



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU (IBB-UNESP)

Departamento de Zoologia

**OCORRÊNCIA DE GAMETAS NÃO REDUZIDOS EM HÍBRIDOS DE *Astyanax*
altiparanae E *Astyanax schubarti***

Gabriel Marra Schade

Botucatu - SP

2020

OCORRÊNCIA DE GAMETAS NÃO REDUZIDOS EM *Astyanax altiparanae* E *Astyanax schubarti*

Gabriel Marra Schade

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer a meus pais, Andréa Marra e Nelson Schade Filho, e irmão Iago Marra Schade, por me apoiarem em todas as ideias e caminhos que escolhi, sempre incentivando novas experiências e escutando com atenção e carinho as histórias.

Ao meu Orientador, Dr. George Shigueki Yasui, por todo o conhecimento compartilhado e pela oportunidade oferecida, que me fez crescer muito como pessoa.

Ao meu Pai Acadêmico e coorientador, Prof. Dr. Roberto Artoni, que desde o primeiro ano da graduação confiou e me recebeu como parte do seu grupo por quatro anos de parceria e amizades, me guiando nos caminhos que me trouxeram até aqui.

Aos meus amigos, Amanda Pereira, Bruna Machado, Daiane Niedzielski, Dilberto Arashiro, Gabriella Braga, Geovanna Coelho, Gustavo Shiguemoto, Hatus Siqueira, Jhennifer Gomes, Lucia Lopes, Márcio Barragana, Milena Chaguri, Nathalia Alcântara, Natalia Greice, Nivaldo Nascimento, Nycolas Levy, Rafaela Bertollini, Raphael Costa e Talita Lázaro, que fizeram parte de minha família e compartilharam desta jornada.

Aos amigos, Emy Yano, Juliana Dias e Valter Franson que, mesmo de passagem, fizeram parte e melhoraram essa história.

Aos Doutores José Augusto Senhorini e Paulo Monzani que, além de exemplos, foram grandes amigos.

Aos funcionários do CEPTA, Lino, Noel, Tim, Daltão, Pilão, Nilva, Claudine, Rosalia, Júnior, Reizão, Valdeir e Edmilson por todas as brincadeiras, conversas e amizade.

Aos amigos multiespécies, Jully Anderson, Tobias, Pedro, Celino, Morfética, Kevin, Tabasco, Quimera, Judite e tantos outros.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental, por toda a estrutura, moradia, parceira com o projeto e todas as experiências incríveis e inesquecíveis que tive na instituição

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)
- Código de Financiamento 88887.341931/2019-00, pelo financiamento do trabalho

Obrigado, de coração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Coleta dos reprodutores	8
3.2 Coleta dos gametas e reprodução in vitro	9
3.3 Reprodução Seminatural.....	10
3.4 Desenvolvimento embrionário.....	10
3.5 Larvicultura.....	10
3.6 Análises de qualidade espermática	11
3.7 Verificação de ploidia	11
3.8 Citogenética de cultivo celular	12
3.9 Confecção das lâminas de citogenética.....	13
3.10 Análises estatísticas.....	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Desenvolvimento embrionário.....	14

4.2	Ploidia e conteúdo de DNA	16
4.3	. Qualidade espermática	16
4.4	Cultivo celular.....	20
4.5	Citogenética	20
5.	DISCUSSÃO.....	21
5.1	Reprodução seminatural e in vitro	21
5.2	Análise de ploidia	23
6.	CONCLUSÃO	24
7.	REFERÊNCIAS.....	24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análises de viabilidade de machos controle (A, B), híbridos interpopulacionais (D, E, G, H) e híbridos interespecíficos (J, K), pareados com ploidia do sêmen (C, F, I, L). 1n = haploide, 2n = diploide, 4n=tetraploide..... 19
- Figura 2.** Cultivo de fibroblastos de *Astyanax schubarti*. (A) Células fibroblásticas proliferando a partir do fragmento de nadadeira. (B) Células fibroblásticas em 80% confluência. Barra representa 500 μ m..... 20
- Figura 3.** Cariótipos correspondentes às espécies *Astyanax altiparanae* (A) com 2n = 50 cromossomos, *Astyanax schubarti* (B) com 2n = 36 cromossomos e dos híbridos interespecíficos (C) com 2n = 43 cromossomos..... 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sobrevivência (%) nos estágios de duas células, blástula, gástrula, somito e eclosão; média de larvas normais e anormais do grupo controle e híbridos interespecíficos (<i>A. altiparanae</i> x <i>A. schubarti</i>) por reprodução in vitro.....	15
Tabela 2. Sobrevivência (%) nos estágios de duas células, blástula, gástrula, somito e eclosão; média de larvas normais e anormais do grupo controle e híbridos interpopulacionais (<i>A. altiparanae</i> (1) x <i>A. altiparanae</i> (2)) por reprodução seminatural.	15
Tabela 3 Média dos parâmetros espermáticos do grupo controle (<i>A. altiparanae</i> x <i>A. altiparanae</i>) e híbridos interpopulacionais (<i>A. altiparanae</i> (1) x <i>A. altiparanae</i> (2))	18
Tabela 4 Média dos parâmetros espermáticos do grupo controle (<i>A. altiparanae</i> x <i>A. altiparanae</i>) e híbridos interespecíficos (<i>A. altiparanae</i> x <i>A. schubarti</i>).	18

RESUMO

Poliploidia é um fenômeno onde um organismo apresenta um conjunto extra de cromossomos, com histórico evolutivo de ocorrência natural em muitos grupos de peixes. Dentre as teorias relacionadas à sua ocorrência, a hibridização interespecífica é plausível por suas possibilidades de recombinações únicas de cromossomos. A hibridização pode causar anormalidades na gametogênese principalmente no tocante à etapa reducional da meiose, levando a ocorrência de gametas não reduzidos como espermatozoides e oócitos $2n$ ou $4n$. Desta maneira, a fertilização com tais gametas poderia produzir progênie naturalmente poliploide. Objetivou-se nesse estudo verificar se a hibridização interespecífica entre *Astyanax altiparanae* e *A. schubarti*, e interpopulacional entre *A. altiparanae* favorece a ocorrência de gametas não reduzidos. Os espécimes apresentaram número diploide de $2n = 50$ (*A. altiparanae*), $2n = 36$ (*A. schubarti*) e $2n = 43$ (híbrido interespecífico), com desenvolvimento embrionário similar ao controle (*A. altiparanae*). Os híbridos interpopulacionais não evidenciaram espermatozoides não reduzidos, com parâmetros espermáticos similares ao controle. Os híbridos interespecíficos indicaram maior quantidade de DNA ($P = 0,0024$) e espermatozoides não reduzidos ($1n$, $2n$ e $4n$) viáveis, porém não sem nenhuma motilidade. Embora os híbridos interespecíficos sejam inférteis, a evidência de espermatozoides não reduzidos entre híbridos do gênero *Astyanax* suporta a hipótese da ocorrência de peixes naturalmente poliploides na região Neotropical.

Palavras-chave: Biotecnologia, manipulação cromossômica, região Neotropical, poliploidia.

ABSTRACT

Polyploidy is a phenomenon in which an organism has an extra set of chromosomes, with the evolutionary history of occurring naturally in many fish groups. Among many theories related to its occurrence, interspecific hybridization is plausible due to its unique chromosome recombination possibilities. Hybridization can cause abnormalities in gametogenesis, especially concerning the reductive stage of meiosis, leading to the occurrence of unreduced gametes like $2n$ or $4n$ spermatozoa. Thus, fertilization with such gametes could produce naturally polyploid progeny. The objective of this study was to verify if the interspecific hybridization between *Astyanax altiparanae* and *A. schubarti*, and interpopulation hybridization between *A. altiparanae* favors the occurrence of unreduced gametes. The specimens had a diploid number of $2n = 50$ (*A. altiparanae*), $2n = 36$ (*A. schubarti*) and $2n = 43$ (interspecific hybrid), and showed embryonic development similar to the control group (*A. altiparanae*). The interpopulation hybrids did not present unreduced sperm and showed sperm parameters similar to the control group. The interspecific hybrids showed a higher amount of DNA ($P = 0.0024$) and unreduced sperm ($1n$, $2n$ and $4n$), but it did not show any motility. Although interspecific hybrids are infertile, the evidence of unreduced sperm among hybrids of the *Astyanax* genus supports the hypothesis that hybridization events are associated with the occurrence of naturally polyploid fish in the Neotropical region.

Keywords: Biotechnology, chromosome manipulation, Neotropical region, polyploidy.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são o grupo mais especioso dentre os vertebrados, sendo caracterizado por grande plasticidade na ecologia, morfologia e fisiologia. Casos de poliploidia natural são frequentes em peixes, ocorrendo em várias famílias e espécies (LE COMBER, STEVEN C. & SMITH, 2004). Embora seja uma condição comum em plantas (ADAMS; WENDEL, 2005), a poliploidia aparece repetidas vezes na história evolutiva dos peixes e está intimamente associada com algumas ordens taxonômicas como em Cypriniformes, Salmoniformes, Characiformes, entre outras (ARAI; MATSUBARA; SUZUKI, 1993; LEGGATT; IWAMA, 2003; SCHULTZ, 1979). A poliploidia pode ter sido facilitada na história dos peixes pela grande diversidade nos mecanismos de determinação de sexo e sistemas de cromossomos sexuais, e um predomínio de ausência de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados (DESJARDINS; FERNALD, 2009; KOBAYASHI; NAGAHAMA; NAKAMURA, 2013).

Espécies com histórico evolutivo envolvendo um potencial intrínseco para poliploidia como salmão, esturjão, carpas, crustáceos e moluscos são muito utilizadas na aquicultura (LUDWIG et al., 2001). A condição de poliploidia, induzida artificialmente, associada a hibridização interespecies (alopoliploides) pode trazer vantagens econômicas à prática de aquicultura, uma vez que além de exibir maiores índices de sobrevivência e crescimento (COLOMBO et al., 1998; KATSUTOSHI, 2001), indivíduos triploides e alotriploides podem apresentar maior resistência a doenças (DORSON; CHEVASSUS; TORHY, 1991; PARSONS et al., 1986). Estas vantagens estão associadas à esterilidade, o que pode reduzir o custo de energia investido na reprodução e a presença de mais cópias de alguns genes que podem favorecer a sobrevivência (KATSUTOSHI, 2001).

Poliploidia também pode ser induzida artificialmente em laboratório, tratando o ovo em meiose II com choques de pressão hidrostáticos e temperatura, para evitar a extrusão do segundo corpúsculo polar (ADAMOV et al., 2017; BERTOLINI et al., 2018; ZHOU;

GUI, 2017). Técnicas de manipulação cromossômica têm sido amplamente utilizadas em aquicultura como na produção de lotes monosexuais (XU et al., 2018) e em pesquisas de laboratório com a produção de peixes estéreis, que podem ser utilizados em técnicas de biotecnologia avançadas, como o quimerismo germinativo, onde necessita-se que o receptor seja completamente estéril, com gametogênese endógena suprimida, garantindo a maturação exclusivamente das células germinativas transplantadas (YASUI et al., 2011). A esterilidade também pode ocorrer naturalmente por hibridização interespecífica, onde anomalias nas configurações meióticas pode levar a ocorrência de anormalidades reprodutivas, levando a produção de gametas não reduzidos e esterilidade (FUJIMOTO et al., 2008; KURODA et al., 2019; SHIMIZU; SHIBATA; YAMASHITA, 1997).

Em espécies neotropicais de peixes de água doce, triploidia é a única forma de poliploidia relatada a ocorrer naturalmente (MACHADO et al., 2012), incluindo casos de triploidia natural em *Astyanax schubarti* (Britski, 1964) (MORELLI; BERTOLLO; MOREIRA F, 1983) e outras espécies do gênero (MACHADO et al., 2012), porém não existe uma explicação satisfatória sobre como ela ocorre. Alguns estudos correlacionam a ocorrência de triploides naturais com a fertilização de um oócito diploide por um espermatozoide haploide, o que poderia ocorrer por mudanças de temperatura ambiental (CUELLAR; UYENO, 1972; TSUDA et al., 2010), mas é altamente improvável que qualquer mudança ambiental repentina alcance as temperaturas necessárias para a indução de poliploidia (ADAMOV et al., 2017; XU et al., 2018), já que as temperaturas para o choque de temperatura evitar a liberação do segundo corpúsculo polar são extremas e fogem muito da encontrada nos ambientes naturais (0°C, 40°C). Além do choque de temperatura, é necessário que este ocorra no momento certo pós fertilização e tenha a duração correta, em lambaris, o choque precisa ser feito 2 minutos pós fertilização durante 2 minutos (ADAMOV et al., 2016). Em lambari, uma possível explicação para a ocorrência de gametas poliploides em populações naturais é o envelhecimento do oócito

in vivo (DO NASCIMENTO et al., 2018) que pode levar à ocorrência de larvas naturalmente triploides. Além disso, o advento da hibridização (PIVA et al., 2018), abriu portas para o estudo de híbridos interespecies e interpulacionais como fatores ativos na ocorrência de poliploides em populações naturais.(FUJIMOTO et al., 2008; HUANG et al., 2016).

Considerando a escassez de informações concretas acerca do surgimento de peixes poliploides em populações naturais da região Neotropical, objetivou-se a duas espécies de Characiformes pertencentes ao gênero *Astyanax*, comumente encontradas no mesmo habitat em toda região Neotropical e que concentram a reprodução nos meses mais quentes e chuvosos do ano, *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) e *Astyanax schubarti*, assim como o cruzamento de duas populações geograficamente distantes de *Astyanax altiparanae*. O gênero é um dos dominantes na América do Sul (GÉRY, 1977). e vem se estabelecendo com um excelente modelo laboratorial, devido a sua fácil reprodução em cativeiro e rápida maturação sexual (DO NASCIMENTO et al., 2017). Desta forma, objetivamos neste estudo verificar se o cruzamento interpulacional e a hibridização interespecífica favorecem a ocorrência de gametas não reduzidos, observando a ploidia, viabilidade e motilidade dos espermatozoides da progênie híbrida e avaliando se eventos de hibridização podem estar relacionados com a ocorrência de peixes naturalmente poliploides na região Neotropical

2.1 Objetivo geral

Verificar se a hibridização interpulacional de *A. altiparanae* e a hibridização interespecífica de *A. altiparanae* e *A. schubarti*, favorecem a ocorrência de gametas não reduzidos

2.2 Objetivos específicos

- Produzir de híbridos interespecíficos de *A. altiparanae* e *A. schubarti*;
- Realizar cruzamentos interpulacionais de *A. altiparanae*;

- Analisar os espermatozoides dos híbridos quanto à ploidia utilizando citometria de fluxo;
- Mensurar a qualidade seminal de indivíduos híbridos por meio de motilidade e viabilidade do sêmen utilizando método CASA e citometria de fluxo;
- Fornecer informações que ajudem a elucidar a ocorrência de poliploides naturais na região Neotropical.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (CEUA N° 9476181219). A coleta dos exemplares selvagens foi feita sob permissão (SISBIO #31836-6).

3.1 Coleta dos reprodutores

As matrizes de *A. altiparanae* (1) utilizadas foram produzidas a partir de reprodutores coletados no rio Mogi-Guaçu, no distrito de Cachoeira de Emas, em Pirassununga – SP nas coordenadas 21°55'35.8"S 47°22'05.9"W, e mantidos em tanques escavados de 1000 m² no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade / Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (ICMBio/CEPTA) em Pirassununga – SP, Brasil. Os machos adultos de *A. schubarti* foram coletados no rio Mogi-Guaçu e mantidos em aquários. Os espécimes foram alimentados duas vezes ao dia com dieta comercial (4200 Kcal kg⁻¹, 45% proteína bruta, 2,6 mm). Ambas espécies estudadas são comumente amostradas em simpatria no rio Mogi-Guaçu e em outros corpos d'água da região Neotropical.

Para a produção dos híbridos interpopulacionais, machos de *A. altiparanae* (2) de população diferente, na mesma bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu, foram obtidos na

piscicultura Brumado, coletados no rio Mogi Mirim, nas coordenadas geográficas 22°31' 04" S e 46° 53' 21" W. Os peixes foram transportados ao ICMBio - CEPTA e mantidos em caixa d'água de 1000L, com aeração constante.

3.2 Coleta dos gametas e reprodução *in vitro*

Os indivíduos de *A. altiparanae* foram selecionados para reprodução artificial baseado nos critérios descritos por Yasui et al. (2015). Os machos foram selecionados verificando a presença de espículas na nadadeira anal. As fêmeas foram selecionadas com base na aparência morfológica, com região ventral abaulada e macia e papila avermelhada. A indução hormonal dos peixes selecionados foi feita por duas injeções de solução de hipófise de carpa macerada em duas concentrações, a primeira dose preparatória (0,5 mg kg⁻¹) e a segunda dose (5 mg kg⁻¹), aproximadamente 8h após aplicação da primeira dose. Quando o comportamento reprodutivo (machos perseguindo as fêmeas) iniciou, os machos foram separados e anestesiados em solução com Eugenol (100 mg L⁻¹) para a coleta de sêmen.

O sêmen foi coletado com auxílio de micropipeta de 200 µL (Eppendorf, Hamburg, Germany) e imediatamente transferido para um microtubo contendo 400 µL de solução de Ringer modificada (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl₂, 2,1 mM MgCl₂) (YASUI et al., 2015). As fêmeas foram anestesiadas e os oócitos foram extrusados em placa de Petri (90 mm) encapada com plástico filme (saran wrap, Alpfilm, São Paulo, Brasil). Para a inseminação, 30 – 50 µL de sêmen diluído de *A. altiparanae* ou *A. schubarti* foi adicionada a uma massa de oócitos de *A. altiparanae* (~300 oócitos). Para a ativação dos gametas e subsequente fertilização, foram adicionados 5 ml de água destilada. Desta forma foram montados três tratamentos, com três repetições de desovas diferentes para cada: híbridos interespecíficos (*A. altiparanae* x *A. schubarti*), híbridos interpopulacionais (*A. altiparanae* (1) x *A. altiparanae* (2)) e grupo controle (*A.*

altiparanae x *A. altiparanae*). Alíquotas representativas (~100 embriões) de cada grupo foram amostradas para acompanhar o desenvolvimento embrionário (seção 3.4).

3.3 Reprodução Seminatural

Para verificar se os casais de *A. altiparanae* x *A. schubarti* e *A. altiparanae* (1) x *A. altiparanae* (2) hibridizariam naturalmente, 5 casais de cada cruzamento foram separados em aquários individuais e induzidos à reprodução seminatural. A indução hormonal deu-se da mesma maneira que para a reprodução *in vitro*, porém os peixes não foram retirados para a extrusão, deixando que a desova ocorresse espontaneamente no aquário. Casais de *A. altiparanae* diploides, foram utilizados como grupo controle do experimento. Para verificar a hibridização, coletou-se uma alíquota da desova de cada casal para acompanhar o desenvolvimento embrionário.

3.4 Desenvolvimento embrionário

Para embriogênese, alíquotas representativas (~100 oócitos) de cada grupo foram observadas em estereomicroscópio (Nikon SMZ 18, Nikon, Tokyo, Japão) com câmera acoplada tipo CCD (Nikon DS-Fi, Nikon, Japan). Foi avaliada a sobrevivência ao longo do desenvolvimento embrionário nos seguintes estágios: 2-células, blástula, gástrula, segmentação e eclosão e respectivos números de embriões normais e anormais, como descrito em Dos Santos (2016).

3.5 Larvicultura

Para a larvicultura, areia fina foi previamente limpa com água em abundância e autoclavada para ser alocada nos potes de larvicultura, prevenindo a formação de biofilme. Cada repetição foi separada em recipientes contendo 8L de água esterilizada por radiação UV, com temperatura controlada em torno de 28°C, evitando grandes densidades de larvas por pote. As larvas foram alimentadas três vezes ao dia com náuplios de artêmia durante 8-10 dias. Após o décimo dia, ração em pó passou a ser ofertada junto

às artêmias. Quando as larvas passaram a aceitar ração em pó (Laguna pós larva, 55% PB. Invivo Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, Brasil), elas foram transferidas a aquários com 80L de água esterilizada por UV, com recirculação constante e temperatura ajustada à 28°C, onde foram mantidas até a maturação sexual (aproximadamente 6 meses).

3.6 Análises de qualidade espermática

Quando a progênie atingiu maturidade sexual, com aproximadamente 6 meses de idade, amostras de sêmen foram coletadas de todos os machos híbridos e controle de cada repetição. A análise de motilidade espermática foi realizada utilizando o *Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)* no software ImageJ® (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), de acordo com (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007). Os parâmetros de motilidade (%), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média do deslocamento (VMD) e velocidade em linha reta (VLR) foram utilizados neste experimento.

A viabilidade do sêmen foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando corante fluorescente SYBR-14 e Iodeto de Propídio (PI) (live/dead sperm viability kit; Molecular probes, Eugene, OR, USA). As amostras coradas foram analisadas em citômetro de fluxo (C6 Accuri; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando o filtro FL1 (530 ± 15 nm) e FL3 (> 670 nm) para detecção do SYBR-14 e PI, respectivamente. A integridade da membrana foi verificada baseando-se na porcentagem de sêmen corado com SYBR-14 e PI. A concentração espermática foi calculada com auxílio de câmara de Neubauer, conforme trabalhos prévios (YASUI et al., 2015).

3.7 Verificação de ploidia

A ploidia dos espermatozoides de todos os machos de cada cruzamento foi verificada por citometria de fluxo, de acordo com o protocolo (XAVIER et al., 2017).

Para enucleação, o sêmen foi diluído em solução de lise (9,53 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 47,67mM KCl, 15 mM Tris, 74 mM Sucrose e 0,8% of Triton X-100, pH 8,0), o DNA foi corado utilizando 4',6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) em solução Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Sigma # D8537, St. Louis, USA) em seguida os núcleos corados foram filtrados em uma malha de nylon de 50 μm (Celltrics, Partec, GMBh, Alemanha). As amostras preparadas foram analisadas por citometria de fluxo (CyFlow Ploidy, Analyzer, Partec, GMBh, Alemanha), com filtro DAPI (358 nm). O status da ploidia foi comparado com sêmen controle de machos diploides de *Astyanax altiparanae*.

3.8 Citogenética de cultivo celular

A citogenética foi realizada utilizando cultivo celular, técnica minimamente invasiva que permite poupar o sacrifício das espécies. Para o cultivo, fragmentos (~0,5 cm) da nadadeira caudal foram coletados e transferidos para solução de Ringer (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl_2 , 2,1 mM MgCl_2) suplementada com 1% antibiótico e 1% antimicótico. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri de 35 mm, o tecido foi cortado utilizando lâminas de bisturi estéreis e então foi adicionado 1500 μL de meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM alta glicose suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina (Sigma #G7513, St. Louis, USA), 1 mM de piruvato (Sigma #S8636, St. Louis, USA), MEM vitamínico (Sigma #M6895, St. Louis, USA), MEM aminoácidos não essenciais (Sigma #M7147, St. Louis, USA) e solução de antibiótico e antimicótico (Sigma #A5955, St. Louis, USA). As placas contendo as nadadeiras foram incubadas em estufa com 5% CO_2 , em temperatura de 30°C e atmosfera com 100% de umidade. A troca do meio de cultivo foi realizada a cada 3 dias.

Quando as células atingiram 90% de confluência, foram submetidas à tripsinização (600 μL tripsina Sigma durante 15 min) e então centrifugadas a 300g

durante 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em meio de cultivo e transferidas para placas de Petri de 60 mm, com 3 ml de meio e incubadas em estufa até atingir 80-90% confluência. Para as análises citogenéticas, as células foram tratadas com colchicina 0,0016% durante 4 horas e então submetidas à tripsinização e centrifugação. O *pellet* foi homogeneizado em solução hipotônica (KCl 0,075 M) e incubados à 37°C durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de fixador Carnoy (3:1 álcool metílico e ácido acético) e centrifugados a 500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi homogeneizado em 8 ml do fixador, e então centrifugados a 500g por 10 minutos, repetindo este processo mais duas vezes. Após a última centrifugação, foi adicionado de 200 a 500 µL de fixador, a fim de obter-se uma solução celular moderadamente concentrada, e então armazenadas em freezer -20°C.

3.9 Confeção das lâminas de citogenética

Para confecção das lâminas, 20-30 µL da suspensão celular foi gotejada com uma micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Germany) em uma lâmina limpa sobre chapa aquecida (~60°C). As células foram fixadas pela adição de 20-30 µL de fixador Carnoy sobre o material. As lâminas foram coradas em solução de Giemsa tamponada (pH, 6,8) a 1%, durante 15 minutos. A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico de campo claro, as metáfases de melhor qualidade foram fotografadas utilizando a câmera acoplada tipo CCD (Nikon DS-Fi, Nikon, Japan).

3.10 Análises estatísticas

Os dados são apresentados com média $\pm$ erro padrão. Os experimentos foram conduzidos com três repetições, utilizando diferentes parentais. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Lilliefors e comparados quanto a sobrevivência entre os estágios de desenvolvimento embrionário, dentro de cada tratamento, usando análise de variância (ANOVA) seguido por teste Tukey. Para comparação dos estágios entre os grupos controle e híbrido, foi

utilizado teste T. Para todas as análises foi adotado $\alpha = 0,05$. As análises foram efetuadas utilizando o software de estatística GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

Os 5 casais do grupo controle (*A. altiparanae* x *A. altiparanae*) e do cruzamento interpopulacional (*A. altiparanae* (1) x *A. altiparanae* (2)) desovaram de maneira seminatural e apresentaram índices normais de fertilização e desenvolvimento embrionário.

Em contrapartida, as fêmeas dos casais híbridos interespecíficos (*A. altiparanae* x *A. schubarti*) realizaram a desova, porém não houve fertilização dos machos de *A. schubarti*. Os híbridos interespecíficos de *A. altiparanae* e *A. schubarti* foram reproduzidos *in vitro*, uma vez que sua reprodução seminatural não fertilizou os ovócitos. A reprodução *in vitro* foi bem sucedida e não apresentou diferenças significativas no desenvolvimento embrionário dos casais controle (Tab. 1). Quando adultos, os peixes resultantes deste cruzamento foram usados para análises de qualidade espermática.

4.1 Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário dos híbridos não diferiu do grupo controle em nenhuma repetição, mostrando que a hibridização *in vitro* entre estas espécies não afetou a embriogênese (Tab. 1), o mesmo ocorreu para os híbridos interpopulacionais da reprodução seminatural (Tab. 2). Os embriões não apresentaram diferenças externas em nenhuma fase do desenvolvimento embrionário quando comparados ao grupo controle.

Tabela 1. Sobrevivência (%) nos estágios de duas células, blástula, gástrula, somito e eclosão; média de larvas normais e anormais do grupo controle e híbridos interespecíficos (*A. altiparanae* x *A. schubarti*) por reprodução *in vitro*.

Tratamentos	2-Celulas (%)			Blastula (%)			Gastrula (%)			Somito (%)			Eclosão (%)			Normal (%)			Anormal (%)			P-value
Controle	96,18	±	1,00	90,98	±	3,60	75,30	±	15,80	71,25	±	19,00	70,92	±	18,90	95,77	±	2,50	4,23	±	2,50	0,6034
Híbridos Interespecíficos	96,00	±	1,00	92,83	±	1,50	72,43	±	19,70	65,95	±	23,60	65,95	±	23,60	96,46	±	2,20	3,54	±	2,20	0,5996
P- value	0,9036			0,6561			0,6561			0,5445			0,5831			0,5565			0,5565			-

Os dados apresentados nas colunas foram analisados utilizando teste T de Student e a sobrevivência apresentado nas linhas de cada tratamento (do estágio de duas células até a eclosão) foi analisada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Em ambas análises foi adotado $\alpha = 0,05$ e não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 2. Sobrevivência (%) nos estágios de duas células, blástula, gástrula, somito e eclosão; média de larvas normais e anormais do grupo controle e híbridos interpopulacionais (*A. altiparanae* (1) x *A. altiparanae* (2)) por reprodução seminatural.

Tratamentos	2-Celulas (%)			Blastula (%)			Gastrula (%)			Somito (%)			Eclosão (%)			Normal (%)			Anormal (%)			P-value
Controle	96,14	±	1,72	90,58	±	5,18	88,42	±	7,06	86,98	±	7,97	85,18	±	9,72	78,44	±	9,83	6,74	±	0,43	0,8191
Híbridos Interpopulacionais	88,76	±	6,49	86,92	±	6,49	83,16	±	6,46	82,07	±	6,53	81,95	±	6,62	75,04	±	6,10	6,91	±	3,35	0,9115
P- value	0,2487			0,6931			0,5256			0,5751			0,7548			0,6045			0,9741			

Os dados apresentados nas colunas foram analisados utilizando teste T de Student e a sobrevivência apresentado nas linhas de cada tratamento (do estágio de duas células até a eclosão) foi analisada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Em ambas análises foi adotado $\alpha = 0,05$ e não apresentaram diferenças significativas.

4.2 Ploidia e conteúdo de DNA

Os híbridos interpopulacionais do cruzamento de fêmeas de *A. altiparanae* do rio Mogi-Guaçu e machos de *A. altiparanae* do rio Mogi Mirim apresentaram sêmen haploide característico e mesma quantidade relativa de DNA de indivíduos diploides de *A. altiparanae* ($P = 0,4636$) assim como os mesmos percentuais de motilidade e viabilidade espermática (Tab. 3). A análise em citometria de fluxo do sêmen não registrou alteração na ploidia dos gametas de nenhum macho híbrido destes cruzamentos, com presença apenas de espermatozoides haploides em todos os indivíduos analisados (Fig. 1.F), sugerindo que os híbridos interpopulacionais realizaram gametogênese normal.

A progênie de híbridos entre machos de *A. schubarti* e fêmeas de *A. altiparanae* resultou em peixes diploides com maior conteúdo de DNA em relação ao controle ($p = 0,0024$). Os híbridos interespecíficos evidenciaram pouco espermatozoide no líquido seminal e estas células não apresentaram motilidade (Tab. 4). A análise dos histogramas da progênie indicou diferenças na quantidade de DNA das células analisadas, com picos identificando presença de espermatozoides não reduzidos (1n, 2n, 4n) (Fig. 1. L)

4.3 . Qualidade espermática

O sêmen dos híbridos interpopulacionais não apresentou concentração de espermatozoides diferente do grupo controle ($P = 0,6540$) e viabilidade média de $95\% \pm 0,017$, enquanto o controle apresentou média de $98\% \pm 0,013$, não evidenciando diferença significativa ($P = 0,3426$) entre os cruzamentos (Tab. 3 e Fig. 1.A e B). A MOT ($p = 0,2703$) e VLR ($p = 0,3131$) não foram afetadas pela hibridização, com diferença estatística apenas na VCL ($p = 0,0061^*$) e VMD ($p = 0,0067^*$) (Tab. 3) Os machos de um cruzamento não produziram sêmen (Fig. 1. G - I), não sendo possível a análise da qualidade espermática.

Os híbridos de *A. altiparanae* e *A. schubarti* apresentaram espermatozoides em quantidade significativamente menor que o grupo controle ($P = 0,0460$), e não demonstraram motilidade (Tab. 4). A análise de viabilidade celular, detectou população de células viáveis em região diferente do sêmen controle, de *A. altiparanae* normais, no *plot* SSC-A x FSC-A (Fig. 1. J e K). A viabilidade do sêmen dos híbridos interespecíficos foi consideravelmente menor que a do grupo controle ($p = 0,0133$) (Tab. 4).

Tabela 3 Média dos parâmetros espermáticos do grupo controle (*A. altiparanae* x *A. altiparanae*) e híbridos interpopulacionais (*A. altiparanae* (1) x *A. altiparanae* (2))

Cruzamentos	Parâmetros espermáticos																	
	Viabilidade (%)			Concentração			MOT (%)			VCL (µm/s)			VMD (µm/s)			VLR (µm/s)		
Controle	98,0	±	0,01	7,79x10 ⁸	±	1,41x10 ⁸	63,70	±	0,04	67,1	±	2,7	66,5	±	2,4	56,7	±	2,4
H. Interpopulacional	95,0	±	0,02	7,01x10 ⁸	±	9,85x10 ⁷	69,50	±	0,03	58,6	±	1,5	57,7	±	1,9	54,4	±	1,1
p-value	0,3426			0,654			0,2703			0,0061*			0,0067*			0,3131		

Os dados apresentados nas colunas foram analisados utilizando teste T de Student. Para todas as análises foi adotado $\alpha=0,05$. * valores com diferença significativa. MOT = Motilidade espermática, VCL = velocidade curvilinear, VMD = velocidade média de deslocamento e VLR = velocidade em linha reta.

Tabela 4 Média dos parâmetros espermáticos do grupo controle (*A. altiparanae* x *A. altiparanae*) e híbridos interespecíficos (*A. altiparanae* x *A. schubarti*).

Cruzamentos	Parâmetros espermáticos																	
	Viabilidade (%)			Concentração			MOT (%)			VCL (µm/s)		VMD (µm/s)		VLR (µm/s)				
Controle	98,0	±	0,01	7,79x10 ⁸	±	1,41x10 ⁸	63,7	±	0,04	67,1	±	2,7	66,5	±	2,4	56,7	±	2,4
H. Interespecífico	43,0	±	0,38	5,50x10 ⁶	±	7,55x10 ⁶	0,0	±	0,0	0	±	0	0	±	0	0	±	0
p-value	0,0133*			0,0460*			0,0001*			0,0001*		0,0001*		0,0001*		0,0001*		

Os dados apresentados nas colunas foram analisados utilizando teste T de Student. Para todas as análises foi adotado $\alpha=0,05$. * valores com diferença significativa. MOT = Motilidade espermática, VCL = velocidade curvilinear, VMD = velocidade média de deslocamento e VLR = velocidade em linha reta.

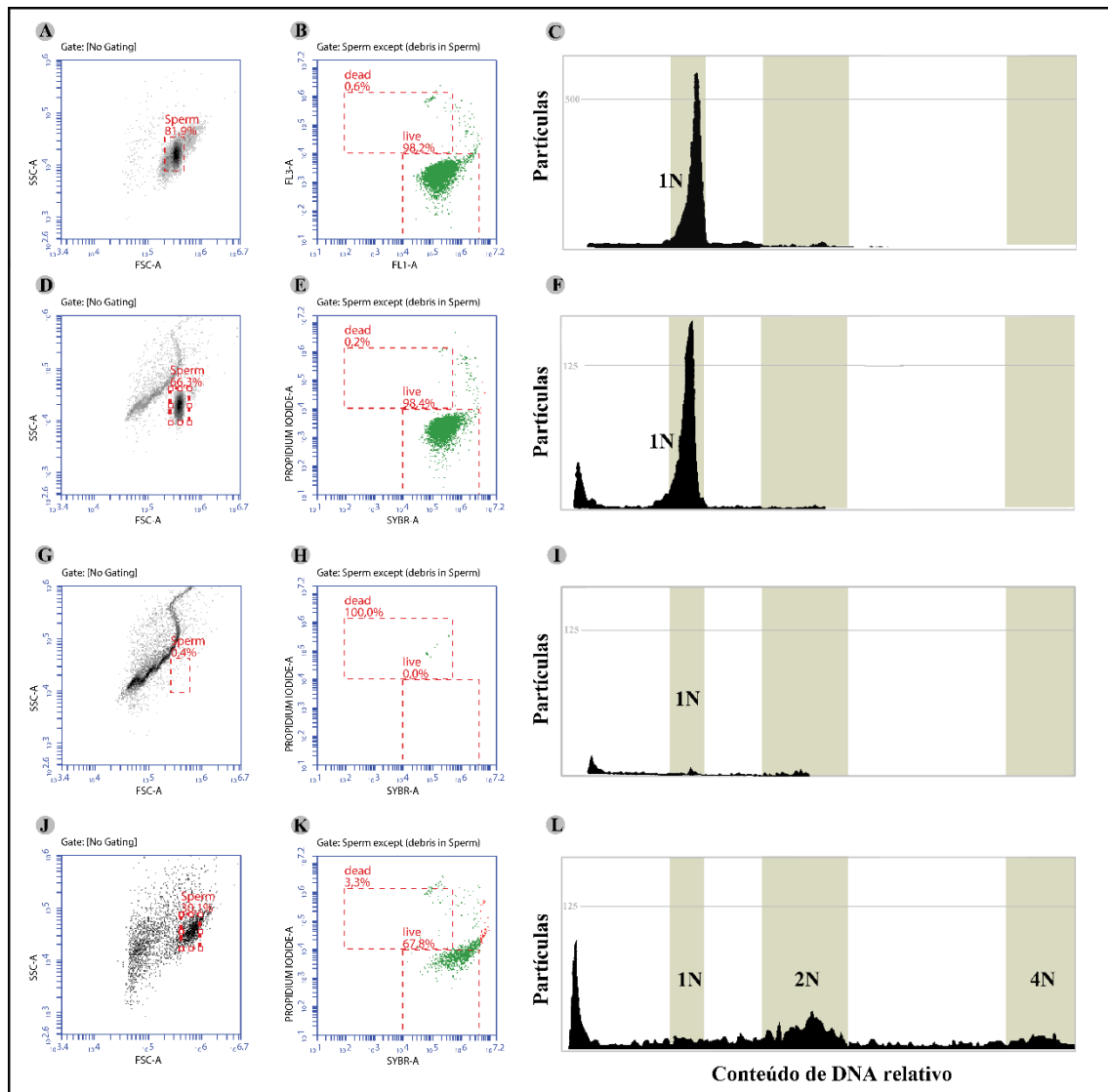


Figura 1. Análises de viabilidade de machos controle (A, B), híbridos interpopulacionais (D, E, G, H) e híbridos interespecíficos (J, K), pareados com ploidia do sêmen (C, F, I, L). 1n = haploide, 2n = diploide, 4n=tetraploide.

4.4 Cultivo celular

O cultivo de células fibroblásticas a partir de fragmento de nadadeira não apresentou contaminações por fungo e/ou bactérias. Em 4 dias, as células começaram a proliferar a partir do fragmento de nadadeira (Fig. 2. A), e em 15 dias, a partir do dia 0, uma grande quantidade de células fibroblásticas já havia colonizado a placa (Fig. 2. B), possibilitando sua utilização para os ensaios de citogenética de cultivo celular.

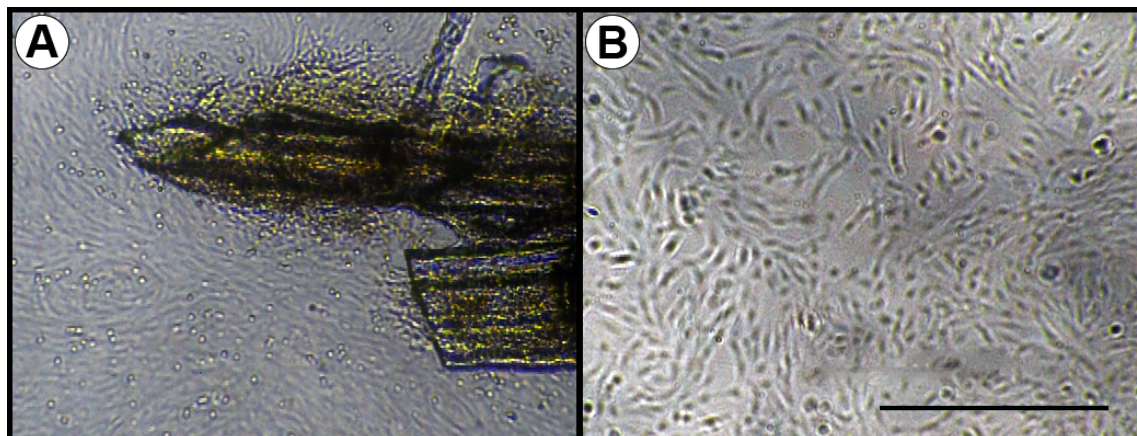


Figura 2. Cultivo de fibroblastos de *Astyanax schubarti*. (A) Células fibroblásticas proliferando a partir do fragmento de nadadeira. (B) Células fibroblásticas em 80% confluência. Barra representa 500 μm .

4.5 Citogenética

O número diploide das espécies estudadas consistiu em $2n = 50$ cromossomos para *A. altiparanae*, com 10 metacêntricos, 32 submetacêntrico, 6 subtelocêntricos e 12 acrocêntricos (Fig. 2. A), $2n = 36$ para *A. schubarti*, com 12 metacêntricos, 16 submetacêntricos, 4 subtelocêntricos e 4 acrocêntricos (Fig. 2. B) e $2n = 43$ para os híbridos entre estas espécies, correspondendo a 8 metacêntricos, 17 submetacêntricos, 10 subtelocêntricos e 8 acrocêntricos (Fig. 2. C). A citogenética a partir do cultivo de células fibroblásticas da nadadeira proporcionou metáfases de qualidade, sem a necessidade de sacrificar os animais.

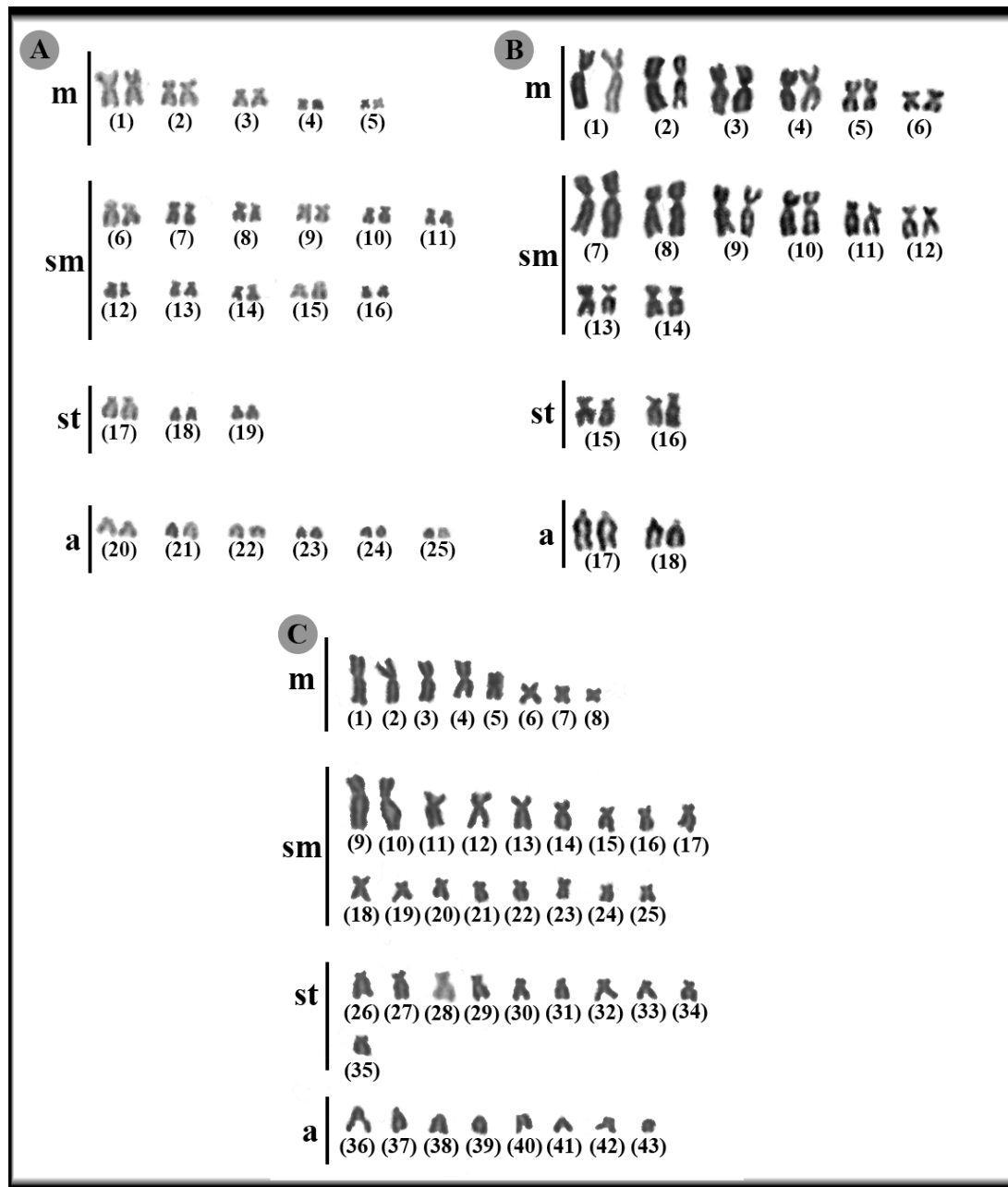


Figura 3. Cariótipos correspondentes às espécies *Astyanax altiparanae* (A) com $2n = 50$ cromossomos, *Astyanax schubarti* (B) com $2n = 36$ cromossomos e dos híbridos interespecíficos (C) com $2n = 43$ cromossomos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Reprodução seminatural e in vitro

Em peixes, a hibridização é mais recorrente que em qualquer outro vertebrado (HUBBS, 1955), evento facilitado pelo tipo de reprodução que apresentam. Para muitas espécies, incluindo peixes do gênero *Astyanax*, os picos reprodutivos ocorrem no período da Piracema, de forma que há grande competição por território para desova (PINHEIRO

et al., 2019). Devido a sua ampla distribuição em corpos d'água de toda região Neotropical, a ocorrência de diferentes espécies coexistindo em simpatria é comum. A ocorrência em simpatria, características reprodutivas compartilhada e a compatibilidade de gametas, podem facilitar a hibridização interespecífica durante seus picos de desovas, de forma que ocorra fertilização cruzada de gametas, como já foram observados casos de híbridos interespecíficos de *Astyanax* (PINHEIRO et al., 2019). Os resultados indicam que a hibridização interespecífica de *A. altiparanae* e *A. schubarti* podem ocorrer por fertilização cruzada ocasional dos gametas em ambiente natural, uma vez que a fertilização *in vitro* de ovos de *A. altiparanae* por sêmen de *A. schubarti* ocorreu normalmente e os híbridos foram capazes de chegar a fase adulta.

As barreiras envolvidas no isolamento de duas populações de mesma espécie são principalmente geográficas, ecológicas, temporal ou etológica (LOWE-MCCONNELL, 1969). A habitação em ambientes com características ecológicas distintas, pode resultar em mudanças na etologia reprodutiva de espécies a ponto de duas populações não conseguirem cruzar, não apenas por incompatibilidade de gametas, mas por não reconhecimento do comportamento reprodutivo dos indivíduos de outra população (HUBBS, 1955). As populações de *A. altiparanae* do rio Mogi-Guaçu e do alto do rio Mogi Mirim não apresentaram tais dificuldades, de forma que reproduziram normalmente quando arranjados em casais interpopulacionais em aquários isolados. A progênie híbrida interpopulacional também não apresentou diferenças significativas no desenvolvimento embrionário e os adultos atingiram maturação sexual, indicando que o cruzamento natural, entre estas duas populações, é possível.

Os espermatozoides dos híbridos interpopulacionais apresentaram apenas gametas haploides e os dados sugerem que a hibridização entre estas duas populações não afetou a gametogênese e a capacidade reprodutiva dos híbridos, de forma que poderiam reproduzir normalmente em ambiente natural.

5.2 Análise de ploidia

O gênero *Astyanax* é pouco conhecido dentre os peixes Neotropicais e suas relações filogenéticas ainda é muito discutida (OLIVEIRA et al., 2011; TERÁN; BENITEZ; MIRANDE, 2020). As espécies estudadas possuem número diploide altamente polimórfico, sendo $2n = 36$ cromossomos em *A. schubarti* e $2n = 50$ (*A. altiparanae*) (PAZZA; KAVALCO, 2007), sendo o número diploide de 50 cromossomos considerado uma condição ancestral no grupo (PAZZA; KAVALCO, 2007). Estudos anteriores relataram correspondência entre onze cromossomos de *A. schubarti* e dezessete cromossomos de *A. altiparanae*, indicando que existe relação entre os cromossomos destas espécies apesar da grande diferença de número diploide (DANIEL-SILVA; ALMEIDA-TOLEDO, 2005). Esta diferença no número de cromossomos faz com que os híbridos interespecíficos apresentem cromossomos extras, sem pares homólogos, não permitindo a divisão meiótica normal das células durante a gametogênese, podendo gerar alterações nas gônadas que provoquem a esterilidade ou redução na viabilidade reprodutiva (BARTLEY; RANA; IMMINK, 2000; COYNE; ALLEN ORR, 1998).

Em hibridização interespecíficas, algumas anormalidades podem acarretar em gametogênese anormal, produzindo gametas não reduzidos, como na ocorrência simultânea de oócitos diploides e haploides em híbridos interpopulacionais geneticamente distantes de *Misgurnus* (Cypriniformes) (ARIAS-RODRIGUEZ; YASUI; ARAI, 2009; KURODA et al., 2019), e a presença de espermatozoides não reduzidos ($1n$, $2n$ e $4n$) em machos híbridos interespecíficos de *M. anguillicaudatus* e *M. mizolepis* (FUJIMOTO et al., 2008). Em alguns casos, os erros na gametogênese da prole híbrida podem impedir os espermátócitos de completar a meiose após a replicação, resultando no acúmulo de células tetraploides tipo-espermatozoide no lúmen testicular, resultando na esterilidade dos machos híbridos (KURODA et al., 2019; SHIMIZU; SHIBATA; YAMASHITA, 1997).

Em linhagens diploides e tetraploides de hibridização entre peixes filogeneticamente distantes, os híbridos produzidos podem ser férteis e produzir gametas não reduzidos (WANG et al., 2019),

tais gametas, em híbridos alodiploides, são um fator chave para a ocorrência de espécimes poliploides naturais (LIU et al., 2001). Os híbridos interespecíficos produzidos neste estudo apresentaram espermatozoides não reduzidos, no entanto, os gametas não apresentaram motilidade. Desta forma, os híbridos interespecíficos de *A. altiparanae* e *A. schubarti* dificilmente teriam sucesso na fertilização em ambiente natural. No entanto, uma vez que os gametas poliploides apresentaram viabilidade, podem ser empregados à técnicas de biotecnologia e manipulação cromossômicas, como reportado em estudos anteriores (ZHAO et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

Gametas não reduzidos na hibridização interespecífica entre *Astyanax altiparanae* e *A. schubarti* podem ocorrer em condições naturais por meio de fertilização cruzada acidental, em razão da compatibilidade dos gametas, da condição de simpatria entre as espécies e pico sazonal reprodutivo. A progênie híbrida interespecífica apresenta gametas não reduzidos $2n$, $4n$ viáveis, mas com nenhuma motilidade, de forma que a progênie híbrida pode ser considerada infértil, mas não estéril.

A observação dos dados obtidos sobre o cruzamento interpopulacional entre *A. altiparanae* sugere baixa probabilidade da ocorrência de gametas não reduzidos em cruzamentos de indivíduos entre estas duas populações, indicando que estudos com diferentes populações são necessários para elucidar esta questão no gênero *Astyanax*.

Aqui, registra-se mais um caso de hibridização interespecífico que possui potenciais informações para o melhor entendimento da ocorrência de gametas não reduzidos e poliploidia em peixes neotropicais, fornecendo subsídios para os esforços de compreensão desses processos e o desenvolvimento de novos trabalhos voltados a elucidar a relação de gametas não reduzidos com a ocorrência de peixes poliploides na região Neotropical.

7. REFERÊNCIAS

-
- ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, out. 2016.
- ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, 2017.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 135–141, 2005.
- ARAI, K.; MATSUBARA, K.; SUZUKI, R. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture**, v. 117, n. 3–4, p. 227–235, 1993.
- ARIAS-RODRIGUEZ, L.; YASUI, G. S.; ARAI, K. Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. **Genetica**, v. 136, n. 1, p. 49–56, 2009.
- BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 325–337, 2000.
- BERTOLINI, R. M. et al. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 68–74, 2018.
- COLOMBO, L. et al. Towards an integration between chromosome set manipulation, intergeneric hybridization and gene transfer in marine fish culture. **Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species**, v. 122, n. January, p. 77–122, 1998.
- COYNE, J. A.; ALLEN ORR, H. The evolutionary genetics of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 353, n. 1366, p. 287–305, 28 fev. 1998.

CUELLAR, O.; UYENO, T. Triploidy in rainbow trout. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 508–515, 1972.

DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 4, p. 497–501, 2005.

DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. Fish sex: why so diverse? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, n. 6, p. 648–653, 2009.

DO NASCIMENTO, N. F. et al. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, p. 163–171, 2017.

DO NASCIMENTO, N. F. et al. In vivo storage of oocytes leads to lower survival, increased abnormalities and may affect the ploidy status in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Zygote**, p. 1–5, 2018.

DORSON, M.; CHEVASSUS, B.; TORHY, C. Comparative susceptibility of three species of char and of rainbow trout × char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 11, n. 3, p. 217–224, 1991.

DOS SANTOS, M. P. et al. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.

FUJIMOTO, T. et al. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 430–437, 2008.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. Neptune City, New Jersey: Tfh Pubns Inc, 1977.

HUANG, W. et al. Formation of diploid and triploid hybrid groupers (hybridization of *Epinephelus coioides* ♂ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) and their 5S gene analysis. **BMC**

Genetics, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2016.

HUBBS, C. L. Hybridization between Fish Species in Nature. **Systematic Zoology**, v. 4, n. 1, p. 1, 1955.

KATSUTOSHI, A. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, v. 197, p. 205–228, 2001.

KOBAYASHI, Y.; NAGAHAMA, Y.; NAKAMURA, M. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. **Sexual Development**, v. 7, n. 1–3, p. 115–125, 2013.

KURODA, M. et al. Aberrant Meiotic Configurations Cause Sterility in Clone-Origin Triploid and Inter-Group Hybrid Males of the Dojo Loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 8611, p. 46–54, 2019.

LE COMBER, STEVEN C. & SMITH, C. Biological relevance of polyploidy : ecology to genomics Polyploidy in arctic plants. **Biology Journal of the Linnean Society**, v. 82, n. 4, p. 521–536, 2004.

LEGGATT, R. A.; IWAMA, G. K. Occurrence of polyploidy in the fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 13, n. 3, p. 237–246, 2003.

LIU, S. et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. **Aquaculture**, v. 192, n. 2–4, p. 171–186, 2001.

LOWE-MCCONNELL, R. H. Speciation in tropical freshwater fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 1, n. 1–2, p. 51–75, 1969.

LUDWIG, A. et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (. **Acipenser, Huso and Scaphirhynchus**). **Genetics**, v. 158, p. 1203–1215, 2001.

MACHADO, S. N. et al. Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (characiformes, characidae): A new occurrence. **Caryologia**, v. 65, n. 1, p. 40–46, 4 mar.

2012.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA F, O. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). II. Occurrence of natural triploidy. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 245–250, 1983.

OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2011.

PARSONS, J. E. et al. Increased resistance of triploid rainbow trout × coho salmon hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. **Aquaculture**, v. 57, n. 1–4, p. 337–343, 1986.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. Chromosomal evolution in the neotropical characin *astyanax* (Teleostei, Characidae). **The nucleus**, v. 50, n. 3, p. 519–543, 2007.

PINHEIRO, A. P. B. et al. Integrative approach detects natural hybridization of sympatric *lambaris* species and emergence of infertile hybrids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

PIVA, L. H. et al. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, v. 108, p. 239–244, 2018.

SCHULTZ, R. J. Role of polyploidy in the evolution of fishes. **Basic life sciences**, v. 13, p. 313–40, 1979.

SHIMIZU, Y.; SHIBATA, N.; YAMASHITA, M. Spermiogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 279, n. 1, p. 102–112, 1997.

TERÁN, G. E.; BENITEZ, M. F.; MIRANDE, J. M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, p. 1–18, 2020.

TSUDA, J. R. et al. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes,

-
- Heptapteridae). **Genetics and molecular research : GMR**, v. 9, n. 3, p. 1929–1935, 2010.
- WANG, S. et al. Establishment and application of distant hybridization technology in fish. **Science China Life Sciences**, v. 62, n. 1, p. 22–45, 2019.
- WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 661–672, 2007.
- XAVIER, P. L. P. et al. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. SEP, 25 set. 2017.
- XU, D. et al. Production of neo-males from gynogenetic yellow drum through 17 α -methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female populations. **Aquaculture**, v. 489, p. 154–161, 2018.
- YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 8, p. 2380–2388, 2011.
- YASUI, G. S. et al. Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 3, p. 464–470, 2015.
- ZHAO, Y. et al. Motility, morphology, mitochondria and ATP content of diploid spermatozoa from sex-reversed clonal diploid and neo-tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 6, p. 1006–1012, 2012.
- ZHOU, L.; GUI, J. Natural and artificial polyploids in aquaculture. **Aquaculture and Fisheries**, v. 2, n. 3, p. 103–111, 2017.