⁻¹, sendo esta realizada em duas dosagens, a primeira correspondendo a 10% do total e a segunda a 90% deste, entre intervalos de aplicação de 10 a 12 horas (BALDISSEROTTO & RADUNZ NETO, 2005). Podem ser submetidas também, a dosagem única de 6,0 mg de EHC.kg⁻¹, podendo ovular após 300

horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo após indução hormonal) (SAMPAIO & SATO, 2006).

Tipos de hormônios, dosagens aplicadas, períodos de latência podem variar conforme as condições em que os reprodutores (matrizes) foram mantidos durante o período que antecede a desova e o estágio de desenvolvimento que se encontram no momento da aplicação hormonal (ZANIBONI FILHO & NUNER, 2004; ZANIBONI FILHO & WEINGARTNER, 2007). Após a realização da coleta dos gametas por meio da extrusão (massagem abdominal no sentido céfalo-caudal), várias análises são realizadas com intuito de verificar a qualidade e a quantidade dos gametas produzidos.

As características quanti-qualitativas do sêmen de jundiá comumente avaliadas são: volume seminal liberado, concentração espermática, motilidade, tempo de duração da motilidade, índice de sobrevivência e morfologia espermática. Segundo SAMPAIO & SATO (2006) as principais variáveis biológicas mensuradas em fêmeas de jundiá são índice gonadosomático em estágio maduro, fecundidade, diâmetro do ovo e taxa de fertilização.

A fertilização artificial do jundiá é comumente realizada a “seco”, em que após a coleta dos gametas, ocorre a mistura do sêmen com os ovócitos na ausência de água, após a homogeneização completa adiciona-se água, ocorrendo a ativação dos espermatozoides e posteriormente fertilização dos ovócitos (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983). Para que ocorra o máximo aproveitamento dos gametas de jundiá BOMBARDELLI et al. (2006a) recomendam uma dose inseminante acima de $89.000 \text{ espermatozoides.ovocito}^{-1}$.

A seguir, os ovos são transferidos para incubadoras, de formato cônico, que garantam a movimentação e oxigenação constante dos mesmos (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983). A água empregada na fertilização e incubação dos ovos de jundiá

devem apresentar valores de pH entre 7,5 a 8,0 e dureza de 40 mg de $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (GRAEFF et al., 2007).

3 Metodologia

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC) instalado no Instituto de Pesquisa em Aqüicultura Ambiental (InPAA), e no Laboratório de Ictiologia do Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus Toledo*.

O experimento foi realizado no período de outubro à novembro de 2010. Foram utilizados quatro machos e duas fêmeas de *R. quelen*, provenientes da própria estação de pesquisa. Após a seleção, os reprodutores foram levados ao laboratório, pesados, marcados e separados por sexo em tanques individuais. As fêmeas foram induzidas com 5,5mg de extrato de hipófise de carpa (EHC)/kg de peso, divididos em duas doses, sendo a primeira correspondente a 10% da dose total, e o restante aplicada 12 horas após a primeira dose. Os machos receberam uma dose única de 2,5 mg de EHC/kg, juntamente com a segunda dose das fêmeas. Para condução dos procedimentos de indução hormonal, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína a 1%.

Após um período de 181°C horas-grau ou unidade térmica acumulada (UTA) (aproximadamente 7 horas, água a 25,7°C), os reprodutores foram submetidos à coleta dos gametas. Para isso, os indivíduos foram contidos e secos com panos e papel-toalha (BOMBARDELLI et al., 2006), e os gametas (ovócitos e espermatozóides) foram coletados a seco, sob leve pressão abdominal no sentido céfalo-caudal. Os primeiros ovócitos foram desprezados para evitar possível contaminação por urina ou fezes (BROOKS et al., 1997), sendo o restante dos ovócitos coletados e colocados em placa

de Petri. A coleta dos gametas masculinos foi realizada de maneira idêntica às fêmeas, sendo que a primeira gota de sêmen também foi desprezada para evitar possível contaminação (POUPARD et al., 1998) e o restante foi coletado em um tubo de ensaio.

Inicialmente, amostras de sêmen de cada um dos machos foram avaliadas em duplicata para avaliação dos efeitos da amônia sobre os parâmetros de motilidade espermática. As avaliações dos parâmetros espermáticos foram realizadas pelo método CASA (*Computer-Assisted Analysis*) segundo SANCHES et al. (2010). Para realização destes ensaios, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Foram considerados como tratamentos a ativação espermática do jundiá em água contendo as concentrações de 0,06; 0,28; 0,50; 0,77 e 0,84 mg de amônia total/L de água. Foi considerada como unidade experimental, o sêmen proveniente de um macho. Para a ativação espermática, empregou-se uma relação de diluição de 1:70 (sêmen:água). Desta mistura 10 µL foram colocados em câmara hematimétrica de Neubauer e avaliados em microscópio óptico em objetiva 40X (Nikon E200). As análises foram realizadas com um segundo de imagem, obtidas 15s após o início da ativação espermática. Os parâmetros mensurados foram: a motilidade espermática, a velocidade espermática curvilínea, a velocidade espermática do caminho médio, a velocidade espermática em linha reta e a linearidade (SANCHES et al., 2010).

Do material coletado das fêmeas, realizou-se um “pool” de ovócitos do qual foram retirados 60 mL de ovócitos não hidratados para realização dos ensaios de fertilização artificial. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. Foram considerados como tratamentos a fertilização de ovócitos de jundiá em água contaminado por 0,06; 0,28; 0,50; 0,77 e 0,84 mg de amônia total/L de água. Foi considerada como uma

unidade experimental, uma incubadora de volume útil de 2,5L, contendo ± 3.800 ovos, instaladas em um sistema de recirculação de 250L, com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por aquecimento elétrico (BOMBARDELLI, et al 2006; WITECK et al., 2011).

Para a condução dos procedimentos de fertilização artificial, foram utilizados três mL de ovócitos não hidratados, 0,5mL de sêmen e 15 mL de água contendo os respectivos níveis de contaminação por amônia, os quais foram homogeneizados por um minuto em recipientes plásticos de volume útil de 180mL. Em seguida, os ovos foram transferidos para as incubadoras experimentais. A contaminação da água com amônia foi realizado pela adição de quantidades crescentes de hidróxido de amônio em 250L de água proveniente de poço artesiano da própria estação de pesquisa. Para confirmar os níveis de contaminação da água, amostras de água dos diferentes tratamentos foram obtidas no momento da contaminação da água com o hidróxido de amônio, 13, 24 e 48 horas após este procedimento, conforme metodologia descrita por KOROLLEF et al. (1976).

Nove horas após a fertilização artificial, foram mensuradas as taxas de fertilização (AMORIM et al., 2009) por meio da amostragem de aproximadamente 400 ovos de cada unidade experimental (WITECK et al., 2011). A avaliação do percentual de embriões viáveis foi feita com o auxílio de estereomicroscópio (10x).

Foram avaliados ainda a porcentagem de início e término do fechamento do blastóporo, sendo considerado o início, o momento em que aproximadamente 10% dos embriões apresentavam blastóporo fechado, e término, o momento em que aproximadamente 90% dos embriões apresentavam blastóporo fechado. Para tanto, seis e 12 horas após a fertilização artificial (RODRIGUES-GALDINO et al, 2009) amostras

contendo aproximadamente 20 embriões de cada unidade experimental, foram fixadas em solução de formol tamponado a 4%. O mesmo procedimento foi realizado 16 e 21 horas após a fertilização, para avaliação do percentual de embriões em início e término do desprendimento da cauda. De forma semelhante foram considerados o momento de início e término deste processo quando aproximadamente 10 e 90% dos embriões estavam com a cauda desprendida, respectivamente. As amostras foram avaliadas em estereoscópio em aumento de 10X.

Além disso, o período de tempo em termos de UTA (horas-grau), necessário para início (IE) e término (TE) da eclosão dos ovos foi mensurado após a fertilização artificial. Estes parâmetros foram mensurados por meio de retirada de aproximadamente 40 ovos e/ou larvas de cada tratamento e avaliados em estereoscópio (10x), sendo considerado como tempo para início da eclosão o momento em que 10% dos ovos estavam eclodidos e para o término a eclosão o momento em que 90% dos ovos estavam eclodidos.

Após a eclosão completa dos ovos, todas as larvas de cada unidade experimental também foram fixadas em solução de formol tamponado a 4%. Estas larvas foram contadas para a estimativa do percentual de deformidade de larvas (JEZIERSKA et al., 2000). Foram avaliadas 400 larvas de cada unidade experimental, em estereoscópio (10x).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5%. Em caso de evidencia de efeito entre os tratamentos, foi aplicada análise de regressão também a um nível de 5% de significância. O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi o Statistica 7.0[®].

4 Resultados e Discussão

Durante o período experimental a temperatura da água permaneceu em $25,7 \pm 1,7^\circ\text{C}$, valores considerados adequados para a espécie (GOMES et al, 2000) e os níveis de amônia na água permaneceram inalterados ao longo do tempo ($p=0,96$). A contaminação da água por amônia não causou efeito ($p>0,05$) sobre os parâmetros espermáticos do jundiá (Tabela 1), embora tenha sido observada uma redução na motilidade, quando os níveis de amônia na água aumentaram. Ao contrário da velocidade curvilínea que apresentou crescimento diretamente proporcional a inclusão de amônia.

Tabela 1 – Parâmetros espermáticos do jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de sêmen diluído em água contendo diferentes concentrações de amônia.

Variáveis	Tratamentos (mg L^{-1})					
	0,06	0,28	0,50	0,77	0,84	P
Motilidade (%)	76	66	66	57	52	0,60
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m s}^{-1}$)	24,72	29,72	30,26	34,89	37,12	0,73
Velocidade de percurso ($\mu\text{m s}^{-1}$)	16,96	15,94	17,92	12,26	14,16	0,74
Velocidade linha reta ($\mu\text{m s}^{-1}$)	14,41	18,63	30,40	11,69	26,50	0,57
Linearidade (%)	81	82	82	83	80	0,79

Os níveis de amônia presentes na água também não interferiram sobre as taxas de fertilização artificial dos ovócitos ($p>0,05$) (Tabela 1). Resultados semelhantes foram

verificados para as taxas de eclosão ($p>0,05$) e para o percentual de larvas normais ($p>0,05$), (Tabela 2).

Tabela 2 – Taxas de fertilização de ovócitos, UTA para início e término da eclosão dos ovos, taxas de eclosão dos ovos e percentual de larvas normais de *R. quelen* provenientes de fertilização e incubação artificial em água contaminada por amônia.

Níveis de amônia na água (mg/L)						
Variáveis(%)	0,06	0,28	0,50	0,77	0,84	P
Taxa de fertilização (%)	98,36	98,86	98,49	98,70	99,19	0,58
Início da eclosão (UTA)	709,1	713	682	688,9	682,6	-
Término da eclosão (UTA)	1128,1	1138,5	1085,9	1095,3	1087,1	-
Blastóporo início (%)*	9,58	12,30	58,54	43,19	95	0,00
Blastóporo final (%)	93	95	94	97	98	0,22
Cauda livre início (%)	15,97	25,13	14,26	24,19	18,93	0,84
Cauda livre final (%)	64,42	81,56	45,62	67,02	61,44	0,13
Taxa de eclosão (%)	79,98	86,08	89,03	90,01	89,52	0,51
Normalidade (%)	99,91	98,80	99,89	99,85	99,87	0,45

* Efeito linear $y=-16,7891+20,1723*x$

O tempo necessário para iniciar e concluir a eclosão dos ovos não foi submetido a análise estatística devido a inexistência de repetições, contudo, numericamente seus valores variaram de 682 a 709,1 UTA para o início e de 1085,9 a 1138,5 UTA para o término da eclosão dos ovos (Tabela 2).

Os níveis de contaminação da água com amônia interferiram ($p<0,05$) no desenvolvimento embrionário inicial do *R. quelen*, somente no que se refere ao início do

fechamento do blastóporo (Tabela 2). Neste momento ontogenético, o início do fechamento do blastóporo apresentou um comportamento diretamente proporcional ($p < 0,05$) ao aumento dos níveis de amônia na água (Figura 1). Os demais parâmetros de desenvolvimento embrionário não sofreram influência dos níveis de contaminação da água por amônia ($p > 0,05$) (Tabela 2).

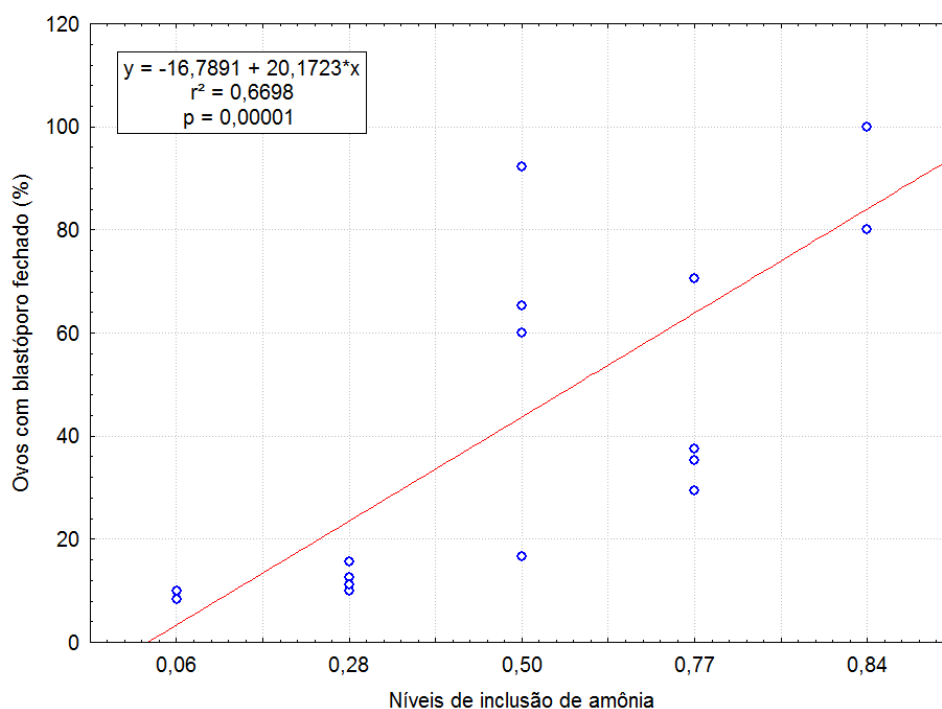


Figura 1 – Início do fechamento do blastóporo seis horas após a fertilização.

Os dados de motilidade do grupo controle está próximo aos encontrados por TESSARO et al (2012) sendo entre de 73 e 84%. SANCHES et al (2010) também verificaram que a motilidade foi de 65%. No entanto as velocidades curvilíneas, de percurso e linha reta ficaram muito abaixo quando comparado com o mesmo autor, 77, 58 e 46 $\mu\text{m.s}^{-1}$.

De modo geral, as membranas biológicas são permeáveis à amônia mas relativamente impermeáveis aos íons amônio (RAMDAL & TSUI, 2002). Os ovos apresentam uma morfologia que pode proteger o embrião de interferências externas. A

membrana perivitelina ou córion, é formada a partir da zona radiata do ovócito. que permanece durante todo o desenvolvimento embrionário (DEPÊCHE & BILLARD, 1994), é permeável à água e sais (BALDISSEROTTO, 2002), apresentando função de proteção ao embrião, nutrição, regulação osmótica e flutuação (GANECO, 2003).

Durante o processo de fertilização e formação do córion ocorre a absorção de água do meio externo para formação do espaço perivitelino (NAKATANI et al, 2001). No entanto o fato dos níveis crescentes de amônia na água utilizada na fertilização artificial e incubação dos ovos do jundiá não terem influenciado os parâmetros de desenvolvimento inicial pode estar associados ao fato de que os níveis de amônia empregados podem não ter sido elevados o suficiente para influenciar os parâmetros avaliados.

O fechamento do blastóporo ocorreu mais rapidamente nos tratamentos com concentrações maiores de amônia em comparação com o controle, embora isso não tenha influenciado na taxa de eclosão. LUCKENBACH et al (2003) estudando salmão marrom (*Salmo trutta f. fario* L.) também observaram um desenvolvimento acelerado dos embriões, diminuindo o tempo de incubação e aumentando a taxa de eclosão com a inclusão de amônia. Isso pode ser explicado pelo fato da amônia acelerar o metabolismo ao interagir nas vias bioquímicas, assim as reservas presentes no vitelo são consumidas mais rapidamente, contribuindo para o desenvolvimento acelerado (LUCKENBACH et al., 2003).

Os níveis de amônia empregados nos tratamentos experimentais podem ter sido reduzidos para induzir danos fisiológicos aos embriões, contudo, como as larvas foram fixadas logo após a eclosão dos ovos, possivelmente os tratamentos poderiam ter influenciado no desenvolvimento larval. Esta afirmação pode ser sustentada pelo fato de que a amônia é facilmente difundida pelo epitélio branquial (RUYET et al, 1997) e seus

principais efeitos fisiológicos estão relacionados com prejuízos na transformação da energia alimentar em ATP e danos ao crescimento, danos ao epitélio branquial que promovem dificuldades nas trocas gasosas e danos ao sistema de osmorregulação (BOLNER, 2007). Em geral, níveis de amônia entre 0,06 e 3,1 mg L⁻¹ interferem no desenvolvimento e sobrevivência de peixes (ABDALLA & MACNABB, 1998; FRANCES et al., 2000; WICKS & RANDALL, 2002; FOSS et al., 2003; EL-SHAFAI et al., 2004; LAMARIÉ et al., 2004), embora esses valores possam variar de acordo com a idade, espécie e tempo de exposição e para juvenis de jundiá, estes níveis são de 0,01 até 1,86 mg L⁻¹ (CARNEIRO et al, 2009; WEISS & ZANIBONI-FILHO, 2009; MIRON et al, 2011).

Embora não tenha sido encontrado efeito significativo da inclusão de amônia na água sobre a fertilização e eclosão de larvas de jundiá, não existem trabalhos que descrevam o efeito da amônia nessa fase. Assim, são necessárias novas pesquisas neste campo para elucidar os efeitos da amônia sobre a fertilização artificial e o desenvolvimento inicial do jundiá em sistemas de criação artificial, especialmente porque a crescente preocupação com o uso da água está levando ao emprego de sistemas de criação com filtragem e recirculação da água, onde a amônia pode ser um fator limitante.

5 Conclusão

A fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) em água contendo até 0,84mg de amônia total/L de água acelera o desenvolvimento inicial mas não interfere nos parâmetros espermáticos, nas taxas de fertilização ou eclosão dos ovos e na normalidade larval.

6 Referências Bibliográficas

- AMORIM, M.P.; GOMES, B.V.C.; MARTINS, Y.S. et al. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 2, p. 172-180, 2009.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM. 2002. 212 p.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. UFSM, 2004. 232 p.
- BALDISSEROTTO, B., RADÜNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia sp*). In: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. UFSM, 2005. 468p.
- BECKER, A. G.; GARCIA, L. O.; KOCHHANN, D.; GONÇALVES, J. F.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Dissolved oxygen and ammonia levels in water that affect plasma ionic content and gallbladder bile in silver catfish. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1768-1773, 2009.
- BOCKMANN, F.A.; GUAZZELLI, G.M. Heptapteridae. In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (Org.). **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, 2003. 742p.
- BOLNER, K. C. S. **Parâmetros metabólicos e íons plasmáticos de piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas a diferentes níveis de oxigênio dissolvido e amônia**. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós Graduação em Biodiversidade Animal Universidade Federal Santa Maria, 2007.
- BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.A.; SYPPERRECK, M.A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de

jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006

BROOKS, S.; TYLER, C.R.; J.P.; SUMPTER, J.P.; Egg quality in fish: what makes a good egg? **Rev. Fish Biology and Fisheries** , v. 7, p. 387-416, 1997.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Gonadotrofina corionica humana e hormonio liberador de gonadotrofina como indutores da reproducao do jundiia. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 30, n. 3, p. 345-350, 2008.

DEPÊCHE, J.; BILLARD, R. **Embryology in fish: a review**. Société Française d'Ichtyologie, 1994. 123 p.

EL-SHAFAI, S.A.; EL GOHARY, F.A.; NASR, F.A.; STEEN, N.P.VAN DER; GIJZEN, H.J. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 117-127, 2004.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Food and Agriculture Organization of United Nations. 2010

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. de O.; LUZ, R. K. et al., Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

FERRETI, E. C. **Estudo da influência da relação s0/x0 na Determinação da atividade específica de bactérias Nitrificantes**. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina 2005.

FINN, R. N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 337–354, 2007.

FRANCES, J.; NOWAK, B.F.; ALLAN, G.L. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 183, p. 95-103, 2000.

FOSS, A.; EVENSEN, T.H.; VOLLEM, T.; OIESTAD, V. Effects of chronic

ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. **Aquaculture**, v. 228, p. 215-224, 2003.

GANECO, L. M. **Análise dos ovos de piracabjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Unesp, 2003.

GHIRALDELLI, L., MACHADO, C., FRACALOSSI, D.M., et al. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 349-356, 2007.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A. R.C., et al. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GOMIEIRO, L.M.; SOUZA, U.P.; BRAGA, F.M.S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota neotropica online**, v. 7, n. 3, p. 127-133, 2007.

GRAEFF, A.; TOMAZON, A. F.; PRUNE, E. N.; MARAFON, A. T. Influencia da dureza e do pH no desenvolvimento do jundiá (*Rhamdia quelen*) na fase de fertilização ate a produção de pos-larvas.. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 8, n. 9, p. 1-6, 2007.

GUILHERME, L. C.; MORELLI, S.; SILVA, N. R.; MOURA, M. R.; Indução Artificial da ovulação do *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) em reprodutores capturados no leito do rio Uberabinha – relato de caso. **Veterinária Notícias**, v. 13, n. 2, p. 55-61, 2007.

HARGREAVES, J. A.; KUCUK, S. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. **Aquaculture**, v. 195, p. 163–181, 2001.

HILBIG, C. C.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S.; BAGGIO, D. S.; SOUZA, B. E. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 217-224, 2008.

JEZIERSKA, B.; LUGOWSKA, K.; WITESKA, M.; SAMOWSKI, P. Malformations of newly hatched common carp larvae. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 2, 2000.

KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.) **Methods of seawater analysis**. Verlag Chemie, Weinheim. 1976. 317 p.

KÜTTER, M. T.; BEMVENUTI M. A.; MORESCO A. Feeding strategy of the jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) in costal lagoons of southern Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 41-47, 2009.

LAMARIÉ, G.; DOSDAT, A.; COVÈS, D.; DUTTO, G.; GASSET, E.; RUYET, P. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 229, p. 479-491, 2004.

LANGER, S. L.; VARGAS, V. M. F. Amônia e a possível ação de bactérias em *Mugil platanus* (mugilidae), no rio Tramandaí - RS - Brasil. In: IV Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, 2004.

LAZZARI, R., J. RADÜNZ NETO, J., VEIVERBERG, C.A., et al. Alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) com ingredientes protéicos. **Archivos de zootecnia**. v. 56, n. 214, p. 115-123. 2007.

LIMA, R. G.; CAVALCANTE, P. R. S.; MELO, O. T.; MELLO, W. C.

Concentrações de amônio na água da chuva e estimativa de emissão de amônia de rebanhos domésticos de pinheiro e viana, baixada maranhense. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2273-2276, 2009

MAFFEZZOLLI, G.; NUÑER, A. P. O. Crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 28, n. 1, p. 41-45, 2006.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 29, no2, p. 315-318, 1999.

MEYER, G.; FRACALOSS, D.M. Protein requirement of jundiá fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, p. 331–343, 2004.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca**. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, 2009.

MIRON, D. S.; MORAES, B.; BECKER, A. G.; CRESTANI, M.; SPANEVELLO, R., LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquaculture**, v. 277, p. 192–196, 2008.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Eduem, 2001. 378 p.

NARAHARA, M. Y., GODINHO, H. M., FENERICH-VERANI, N.; ROMAGOSA, E. Relacao peso-comprimento e fator de condicao de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 4, p. 13-22. 1985.

PARRA, J.E.G. **Respostas reprodutivas de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com diferentes fontes protéicas e lipídicas**. Tese de doutorado.

(Programa de pós-graduação em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 93p.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E; MONTILLA, A.; DOADRIO I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 172–189, 2002.

PEREIRA, L. P. F.; MARCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 31, p. 81-88, 2005.

PEREIRA C.R., BARCELLOS L.J.G., KREUTZ L.C., et al. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 1057-1063, 2006.

PIAIA, R; BALDISSEROTO, B. Densidade de estocagem e crescimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 509-513, 2000.

POUPARD, G.P.; PAXION, C.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, B. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. **Aquaculture**, v. 160, p. 317-328, 1998.

REIDEL, A. **Níveis de energia e proteína na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*) criados em tanques-rede**. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em aquicultura, do centro de aquicultura da Unesp, campus de Jaboticabal, 2007.

RODRIGUES-GALDINO, A. M.; MAIOLINO, C. V.; FORGATI, M.; DONATTI, L.; MIKOS, J. D.; CARNEIRO, P. C. F.; RIOS, F, S.. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v. 18, p. 131–144, 2009.

RUYET, J. P.; GALLAND, R.; LE ROUX, A.; CHARTOIS H. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture** v. 154, p. 155-171, 1997.

SAMPAIO, E. V.; SATO, Y. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 28, n. 3, p. 263-268, 2006.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; MARCOS, R.M.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C.P.R.; ROMAGOSA, E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, p. 1–4, 2010.

SANCHES, E. A.; NEUMANN, G.; BAGGIO, D. M.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; ROMAGOSA, E. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 319, p.453–458, 2011.

SCHULZ, U.H. , LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2A, p. 565-574, 2006.

SCORVO FILHO, J.D. O agronegócio da aqüicultura: perspectivas e tendências. Texto apresentado no **Zootec 2004** – Zootecnia e o Agronegócio Brasília, 28 a 31 de maio de 2004.

SILVA, C. A.; VALE, F. R.. Disponibilidade de nitrato em solos brasileiros sob efeito da calagem e de fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2461-2471, 2000.

SILVA, G. S.; JARDIM W. F. Um novo índice de qualidade das águas para proteção da vida aquática aplicado ao Rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia – SP. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 689-694, 2006.

TESSARO, T.; TOLEDO, C. P. R.; NEUMANN, G.; KRAUSE R. A.; MEURER F.; NATALI, M. R. M.; BOMBARDELLI R. A. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. **Aquaculture**, v. 326-329, p. 74–80, 2012.

WANG, Y.; WALSH, P. J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). **Aquatic Toxicology** v. 50, p. 205–219, 2000.

WEISS, L.A.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival of diploid and triploid *Rhamdia quelen* juveniles in different ammonia concentrations. **Aquaculture**, v. 298, p. 153–156, 2009.

WICKS, B.J.; RANDALL, D.J. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation ammonia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 275-285, 2002.

WITECK, L.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S.; BAGGIO, D. M; SOUZA, B. E. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.477-481, 2011.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Trad. Vera Lucia Mixtra Chama. Brasília: Escopo. 1983. 220p. Tradução de “The artificial propagation of warm-water finfishes - A Manual for Extension”.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUNER, A. P. O. Reprodução de peixes migradores de água doce. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Orgs.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. TecArt, 2004. p.45–74.

ZANIBONI FILHO,E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.