

Artificial fertilization of tambaqui oocytes (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) at different waiting times and cooled semen without the use of cryoprotectants

*Fertilização artificial de ovócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em diferentes tempos de espera e sêmen resfriado sem uso de crioprotetores*

Hygor da Silva Pereira¹; Felipe Augusto Lopes Cunha¹; Wisdeyvi Silva de Souza¹; Thalles Ribeiro Gomes²; Nilsa Duarte da Silva Lima^{2*}

Abstract: Artificial propagation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) is fundamental for aquaculture, but the optimization of fertilization timing, especially oocyte viability time post-extrusion, still presents challenges. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of different waiting times (15, 30, 45, 60, and 80 minutes) on the fertilization of tambaqui oocytes, using chilled semen (4 °C) without cryoprotectants. The study was conducted on a commercial scale, where male and female broodstock were hormonally induced. After extrusion, the oocytes were held and fertilized at the different sampling times with chilled semen. Fertilization rates were evaluated 6 hours post-insemination, under monitored water quality conditions, which remained adequate (average temperature of 28 °C). The highest fertilization rates were observed at 15 min (87.02%) and 30 min (86.80%). After 30 minutes, a progressive and significant decrease in fertilization efficiency was observed for the remaining times. It is concluded that, although tambaqui oocytes can withstand a waiting period of up to 80 minutes, the fertilization rate decreases after 60 minutes. The study defines an optimal time window, up to 30 mins for fertilization with chilled semen; after 45-60 min, the fertilization rate begins to drop. This information is crucial for optimizing or maximizing reproductive success in tambaqui larviculture.

Key words: Amazonian savannah. Assisted fertilization. Native fish. Reproduction.

Resumo: A propagação artificial do tambaqui (*Colossoma macropomum*) é fundamental para a aquicultura, mas a otimização do tempo na fertilização, especialmente o tempo de viabilidade dos ovócitos pós-extrusão, ainda apresenta desafios. Em face do exposto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes tempos de espera (15, 30, 45, 60 e 80 minutos) na fertilização de ovócitos de tambaqui, utilizando sêmen resfriado (4 °C) sem crioprotetores. O estudo foi realizado em escala comercial, em que reprodutores e matrizes foram induzidos hormonalmente. Após a extrusão, os ovócitos foram mantidos e fertilizados nos diferentes tempos amostrais, com sêmen resfriado. As taxas de fertilização foram avaliadas 6 horas após a inseminação, sob condições monitoradas de qualidade de água, que se mantiveram adequadas (temperatura média de 28 °C). As maiores taxas de fertilização foram observadas nos tempos de 15 min (87,02%) e 30 min (86,80%). Após 30 minutos, foi observada uma queda progressiva e significativa na eficiência da fertilização para os demais tempos. Conclui-se que, embora os ovócitos de tambaqui suportem uma espera de até 80 minutos, a taxa de fertilização diminui após 60 minutos. O estudo define uma janela de tempo ótima de até 30 min para a fertilização com sêmen resfriado, após 45-60 min a taxa de fertilização começa a cair, o que representa uma informação decisiva para otimizar ou maximizar o sucesso reprodutivo em larvicultura de tambaquis.

Palavras-chave: Savana Amazônica. Fertilização assistida. Peixe nativo. Reprodução.

*Corresponding author

¹Federal University of Roraima (UFRR). Department of Animal Science. Endereço: Rodovia BR 174, Km 12, s/n. Monte Cristo, CEP: 69300-000, Boa Vista/RR- Brasil. E-mails: hygorsilva170@gmail.com; felipe.augusto.lopes.cunha@gmail.com; wisdeyvi@hotmail.com; nilsa.lima@ufr.br

²University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony (UNILAB). Rural Development Institute. Rua José Franco de Oliveira, s/n. CEP: 62.790-970, Redenção/CE - Brasil. E-mail: thalles.gomes@unilab.edu.br

INTRODUCTION

Technological advances related to captive fish farming have driven major development in intensive aquaculture, aiming to improve zootechnical performance and shorten the production cycle. In this context, the farming of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) stands out as the most predominant native species in Brazilian aquaculture, valued for its omnivorous feeding habits, hardiness, fast growth, and easy adaptation to captivity (HILSDORF *et al.*, 2022).

To meet the growing demand for fry, artificial propagation has become an essential tool, enabling multiple annual spawnings and better control of the production process. This technique depends on hormonal induction and the selection of suitable broodstock (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007), culminating in the extrusion of gametes. Extrusion requires fast and precise handling, as fertilization depends on the activation of spermatozoa through hydration and must occur before the micropyles of the oocytes close (NUNES *et al.*, 2018).

The main challenge of this process is the rapid loss of gamete viability after extrusion, for both spermatozoa and oocytes (LIMA *et al.*, 2013), creating a significant logistical bottleneck in hatcheries. To overcome this time limitation, seminal conservation biotechnologies have been developed. Several studies report practical limitations of semen cryopreservation, especially related to cryoprotectant toxicity, cellular damage, and reduced post-thaw motility, in addition to cost and implementation challenges. In this context, cryopreservation is essential for long-term semen storage, but the procedure can cause irreversible damage to sperm cells, including anatomical, biochemical, and structural alterations that result in reduced motility, viability, and fertility after thawing (KUMAR *et al.*, 2019; SAHA *et al.*, 2022; SALEHI *et al.*, 2020; ATENCIO-GARCÍA *et al.*, 2023; OZIMIC *et al.*, 2023). These damages are attributed to factors such as ice-crystal formation, osmotic stress, oxidative stress, and cryoprotectant toxicity (KUMAR *et al.*, 2019; SAHA *et al.*, 2022; ATENCIO-GARCÍA *et al.*, 2023; OZIMIC *et al.*, 2023).

INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos relacionados ao cultivo de peixes em cativeiro proporcionaram um grande desenvolvimento na piscicultura intensiva, visando melhorar o desempenho zootécnico e reduzir o ciclo de cultivo. Nesse cenário, destaca-se a criação do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818), a espécie nativa de maior predominância no cultivo brasileiro, valorizada por seu hábito alimentar onívoro, rusticidade, rápido crescimento e fácil adaptação ao cativeiro (HILSDORF *et al.*, 2022).

Para atender à demanda crescente por alevinos, a propagação artificial tornou-se uma ferramenta essencial, possibilitando múltiplas desovas anuais e melhor controle do processo produtivo. Essa técnica depende da indução hormonal e da seleção de reprodutores aptos (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007), culminando no processo de extrusão dos gametas. A extrusão exige um manejo rápido e preciso, pois a fertilização depende da ativação dos espermatozoides pela hidratação e deve ocorrer antes do fechamento das micrópilas dos ovócitos (NUNES *et al.*, 2018).

O principal desafio desse processo é a rápida perda de viabilidade dos gametas após a extrusão, tanto dos espermatozoides quanto dos ovócitos (LIMA *et al.*, 2013), o que cria um gargalo logístico significativo nas estações de piscicultura. Para contornar essa limitação temporal, biotécnicas de conservação seminal foram desenvolvidas. Diversos estudos relatam as limitações práticas da criopreservação seminal, especialmente relacionadas à toxicidade dos crioprotetores, aos danos celulares e à redução da motilidade pós-descongelamento, além de desafios de custo e implementação. Nesse contexto, a criopreservação é fundamental para o armazenamento a longo prazo de sêmen, mas o processo pode causar danos irreversíveis às células espermáticas, incluindo alterações anatômicas, bioquímicas e estruturais, que resultam em redução da motilidade, viabilidade e fertilidade dos espermatozoides após o descongelamento (KUMAR *et al.* 2019; SAHA *et al.* 2022; SALEHI *et al.* 2020; ATENCIO-GARCÍA *et al.* 2023; OZIMIC *et al.* 2023). Esses danos são atribuídos a fatores como a formação de cristais de gelo, o estresse osmótico, o estresse oxidativo e a toxicidade dos crioprotetores (KUMAR *et al.* 2019; SAHA *et al.* 2022; ATENCIO-GARCÍA *et al.* 2023; OZIMIC *et al.* 2023).

The use of cryoprotectants such as glycerol, DMSO, ethylene glycol, among others, is essential to minimize ice-crystal formation, but they can cause cellular toxicity, affecting membrane integrity, DNA, and sperm motility (SAHA *et al.*, 2022; OZIMIC *et al.*, 2023; ELOMDA *et al.*, 2024; ESMERYAN *et al.*, 2025; SUWOR *et al.*, 2025). Glycerol toxicity, for example, requires limited exposure time to prevent motility loss (SAHA *et al.*, 2022). Studies also show that different cryoprotectants have varying effects on post-thaw quality, and no agent is completely free of adverse effects (OZIMIC *et al.*, 2023; ELOMDA *et al.*, 2024; KODZIK *et al.*, 2024; LI *et al.*, 2025; SUWOR *et al.*, 2025).

Sperm motility and viability generally decrease significantly after freezing and thawing, regardless of the cryoprotectant used (SALEHI *et al.*, 2020; SAHA *et al.*, 2022; ATENCIO-GARCÍA *et al.*, 2023; OZIMIC *et al.*, 2023; ELOMDA *et al.*, 2024; HUNGERFORD *et al.*, 2024; SUWOR *et al.*, 2025). Even with advances in protocols and antioxidant additives, full recovery of motility and fertility has not yet been achieved (KUMAR *et al.*, 2019; OZIMIC *et al.*, 2023; HUNGERFORD *et al.*, 2024). Cryopreservation requires specialized infrastructure, liquid nitrogen, and strict maintenance, representing high costs for many animal- and human-production systems (GRÖTTER *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019; OZIMIC *et al.*, 2023). Moreover, the need for specific equipment and supplies can limit large-scale adoption, especially in small-scale production settings (GRÖTTER *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019).

In this context, semen cooling (4-8 °C) is widely used to preserve sperm viability for hours or days, representing a more accessible and practical alternative to cryopreservation. This technique facilitates reproductive management since it eliminates the need for the male's presence or precise synchronization at the moment of fertilization, as well as reducing costs and operational complexity (LEMMA, 2011; DIAS *et al.*, 2018; WIEBKE *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2024). Although, semen cooling resolves logistical issues related to handling male gametes, its success is limited by oocyte viability. Previous studies had shown that the time between oocyte extrusion and fertilization is critical; after a few hours, oocyte quality and developmental potential decrease drastically, reducing fertilization and embryo development rates (MARTÍN-MAESTRO *et al.*, 2020; KONAR *et al.*, 2024; LEDWABA *et al.*, 2025).

O uso de crioprotetores, como glicerol, DMSO, etilenoglicol e outros, é essencial para minimizar a formação de cristais de gelo, mas pode causar toxicidade celular, afetando a integridade da membrana, o DNA e a motilidade dos espermatozoides (SAHA *et al.*, 2022; OZIMIC *et al.*, 2023; ELOMDA *et al.*, 2024; ESMERYAN *et al.*, 2025; SUWOR *et al.*, 2025). A toxicidade do glicerol, por exemplo, exige que o tempo de exposição seja limitado para evitar perda de motilidade (SAHA *et al.*, 2022). Estudos também mostram que diferentes crioprotetores apresentam efeitos variados sobre a qualidade pós-descongelamento, sendo que nenhum agente é totalmente isento de efeitos adversos (OZIMIC *et al.*, 2023; ELOMDA *et al.*, 2024; KODZIK *et al.*, 2024; LI *et al.*, 2025; SUWOR *et al.*, 2025).

A motilidade e a viabilidade dos espermatozoides geralmente diminuem significativamente após o processo de congelamento e descongelamento, independentemente do crioprotetor utilizado (SALEHI *et al.*, 2020; SAHA *et al.*, 2022; ATENCIO-GARCÍA *et al.*, 2023; OZIMIC *et al.*, 2023; ELOMDA *et al.*, 2024; HUNGERFORD *et al.*, 2024; SUWOR *et al.*, 2025). Mesmo com avanços em protocolos e aditivos antioxidantes, a recuperação total da motilidade e fertilidade ainda não é alcançada (KUMAR *et al.*, 2019; OZIMIC *et al.*, 2023; HUNGERFORD *et al.*, 2024). A criopreservação exige infraestrutura especializada, uso de nitrogênio líquido e manutenção rigorosa, o que representa custos elevados para muitas realidades de produção animal e humana (GRÖTTER *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019; OZIMIC *et al.*, 2023). Além disso, a necessidade de equipamentos e insumos específicos pode limitar a adoção da técnica em larga escala, especialmente em sistemas produtivos de menor porte (GRÖTTER *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o resfriamento do sêmen (armazenamento a 4-8 °C) é amplamente utilizado para preservar a viabilidade espermática por horas ou dias, sendo uma alternativa mais acessível e prática em relação à criopreservação. Essa técnica facilita o manejo reprodutivo, pois dispensa a presença ou sincronia exata do macho no momento da fertilização, além de reduzir custos e complexidade operacional (LEMMA, 2011; DIAS *et al.*, 2018; WIEBKE *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2024;). Apesar de resolver questões logísticas relacionadas ao manejo dos gametas masculinos, o sucesso do resfriamento seminal é limitado pela viabilidade dos ovócitos. Estudos mostram que o tempo pós-extrusão do ovócito até a fertilização é crítico: após algumas horas, a qualidade e o potencial de desenvolvimento dos ovócitos caem drasticamente, reduzindo as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário (MARTÍN-MAESTRO *et al.*, 2020; KONAR *et al.*, 2024; LEDWABA *et al.*, 2025).

Given the above, and in order to optimize this management window, the present study aimed at evaluating the fertilization rate of tambaqui oocytes at different waiting times (post-extrusion), using cooled semen without cryoprotectants.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at Piscicultura Água Santa, a commercial tambaqui production farm located in Novo Paraíso, municipality of Caracaraí, Roraima, Brazil (latitude: 1.2423; longitude: -60.4335), from September 2 to 5, 2023.

Selection of animals and hormonal induction

Five adult tambaquis were used, two males and three females, with an average age of 4 years. All individuals were microchipped for monitoring and selection of breeding crosses. The selection criteria for broodstock included characteristics such as an enlarged abdomen and a dilated, reddish genital papilla in females. Among the males, only those that released milky seminal fluid during abdominal massage were considered suitable.

The selected animals were transferred to the collection laboratory, where the broodstock were weighed. The average weight of the males was ± 5.3 kg, and the females averaged ± 7.1 kg. Broodstock were placed separately in 200 L water tanks equipped with air diffusers for oxygenation.

After separation, the hormonal inducer was prepared using natural carp pituitary extract (CPE). A dose of $0.5 \text{ mg CPE kg}^{-1}$ was administered to both females and males in the first application. After 12 hours, a second application was given: $5.0 \text{ mg CPE kg}^{-1}$ for females and $1.5 \text{ mg CPE kg}^{-1}$ for males. At the end of the induction protocol, the broodstock remained in the water tanks without manipulation until the moment of extrusion.

Em face do exposto e visando otimizar essa janela de manejo, objetivou-se com o presente estudo avaliar a taxa de fertilização de ovócitos de tambaqui em diferentes tempos de espera (pós-extrusão), utilizando sêmen resfriado sem crioprotetores.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Piscicultura Água Santa, fazenda comercial de produção de tambaquis, localizada em Novo Paraíso, município de Caracaraí, Roraima, Brasil, latitude: 1.2423 e longitude: -60.4335, no período de 02 a 05 de setembro de 2023.

Seleção dos animais e indução hormonal

Utilizou-se 5 tambaquis adultos, 2 machos e 3 fêmeas, com idade média de 4 anos, todos microchipados para controle e seleção de cruzamentos. O critério de seleção dos reprodutores e das matrizes, considerado na avaliação, incluiu características como abdômen com aumento de volume e papila genital dilatada e avermelhada nas matrizes, sendo considerados aptos, entre os reprodutores, somente aqueles que liberaram líquido seminal de aparência leitosa durante a massagem abdominal.

Os animais selecionados foram transferidos para o laboratório de coleta, onde foi realizada a pesagem dos reprodutores, cujo peso médio foi de $\pm 5,3$ kg, e das matrizes, cujo peso médio foi de $\pm 7,1$ kg. Reprodutores e matrizes foram separados em caixas d'água com 200 L de água com difusores de ar acoplados para oxigenação das caixas.

Após a separação, foi realizada a preparação do indutor hormonal feito a partir do extrato natural de hipófise de carpa (EHC), sendo utilizados $0,5 \text{ mg EHC kg}^{-1}$ para as fêmeas e machos, na primeira aplicação. Após 12 h da primeira aplicação, realizou-se uma segunda aplicação, sendo administrado $5,0 \text{ mg EHC kg}^{-1}$ para as fêmeas e $1,5 \text{ mg EHC kg}^{-1}$ para os machos. Ao término do protocolo de indução, os reprodutores permaneceram nas caixas d'água sem manipulação até o momento da extrusão.

Extrusion process and fertilization of oocytes

Nine hours after the second hormonal induction (243 degree-hours) the thermal accumulation period, which depends on the water temperature in which the fish are kept the females showed changes in swimming behavior, and the males began exhibiting mating instincts, indicating readiness for extrusion. At this point, the females were removed from the tank one by one and placed on a padded table to avoid injuries. Towels were used to facilitate immobilization and pre-drying of the animals, and paper towels were used to dry the urogenital region. Abdominal massage was then performed from head to tail to release the oocytes.

A total of 76 g of oocytes were collected and placed in a beaker on the workbench until the first waiting period of 15 minutes was completed. Semen collected from the males was stored in test tubes and refrigerated at 4 °C. Before being used in fertilization, a microscopic analysis was performed to ensure sperm inactivity.

After the 15-minute waiting period following extrusion, 2 g of oocytes were transferred with a pipette into two Petri dishes, with approximately 2,400 oocytes per dish (STREIT JÚNIOR *et al.*, 2012). The amount of semen used for fertilization corresponded to one-third of the quantity of oocytes. After fertilization, the gametes were gently homogenized to avoid damaging the eggs and to maximize contact between sperm and eggs. Incubator water was then added to start the hydration of the oocytes and the activation of the sperm. According to Zaniboni Filho and Weingartner (2007), sperm remained immobile inside the testes due to the high concentration of potassium in the cells; when they come into contact with water, the potassium is diluted and the sperm become activated.

The fertilization process was monitored with a digital stopwatch, marking the preparation times for the Petri dishes with predefined waiting intervals of 15, 30, 45, 60, and 80 minutes (Figure 1). All dishes underwent the same procedure, with two dishes for each waiting time, to assess variation in fertilization rates across different waiting periods. To ensure embryonic development-from the initial stages to gastrulation -the water in the Petri dishes was replaced every 20 minutes, since their capacity was only 50 mL, which could compromise embryonic development if the water were not renewed.

Processo de extrusão e fertilização dos ovócitos

Ao completar 9 h após a segunda aplicação da indução hormonal (243 horas-grau), que é o período de acumulação térmica e que vai depender da temperatura em que os peixes estão sendo mantidos, as matrizes mudaram o comportamento natatório; e os reprodutores começaram a apresentar instintos de acasalamento, dando sinais de preparação para extrusão. Nesse momento, as fêmeas foram retiradas uma por uma da caixa d'água e acomodadas em uma mesa acolchoada para evitar lesões. Foram utilizadas toalhas para facilitar a imobilização e pré-secagem dos animais e papel toalha para secar a região urogenital, em seguida foi realizada massagem no abdômen das fêmeas no sentido craniocaudal para a liberação dos ovócitos.

Foram selecionados 76 g de ovócitos e colocados em *Becker* sobre a bancada de trabalho até completar o primeiro tempo de espera, 15 minutos. O sêmen coletado dos machos foi acondicionado em tubos de ensaio e refrigerados a uma temperatura de 4 °C e, antes de ser utilizado na fertilização, realizou-se uma análise microscópica para a avaliação da inatividade dos espermatozoides. Após completar 15 min de espera, desde a extrusão, realizou-se a adição de 2 g de ovócitos com uma pipeta em duas placas de Petri, com aproximadamente 2.400 ovócitos por placa (STREIT JÚNIOR *et al.*, 2012). A proporção da dose de sêmen utilizada para a fertilização equivalia a 1/3 da quantidade de ovócitos. Após a fertilização, os gametas foram cuidadosamente homogeneizados para não prejudicar a qualidade dos ovos e obter o maior contato possível entre espermatozoides e óvulos, em seguida foi adicionada água da incubadora para iniciar o processo de hidratação dos ovócitos e ativação dos espermatozoides. Segundo Zaniboni Filho e Weingartner (2007), os espermatozoides são imóveis no interior dos testículos devido a elevada concentração de potássio presente nas células, assim, quando entra em contato com a água, o potássio é diluído e os espermatozoides são ativados.

O processo de fertilização foi monitorado com cronômetro digital marcando o tempo para a preparação das placas com os tempos de espera predefinidos 15; 30; 45; 60 e 80 min (Figura 1). Todas as placas passaram pelo mesmo procedimento, sendo duas placas para cada tempo de espera, com o intuito de avaliar a variação da taxa de fertilização nos diferentes tempos de espera. Para garantir o desenvolvimento embrionário, das primeiras fases de evolução até a gastrulação, a água introduzida nas placas de *petri* era substituída a cada 20 min, pois a capacidade era de apenas 50 mL, o que poderia prejudicar o desenvolvimento embrionário caso não houvesse renovação de água.

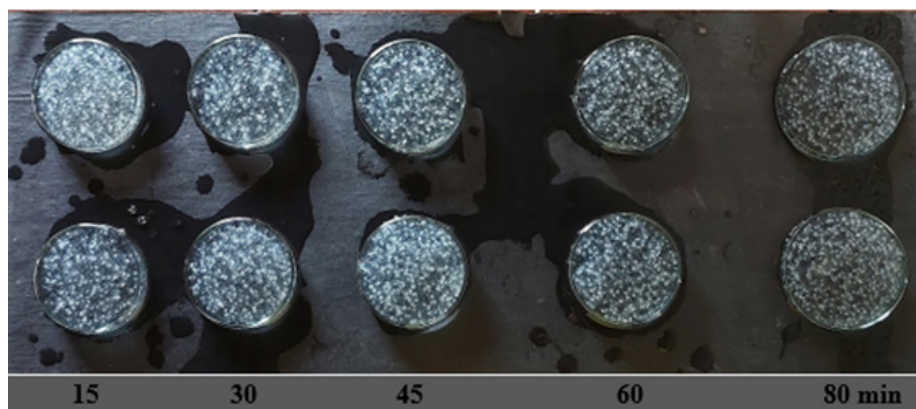


Figure 1 - Waiting times for assessing the fertilization rate of tambaqui using cooled semen without cryoprotectants.

Figura 1 - Tempos de espera para avaliação da taxa de fertilização de tambaqui com sêmen resfriado sem crioprotetores.

After completing 6 hours following the first fertilization, the fertilization rate of each plate was evaluated at the defined time intervals. Random samples of oocytes were collected using a pipette, obtaining approximately 4 mL of material per plate. The collected material was separated for counting infertile or unfertilized oocytes and fertilized oocytes, with fertilized ones being those that reached final gastrulation or blastopore closure. To determine the fertilization rate, the following equation (1) was used.

Ao completar 6 h após a primeira fertilização, foi avaliada a taxa de fertilização de cada placa nos intervalos de tempo definidos, realizando-se a coleta aleatória dos ovócitos com o auxílio de uma pipeta, obtendo-se aproximadamente 4 mL de material por placa. O material coletado foi separado para a contagem de ovócitos inférteis ou não fecundados e ovócitos fecundados, sendo considerados fecundados aqueles que chegaram a gastrulação final ou fechamento do blastoporo. Para determinação da taxa de fertilização, utilizou-se a seguinte equação (1).

$$\text{Fertilization Rate} = \frac{\text{Number of Fertilized Eggs}}{\text{Total Number of Eggs Collected}} \times 100 \quad \text{Equation (01)}$$

Climatic characterization and water quality

The characterization of the rearing system was assessed throughout the entire experimental period based on data for dew point temperature (°C), air temperature (°C), wet-bulb temperature (°C), wind speed (m s⁻¹), relative humidity (%), and precipitation (mm h⁻¹), obtained from the NASA Power Ceres climate information system.

Temperature was monitored during the waiting period, and simultaneously, dissolved oxygen (O₂) in the plates was measured using a portable oximeter, model EcoSense ODO200. The parameters of alkalinity (mg L⁻¹), hardness (mg L⁻¹), pH, and ammoniacal nitrogen concentration (mg L⁻¹) were determined using commercial colorimetric methods (Labcon).

Caracterização climática e qualidade de água

A caracterização do sistema de criação foi avaliada durante todo o período experimental a partir dos dados de temperatura de ponto de orvalho (°C), temperatura do ar (°C), temperatura de bulbo úmido (°C), velocidade do vento (m s⁻¹), humidade relativa (%) e precipitação (mm h⁻¹), compilados no sistema de informações climáticas *NASA Power Ceres*.

A temperatura foi monitorada durante o período de espera e, simultaneamente, realizou-se a medição do oxigênio dissolvido (O₂) nas placas, utilizando-se um oxímetro portátil modelo EcoSense ODO200. Os parâmetros de alcalinidade (mg L⁻¹), dureza (mg L⁻¹), pH e quantidade de nitrogênio amoniacal (mg L⁻¹) foram determinados por métodos colorimétricos comerciais (Labcon).

Data analysis

The data for the variables fertilized eggs, unfertilized eggs, and waiting time for fertilization were analyzed using a single-factor ANOVA procedure. Mean comparisons were performed using Tukey's test with 95% confidence interval using the software VassarStats: Website for Statistical Computation. The climatic condition data were analyzed using a single-factor ANOVA procedure, considering environmental variables versus time of day to characterize the climate of the study location. Mean comparisons were performed using Tukey's test with 95% confidence interval, using MiniTab 19 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Climatic characterization and water quality

The results of the climatic characterization of the site during the study period are presented in Table 1. The highest air temperature occurred in the afternoon, reaching a maximum of 29.81 °C, while the morning (27.34 °C) and night (26.26 °C) showed no differences. For dew point temperature (DP), a difference was observed in the morning (24.74 °C), while in the afternoon (25.65 °C) and at night (25.39 °C), no difference occurred. For wet-bulb temperature (WB), the difference appeared only during the warmest period (afternoon: 27.73 °C) compared to the cooler periods, morning (26.01 °C) and night (25.80 °C). Wind speed differed between morning and afternoon (0.92 m s⁻¹ and 0.75 m s⁻¹) and between morning and night (0.92 m s⁻¹ and 1.09 m s⁻¹). Relative humidity differed among the three periods (morning: 86.45%; afternoon: 78.31%; night: 95.10%). For precipitation, differences were observed between morning (0.04 mm h⁻¹) and night (0.07 mm h⁻¹), as well as between morning (0.04 mm h⁻¹) and afternoon (0.09 mm h⁻¹).

Average air temperatures in the Amazon region range between 24 and 26 °C, with an annual amplitude of 1 to 2 °C. In the present study, an increase in temperature was observed in the afternoon, with an average of 29.81 ± 0.70 °C (Table 1), values commonly recorded throughout the entire year. This behavior is due to the high levels of solar radiation throughout the year (NOBRE *et al.*, 2009). All the studied climatic variables are related to their respective times of day, showing that in the morning and at night, temperatures were milder, providing a favorable environment to ensure the well-being of male and female broodstock.

Análise de dados

Os dados das variáveis de ovos fecundados, ovos não fecundados e o tempo de espera na fertilização foram analisados pelo procedimento ANOVA de fator único. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey com 95% de confiança e calculados com auxílio do software VassarStats: Website for Statistical Computation. Os dados das condições climáticas foram analisados pelo procedimento ANOVA de fator único, considerando as variáveis ambientais *versus* o horário para caracterização climática do local do estudo. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey com 95% de confiança, calculados com auxílio do software MiniTab 19.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização climática e qualidade de água

Os resultados de caracterização climática do local no período de estudo são apresentados na Tabela 1. A maior temperatura do ar ocorreu no período da tarde, com máxima de 29,81 °C, enquanto manhã (27,34 °C) e noite (26,26 °C) não apresentaram diferenças. Para a temperatura de ponto de orvalho (PO), houve diferença no horário da manhã (24,74 °C); e nos períodos da tarde (25,65 °C) e noite (25,39 °C), não ocorreu diferença. Para a temperatura de bulbo úmido (BU), a diferença foi somente no horário de maior temperatura (tarde 27,73 °C) e nos horários mais frescos, manhã, (26,01 °C) e noite (25,80 °C). A velocidade do vento teve diferença entre manhã e tarde (0,92 m s⁻¹ e 0,75 m s⁻¹) e manhã e noite (0,92 m s⁻¹ e 1,09 m s⁻¹). A umidade relativa apresentou diferença entre os três períodos (manhã 86,45; tarde 78,31 e noite 95,10 %). Para precipitação as diferenças foram entre manhã (0,04 mm h⁻¹) e noite (0,07 mm h⁻¹), tendo também diferença entre manhã (0,04 mm h⁻¹) e tarde (0,09 mm h⁻¹).

As temperaturas médias do ar na região amazônica variam entre 24 e 26 °C, apresentando amplitude anual de 1 a 2 °C. No presente estudo, observou-se elevação da temperatura no período da tarde, com média de 29,81 ± 0,70 °C (Tabela 1), valores comuns obtidos ao longo de quase todo o ano. Esse comportamento se deve aos altos valores de radiação solar incidente ao longo do ano (NOBRE *et al.*, 2009). Todas as variáveis climáticas estudadas estão relacionadas aos respectivos horários, demonstrando que no período da manhã e da noite as temperaturas encontravam-se mais amenas, proporcionando um ambiente positivo para garantir o bem-estar das matrizes e reprodutores.

Table 1 - Climatic variables during the study of the fertilization rate of tambaqui using chilled semen without cryoprotectants

Tabela 1 - Variáveis climáticas durante o estudo da taxa de fertilização de tambaqui com sêmen resfriado sem crioprotetores

Climatic Conditions			
Time (h)	Air Temperature (°C)	IC of 95%	Adjusted p value
Morning	27.34±2.30 B	(26.634; 28.05)	0.1160
Eveninig	26.26±0.81 B	(25.454; 27.06)	0.0001
Afternoon	29/81±0.70 A	(29.103; 30.52)	0.0001
Time (h)	Dew point Temperature (°C)	IC of 95%	Adjusted p value
Morning	24.75±0.54 B	(24.46; 25.03)	0.0110
Eveninig	25.39±0.50 A	(25.07; 25.71)	0.0001
Afternoon	25.65±0.72 A	(25.31; 25.94)	0.4510
Time (h)	Wet-bulb Temperature(°C)	IC of 95%	Adjusted p value
Morning	26.02±1.31 B	(25.61; 26.43)	0.7600
Eveninig	25.80±0.51 B	(25.34; 26.27)	0.0001
Afternoon	27.74±0.22 A	(27.33; 28.14)	0.0001
Time (h)	Wind speed (m/s)	IC of 95%	Adjusted p value
Morning	0.93±0.21 AB	(0.82; 1.03)	0.100
Eveninig	1.10±0.20 A	(0.97; 1.21)	0.050
Afternoon	0.75±0.24 B	(0.65; 0.86)	0.001
Time (h)	Relative Humidity (%)	IC of 95%	Adjusted p value
Morning	86.45±9.90 B	(83.03; 89.87)	0.0040
Eveninig	95.10±2.53 A	(91.23; 98.98)	0.0040
Afternoon	78.31±6.50 C	(74.89; 81.73)	0.0001
Time (h)	Precipitation (mm/h)	IC of 95%	Adjusted p value
Morning	0.04±0.03 B	(0.02; 0.07)	0.323
Eveninig	0.07±0.04 AB	(0.04; 0.09)	0.010
Afternoon	0.09±0.07 A	(0.07; 0.12)	0.335

Means that have the same letters are not different at 95% confidence interval.

Médias que apresentam letras iguais não são diferentes a 95% de confiança.

Water quality monitoring was conducted during the preparation of females and males, recording an average temperature of 28 °C throughout the process. Temperatures close to 28 °C correspond to an ideal temperature for cultivating tropical species such as tambaqui. For successful reproduction of tambaqui, the ideal temperature ranges between 26 and 29 °C (AMARAL JUNIOR, 2017). Accordingly, egg quality is influenced by temperature, especially during reproduction and spawning periods. Both high and low temperatures can compromise egg quality, depending on the species (BOBE; LABBÉ, 2010; MORAIS *et al.*, 2020).

O monitoramento da qualidade da água foi realizado durante o preparo das fêmeas e machos, registrando-se temperatura média de 28 °C ao longo de todo o processo. Temperaturas próximas aos valores de 28 °C correspondem a uma temperatura ideal para o cultivo de espécies tropicais como tambaqui. Já condições de temperaturas para o sucesso da reprodução de tambaqui estão em uma faixa ideal entre 26 e 29 °C (AMARAL JUNIOR, 2017). A partir disso, a qualidade dos ovos é influenciada pela temperatura, especialmente durante os períodos de reprodução e desova. Tanto temperaturas elevadas quanto baixas podem comprometer a qualidade dos ovos, variando conforme a espécie (BOBE; LABBÉ, 2010; MORAIS *et al.*, 2020).

Monitoring the water temperature in which the broodstock are housed affects the spawning process, either accelerating or delaying ovulation. Therefore, it is important to monitor and evaluate water temperature (degree-hour) during the hormonal induction protocol to determine the most suitable moment for oocyte extrusion. Optimal temperatures should be maintained to achieve the required degree-hour (H°) count necessary for oocyte extrusion. According to Souza and Castro (2014), the average values of thermal accumulation over time (hours) during the period ranged from 221 to 253 H° , a range considered optimal for reproduction. In addition, temperature also provides advantages regarding fertilization rate. Seignani et al. (2020) reported that the thermal accumulation (H°) required for oocyte extrusion in tambaqui broodstock was approximately 243 H° .

The measured water variables were: dissolved oxygen 9.91 mg L⁻¹, pH 8, ammonia 2.4 mg L⁻¹, alkalinity 63 mg L⁻¹, and hardness 48 mg L⁻¹. Moro et al. (2013) reported similar results for the parameters evaluated, such as dissolved oxygen, stating that for species living in cold waters, ideal values are above 5.0 mg L⁻¹, whereas for species from warmer environments, such as tropical species, the ideal concentration is above 3.0 mg L⁻¹. The same authors noted that optimal pH values range from 6.5 to 8.5, while hardness and alkalinity can be considered ideal above 40 mg L⁻¹ of CaCO₃.

Fertilization rate viability

The results of the fertilization rate assessment are shown in Table 2. The values for fertilization rate varied significantly across different waiting times. The highest rates were observed at 15 min (87.02%) and 30 min (86.80%), which did not differ from each other. Next were the 45 min (84.10%) and 60 min (84.08%) times, which also did not differ from each other but were lower than the shorter waiting times. The lowest fertilization rate was recorded at 80 min (76.97%), statistically different from the others ($p \leq 0.05$).

O monitoramento da temperatura da água em que os reprodutores são alojados tem influência no processo de desova, acelerando ou adiando o processo de ovulação. Diante disso, é importante monitorar e avaliar a temperatura da água (hora-grau) durante o protocolo de indução hormonal, a fim de determinar o momento mais adequado para a extrusão dos ovócitos. As temperaturas ótimas devem ser preconizadas com o intuito de alcançar a contagem de hora-grau (H°), exigidas pelas matrizes para extrusão de ovócitos. Conforme relatado por Souza e Castro (2014), a média dos valores de acúmulo térmico ao longo do tempo (horas), avaliada no período, variou de 221 a 253 H° , faixa considerada ótima para a reprodução. Além disso, a temperatura também possibilita vantagens em relação à taxa de fertilização. Segundo Seignani et al. (2020), o acúmulo térmico (H°) necessário para a extrusão dos ovócitos de reprodutoras de tambaqui foi de aproximadamente 243 H° .

As variáveis oxigênio dissolvido foram 9,91 mg L⁻¹, pH 8, amônia 2,4 mg L⁻¹, alcalinidade 63 mg L⁻¹ e dureza 48 mg L⁻¹. Moro et al. (2013) apresentam resultados semelhantes em relação aos parâmetros avaliados, como o oxigênio dissolvido, afirmando que, para espécies que habitam em águas frias, os valores ideais são superiores a 5,0 mg L⁻¹, enquanto para espécies de ambientes mais quentes, como os tropicais, a concentração ideal é superior a 3,0 mg L⁻¹. O mesmo autor ressaltou que, para o pH, os valores ótimos variam entre 6,5 e 8,5, enquanto a dureza e a alcalinidade podem ser consideradas ideais acima de 40 mg L⁻¹ de CaCO₃.

Viabilidade da taxa de fertilização

Os resultados da avaliação da taxa de fertilidade encontram-se na Tabela 2. Os valores apontados para a taxa de fertilização variaram significativamente entre os diferentes tempos de espera. Os melhores índices foram observados nos tempos de 15 min (87,02%) e 30 min (86,80%), que não diferiram entre si. Em seguida, apresentaram-se os tempos de 45 min (84,10%) e 60 min (84,08%), que também não diferiram entre si, mas foram inferiores aos tempos de espera mais curtos. A menor taxa de fertilização foi registrada no tempo de espera de 80 min (76,97%), diferindo estatisticamente dos demais ($p \leq 0,05$).

Table 2 - Effect of the waiting time (WT) of fertilized eggs on the fertilization rate of tambaqui using chilled semen without cryoprotectants

Tabela 2 - Efeito do tempo de espera (TE) dos ovos fecundados na taxa de fertilização de tambaqui com sêmen resfriado sem crioprotetores

	Number of fertilized eggs				
	15 min	30 min	45 min	60 min	80 min
	TE (min)				
Means	55.50	50.00	37.00	45.00	42.00
Std.Dev.	9.19	7.07	7.07	5.65	16.97
Std.Err.	6.50	5.00	5.00	4.00	12.00
	Number of unfertilized eggs				
	15 min	30 min	45 min	60 min	80 min
Means	8.50	7.50	7.00	8.50	13.00
Std.Dev.	3.53	0.70	1.41	0.70	7.07
Std.Err.	2.50	0.50	1.00	0.50	5.00
	Fertilization rate (%)				
	15 min	30 min	45 min	60 min	80 min
Means	87.02 A	86.80 AB	84.10 B	84.08 B	76.97 C
Std.Dev.	2.94	2.68	0.14	0.57	2.78
Std.Err.	2.09	1.90	0.10	0.41	1.97

Means that have the same letters are not different at the 95% confidence level. TE: tempo de espera (waiting time).

Médias que apresentam letras iguais não são diferentes a 95% de confiança. TE: tempo de espera.

The high fertilization rates obtained contribute to the elevated hatching rates, demonstrating the efficiency of the technique in relation to the times employed and the use of chilled semen. It also shows that the tambaqui's female gamete is capable of withstanding an 80-minute waiting period before fertilization without the need for preservation techniques and still achieving success in the reproductive process. According to Leal *et al.* (2020), achieving good fry production requires reproductive efficiency and high fertilization rates. The fertilization rates found by Menezes *et al.* (2008) were 76% and 88% when using propylene glycol and ethylene glycol protectants, respectively. Similar values were found in this study without the use of cryoprotectants. Leite *et al.* (2013), when determining the insemination dose, reported a fertilization rate of 84%, which supports the values highlighted in this study.

As altas taxas de fertilização obtidas contribuem para os elevados valores na taxa de eclosão, demonstrando a eficiência da técnica em função dos tempos empregados e do uso de sêmen resfriado. Evidencia, ainda, que o gameta feminino do tambaqui tem capacidade de suportar 80 min de espera até o momento da fertilização sem a necessidade de técnicas de preservação e com sucesso no processo reprodutivo. Segundo Leal *et al.* (2020), para se alcançar boa produção de alevinos é necessário eficiência reprodutiva e taxas de fertilização elevadas. As taxas de fertilização encontradas por Menezes *et al.* (2008) foram de 76% e 88%, com o uso de protetores propilenoclicol e etilenoglicol, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados neste trabalho sem o uso de crioprotetores. Já Leite *et al.* (2013), ao determinarem a dose inseminante, encontraram taxa de fertilização de 84%, o que confirma os valores destacados no presente estudo.

This ability to maintain efficiency even during longer waiting periods allows the use of female gametes and chilled semen in locations where the distance corresponds to the times addressed in this study. This characteristic benefits small fish farmers who do not have broodstock on their properties, reducing the costs of acquiring broodstock (SANTOS; SOUSA, 2015) and ensuring greater genetic variability for production through the selection of tested and improved broodstock (FERREIRA *et al.*, 2023).

The results confirmed that tambaqui female gametes can withstand an 80-minute waiting period before fertilization with chilled semen, without the use of cryoprotectants, while maintaining their efficiency and ensuring embryonic viability after extrusion, thus confirming the viability of the oocytes. However, the region's climatic characteristics—marked by high temperatures and elevated humidity—and water quality must be taken into account (NOBRE *et al.*, 2009; SANCHES *et al.*, 2015; O'GORMAN *et al.*, 2016; ORELLANA *et al.*, 2020) when reproducing tambaqui.

CONCLUSIONS

The use of chilled semen without the addition of cryoprotectants is viable for fertilizing tambaqui oocytes, yielding high fertilization rates even after different oocyte waiting times.

Waiting periods of 15 and 30 minutes maintained the highest fertilization rates, with reductions after longer intervals.

These findings indicate that although chilled semen can be used efficiently, determining the ideal time between oocyte collection and fertilization is essential to maximize reproductive success in tambaqui culture.

Essa capacidade de manter a eficiência mesmo em tempos de espera mais elevados permite o uso do gameta feminino e do sêmen resfriado em localidades com uma distância semelhante aos tempos abordados neste estudo. Tal característica favorece a multiplicação por pequenos piscicultores que não dispõem de matrizes ou reprodutores em suas propriedades, reduzindo os custos de aquisição dos reprodutores (SANTOS; SOUSA, 2015) e garantindo maior variabilidade genética para produção, por meio da seleção de reprodutores testados e melhorados (FERREIRA *et al.*, 2023).

Os resultados encontrados confirmam que os gametas femininos de tambaqui suportam passar por um período de espera de 80 min até o momento da fertilização com sêmen resfriado sem o uso de crioprotetores, mantendo sua eficiência e garantindo a viabilidade embrionária após a extrusão, comprovando a viabilidade dos ovócitos. No entanto, as características climáticas da região, que se destacam por altas temperaturas e elevada umidade, e a qualidade da água devem ser consideradas (NOBRE *et al.*, 2009; SANCHES *et al.*, 2015; O'GORMAN *et al.*, 2016; ORELLANA *et al.*, 2020) na reprodução dos tambaquis.

CONCLUSÕES

O uso de sêmen resfriado sem a adição de crioprotetores é viável para a fertilização de ovócitos de tambaqui, apresentando altas taxas de fertilização mesmo após diferentes tempos de espera dos ovócitos;

Os tempos de espera de 15 e 30 minutos mantiveram as melhores taxas de fertilização, com redução após os períodos mais prolongados;

Esses achados indicam que, embora o sêmen resfriado possa ser utilizado de forma eficiente, a definição do tempo ideal entre a coleta dos ovócitos e a fertilização é fundamental para maximizar o sucesso reprodutivo no cultivo do tambaqui.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- AMARAL JUNIOR, P. **Avaliação dos parâmetros reprodutivos de reprodutores de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818)**. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.
- ATENCIO-GARCÍA, V.; PADILLA-IZQUIERDO, D.; ROBLES-GONZÁLEZ, J.; PRIETO-GUEVARA, M.; PARDO-CARRASCO, S.; ESPINOSA-ARAUJO, J. Damage to *Sorubim cuspicaudus* sperm cryopreserved with ethylene glycol. *Animals*, v. 13, n. 2, p. 235, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13020235>
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- RIBEIRO DIAS, E. A.; CAMPANHOLI, S. P.; ROSSI, G. F.; FREITAS DELL'AQUA, C. D. P.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; MONTEIRO, F. M. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 102-111, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>
- ELOMDA, A. M.; MEHAISEN, G. M.; STINO, F. K.; SAAD, M. F.; GHALY, M. M.; PARTYKA, A.; NASSAR, F. S. The characteristics of frozen-thawed rooster sperm using various intracellular cryoprotectants. *Poultry Science*, v. 103, n. 11, p. 104190, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104190>
- ESMERYAN, K.; FEDCHENKO, Y.; CHAUSHEV, T. Probing the impact of commercial cryoprotectants and freezing technique on the motility of human spermatozoa cryopreserved onto extremely water-repellent soot-coated surfaces. *Cryobiology*, v. 118, p. 105195, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2025.105195>
- FERREIRA, C. S. M.; VENEZA, I. B.; MARTINS CORDEIRO, C. A.; GOMES, G. F. E. Baixa diversidade genética em centros de reprodução do tambaqui *Colossoma macropomum* no Brasil: uma revisão. *Engenharia de Pesca: O Avanço da Ciência no Brasil*, v. 1, n. 1, p. 36-51, 2023. DOI: <https://doi.org/10.37885/230312469>
- GRÖTTER, L. G.; CATTANEO, L.; MARINI, P. E.; KJELLAND, M. E.; FERRÉ, L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 54, p. 655-665, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E.; VALLADÃO, G. M. R.; ZAMINHAN-HASSEMER, M.; HASHIMOTO, D. T.; DAIRIKI, J. K.; CYRINO, J. E. P. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: from Amazonian waters to sustainable production. *Reviews in Aquaculture*, v. 14, n. 2, p. 993-1027, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.1263>
- HUNGERFORD, A.; BAKOS, H.; AITKEN, R. Addition of Vitamin C mitigates the loss of antioxidant capacity, vitality and DNA integrity in cryopreserved human semen samples. *Antioxidants*, v. 13, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13020247>
- KONAR, E. S. M.; MAI, K.; BRACHS, S.; WAGHMARE, S. G.; SAMARIN, A. M.; POLICAR, T.; SAMARIN, A. M. Evaluation of viability, developmental competence, and apoptosis-related transcripts during in vivo post-ovulatory oocyte aging in *Danio rerio*. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 11, p. 1389070, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1389070>
- KUMAR, A.; PRASAD, J. K.; SRIVASTAVA, N.; GHOSH, S. K. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, v. 17, n. 6, p. 603-612, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- LEAL, V. G. B.; FREITAS, R. A.; SILVA HIPY, A.; ALMEIDA, F. F. L.; OLIVEIRA, A. T.; ARIDE, P. H. R.; PANTOJA-LIMA, J. Avaliação do desempenho zootécnico de linhagens melhoradas de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) na Amazônia central. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 11, n. 5, p. 227-236, 2020. DOI: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2020.005.0022>

LEDWABA, M. R.; O'NEILL, H. A.; THEMA, M. A.; MAQHASHU, A.; MPHAPHATHI, M. L. Techniques for in vitro fertilisation of vitrified cattle oocytes: challenges and new developments. *Agriculture*, v. 15, n. 4, p. 363, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture15040363>

LEITE, L. V.; MELO, M. A. P.; OLIVEIRA, F. C. E.; PINHEIRO, J. P. S.; CAMPELLO, C. C.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 2, p. 421-429, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200018>

LEMMMA, A. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: **Artificial Insemination in Farm Animals**, v. 12, p. 191-216, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5772/16563>

LIMA, A. F.; MORO, G. V.; KIRSCHNIK, L. N. G.; BARROSO, R. M. Reprodução, larvicultura e alevinagem de peixes. In: RODRIGUES, A. P. O. et al. (Ed.). **Piscicultura de Água Doce: Multiplicando Conhecimentos**. Brasília: Embrapa, cap. 9, p. 301-346, 2013.

MARTÍN-MAESTRO, A.; SÁNCHEZ-AJOFRÍN, I.; MASIDE, C.; PERIS-FRAU, P.; MEDINA-CHÁVEZ, D. A.; CARDOSO, B.; SOLER, A. J. Cellular and molecular events that occur in the oocyte during prolonged ovarian storage in sheep. *Animals*, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10122414>

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J. D.; DORIA, C. R. D. C.; MENEZES JR, J. B. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amazonica*, v. 38, n. 2, p. 365-368, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000200023>

MORAIS, I. D. S.; REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L. The influence of the water pH on the sex ratio of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture Reports*, v. 17, p. 100334, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100334>

MORO, G. V.; TORATI, L. S.; LUIZ, D. D. B.; MATOS, F. T. Monitoramento e manejo da qualidade de água. In: RODRIGUES, A. P. O. et al. (Ed.). **Piscicultura de Água Doce: Multiplicando Conhecimentos**. Brasília: Embrapa, cap. 5, p. 141-169, 2013.

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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000600001>

NOBRE, C. A.; MARENGO, J. A.; ARTAXO, P. Characteristics of Amazonian climate: main features. *Amazonia and Global Change*, v. 186, p. 149-162, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1029/2009GM000903>

NUNES, L. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; REIS, F. Y. T.; NERES, R. W. P.; SILVA, S. Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 42, n. 1, p. 15-21, 2018.

O'GORMAN, E. J.; ÓLAFSSON, Ó. P.; DEMARS, B. O.; FRIBERG, N.; GUÐBERGSSON, G.; HANNESDÓTTIR, E. R.; GÍSLASON, G. M. Temperature effects on fish production across a natural thermal gradient. *Global Change Biology*, v. 22, p. 3206-3220, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.13233>

ORELLANA, J. B. P.; ORELLANA, B. B. M. A.; SEGOVIA, J. F. O. Caracterização das condições climáticas na Amazônia. In: SEGOVIA, J. F. O. (Ed.). **Floricultura Tropical: Técnicas e Inovações para Negócios Sustentáveis na Amazônia**. Brasília: Embrapa, cap. 2, p. 33-42, 2020.

OZIMIC, S.; BAN-FRANGEZ, H.; ŠTIMPFEL, M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 45, p. 4716-4734, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>

SAHA, A.; ASADUZZAMAN, M.; BARI, F. Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary Medicine International*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/7378379>

SALEHI, M.; MAHDAVI, A. H.; SHARAFI, M.; SHAHVERDI, A. Cryopreservation of rooster semen: evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm. *Theriogenology*, v. 142, p. 15-25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.030>

SANCHES, E. A.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C. P. R.; BOMBARDELLI, R. A. Effects of water pH on gamete activation, embryonic development, and larval normality in *Prochilodus lineatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 4, p. 2871-2880, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n4p2871>

SANTOS, A. M.; SOUSA, R. G. C. Monitoramento do desempenho reprodutivo do tambaqui cultivado em Presidente Médici (Rondônia). **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 3, p. 13-20, 2015.

SANTOS, R. P.; SILVA, A. M.; PEREIRA, A. G.; CAVALCANTE, Y. C.; MATOS, Y. G.; BEZERRA, G. S.; SILVA, A. R. Effect of diluents and storage time on the cryopreservation of Pecari tajacu semen after cooling storage in a transport container at 5 °C. **Animals**, v. 14, n. 6, p. 934, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani14060934>

SEVIGNANI, D.; BUZZACARO, E.; FORTUNA, N. B. Monitoring the time-grade required for extrusion of oocytes reproductive from *Colossoma macropomum*. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 6, p. 57-63, 2020. DOI: <http://doi.org/10.36560/1362020946>

SOUZA, R. G. C.; CASTRO, A. L. Adequação do uso da hora grau (HG) em horas contínuas para a reprodução de tambaqui na região do Baixo Amazonas. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 1, p. 75-80, 2014.

STREIT JUNIOR, D. P.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; GALO, J. M.; GUERREIRO, L. R. J.; OLIVEIRA, D. D.; MELANIE DIGMAYER, U. E. M. **Recomendações Técnicas para a Reprodução do Tambaqui**. 1. ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2012. 30 p.

SUWOR, F.; KUBOTA, S.; NAWONG, S.; THUANGSANTHIA, A.; TOYRA, M.; PAENGKOUM, P.; PONCHUNCHOOVONG, S. Effects of cryoprotectant combinations on post-thawed sperm quality, biomolecular changes, DNA methylation, and pregnancy rates in Boer goat semen. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, p. 178, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci12020178>

WIEBKE, M.; HENSEL, B.; NITSCHKE-MELKUS, E.; JUNG, M.; SCHULZE, M. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106822, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>

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.