UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center

Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*)

Nivaldo Ferreira do Nascimento

Biólogo

Jaboticabal
São Paulo, Brasil
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA (CAUNESP)

São Paulo State University-Aquaculture Center

Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*)

Nivaldo Ferreira do Nascimento

Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

Co-orientador: Dr. George Shigueki Yasui

Dissertação apresentada ao programa de Pós – graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal
São Paulo, Brasil
2015

Nascimento, Nivaldo Ferreira do
N244d Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*) / Nivaldo Ferreira do Nascimento. – – Jaboticabal, 2015
xiv, 67 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015
Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi
Banca examinadora: José Augusto Senhorini, Diogo Teruo Hashimoto
Bibliografia

1. *Astyanax*. 2. Triploides. 3. Crescimento. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diplóides e triplóides de lambari (Astyanax altiparanae)"

AUTOR: NIVALDO FERREIRA DO NASCIMENTO

ORIENTADORA: Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO
Laboratório de Genética de Peixes, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Prof. Dr. JOSE AUGUSTO SENHORINI
/ Instituto Chico Mendes de Conservação Da Biodiversidade

Data da realização: 24 de fevereiro de 2015.

“Eu não falhei, encontrei 10 mil soluções que não davam certo.” Thomas Edison.

“A maioria das grandes descobertas foram resultado de 99% de trabalho duro e 1% de genialidade.” Thomas Edison.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”. Isaac Newton.

“Os investimentos em conhecimento geram os melhores dividendos.” Benjamin Franklin.

“Ser humilde com os superiores é obrigação, com os colegas é cortesia, com os inferiores é nobreza.” Benjamin Franklin.

“Cedo na cama, cedo no batente. Faz o homem saudável, próspero e inteligente.” Benjamin Franklin.

“Nenhum cientista pensa com fórmulas.” Albert Einstein.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.” Albert Einstein.

"Não sobrevive a espécie mais forte, mas a que melhor se adapta à mudança."” Charles Darwin.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, em especial meus pais (Everaldo e Naide) e meus irmãos (Edvaldo, Jaqueline e Edvânia).

Sou muito grato também aos meus cunhados (Valdir, Elaine e Samuel).

Ao meu amor, Cleonice Cristina Hilbig, por todos os momentos que passamos juntos, companheirismo, amizade. Obrigado por fazer parte da minha vida!

À professora Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi pela oportunidade, amizade, compreensão e confiança a mim dispensadas. Serei sempre grato.

Ao Dr. George Yasui, pela coorientação, amizade, ensinamentos, auxílio nos experimentos e importantes contribuições ao longo desta pesquisa.

Ao Dr. José Augusto Senhorini pela amizade, recepção no CEPTA, participação em minha banca e grande ajuda durante o período de mestrado. Muito obrigado!

Ao Dr. Diogo Teruo Hashimoto pela participação na minha banca de mestrado e valiosas sugestões.

A Dra. Maria do Carmo Faria Paes pela participação na minha banca de qualificação e valiosas sugestões.

Ao Dr. Rafael Yutaka Kuradomi pela participação na minha banca de qualificação e valiosas sugestões.

Aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia do CEPTA: Matheus Pereira dos Santos, Lucas Henrique Piva, Paulo Andrade André dos Santos, Rafaela Bertolini, Matheus Tonetti, Letícia Dragone, Leonardo Calado, Regiane Cristina da Silva e Nycolas Levy Pereira.

Aos companheiros do Laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal: Fernanda Nogueira Valentin, Francine Faustino, Lilian Cristina Makino, Sr. Orandi Matheus, Edmar, Maria do Carmo Faria Paes, Breno Manzini, Nariane Fernandes, Marcelo Henrique Correa Assunção, Erico Luis Hoshiba Takahashi, Matheus Pereira dos Santos, Sheryll Corchuelo Chavarro.

Aos meus amigos da República “Qui-fase” pelos momentos de descontração e amizade que ficarão para sempre em minha memória: Matheus Rovere de Morais, Samuel Carvalho, Gabriel Eugênio, Wagner Cavalari Júnior, João Paulo Cabrera, Thaian Santos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida (Proc. 30417/2013-0).

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP, especialmente na pessoa do Dr. José Augusto Senhorini e funcionários, por ter fornecido o material biológico, infraestrutura e até mesmo moradia para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!!

À Universidade de São Paulo (USP), câmpus de Pirassununga e Ribeirão Preto pela disponibilização de equipamentos que foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

Às pessoas que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho, que por ventura não foram citadas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **9**

LISTA DE TABELAS **11**

Resumo Geral **12**

General Abstract **14**

1. Introdução Geral 16
1. Manipulação cromossômica 18
2. Poliploidia e produção de peixes triploides 18
3. Lambari (*Astyanax altiparanae*) como espécie modelo 27
4. Objetivo Geral 28
5. Referências 29

Capitulo I: Características de carcaça e crescimento de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*) **33**

RESUMO 33

1. Introdução 34
2. Material e Métodos 35
3. Análise estatística 38
4. Resultados 38
5. Discussão 41
6. Agradecimentos 55
6. Referências 56

Capitulo II Aspectos reprodutivos de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*) **59**

RESUMO 59

1. Introdução 60
2. Material e Métodos 61
3. Análise estatística 66
4. Resultados 66
5. Discussão 68
6. Agradecimentos 79
7. Referências 80

8.Conclusões **82**

9.Considerações Finais **82**

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Gametogênese no macho e fêmea. Meiose I: separação dos cromossomos homólogos e liberação do primeiro corpúsculo polar. Meiose II: separação das cromátides irmãs e expulsão do segundo corpúsculo polar. No final uma célula germinativa diploide dá origem a quatro gametas haploides no macho e um gameta haploide na fêmea. Adaptado de Kunz (2004). 22

Figura 2. Processo de triploidização. Logo após a fertilização um choque é aplicado para evitar a liberação do segundo corpúsculo polar, originando um zigoto triploide (3n). Adaptado de Lutz (2003). 23

Figura 3. Procedimento para citometria de fluxo. Remoção da membrana e coloração dos núcleos (A,B,C), os quais são analisados no citômetro de fluxo (E) e o resultado apresentado em histogramas (F). Fonte: Xavier (2013). 25

Capítulo I

Figura 1. Histograma de citometria de fluxo da nadadeira de um indivíduo diploide (1) e triploide (2) de lambari (*Astyanax altiparanae*). 46

Figura 2. Comprimento padrão (mm) de fêmeas e machos 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triplóides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$). 47

Figura 3. Peso (g) de fêmeas e machos 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triplóides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$). 48

Figura 4. Rendimento de carcaça (%) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão) Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triplóides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$). 49

Figura 5. Índice viscerossomático (IVS, %) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triplóides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$). 50

Figura 6. Índice gonadossomático (IGS, %) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos

indicam significância estatística entre diploides e triplóides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$). 51

Figura 7. Morfologia externa de peixes e gônadas de *Astyanax altiparanae*. Fêmeas 2n (A) e 3n (B) e machos 2n (C) e 3n (D). Escala: 1 cm. 52

Figura 8. Fator de condição (K) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida. Médias ± erro padrão. Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triplóides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$). 53

Capítulo II

Figura 1. Histograma de citometria de fluxo de espermatozoides de um peixe triploide (1) e nadadeira de um peixe diploide (2) e triploide (3) de lambari (*Astyanax altiparanae*). 72

Figura 2. Diafanização das nadadeiras de machos de *Astyanax altiparanae*. Raios das nadadeiras anal (A,B) e pélvica (C,D) diploides com 52 dias e raios das nadadeiras anal (E,F) e pélvica (G,H) de diplóides com 84 dias. Barra de calibração A, C, E e G: 1000 µm. B, D, F, 200 µm. H: 100 µm. 73

Figura 3. Parâmetros espermáticos de *Astyanax altiparanae.* A, Motilidade progressiva, não progressiva e espermatozoides estáticos de machos 2n e 3n. B, tempo de motilidade de machos 2n e 3n (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre 2n e 3n (teste t, $P < 0,05$)..... 74

Figura 4. Histologia ovariana de *Astyanax altiparanae*. Ovários maduros de fêmeas diploides (175 dias) (A, B). Ovários imaturos de fêmeas triplóides (175 dias) (C, D). Seta: ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário; Cabeça de seta: ninhos de oogônias; v: ovócitos vitelogênicos. Escala, A: 100 µm; B: 25 µm; C: 500 µm, D: 250 µm. 76

Figura 5. Histologia testicular de *Astyanax altiparanae*.Testículos de machos diplóides (175 dias) (A, B). Testículos de machos triplóides (175 dias) (C, D). Seta: espermatogônias, p: espermatócitos, t:espermátides e z: espermatozoides. A: 100 µm; B: 20 µm; C: 200 µm, D: 20 µm. 77

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide de peixes diploides (A-C) e triplóides (D-F) de *Astyanax altiparanae*. (A, D) Evidenciação da morfologia externa (B, E) Flagelo em corte transversal mostrando axonema com padrão morfológico de nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. (C, F) Detalhe do núcleo e peça intermediária evidenciando as mitocôndrias. Abreviaturas: nu = núcleo; mi = mitocôndria; fl = flagelo; cc = canal citoplasmático. Escala das barras: (A,D): 1 µm; (B,E): 250nm; (C,F): 0,5 µm. 78

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Composição de ácidos graxos (%) de diplóides (2n) e triplóides (3n) de *Astyanax altiparane* (F-fêmea, M-macho). 54

Capítulo II

Tabela 1. Concentração (sptz/ml) e viabilidade espermática (% de células vivas) de machos 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* (Médias ± erro padrão) 75

NASCIMENTO, Nivaldo Ferreira do. **Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*)**.2015.Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

Resumo Geral

Neste estudo, foram avaliados aspectos relacionados ao desempenho zootécnico e caracterização das células germinativas de machos e fêmeas diploides (2n) e triploides (3n) de *Astyanax altiparanae*. O principal objetivo foi verificar a performance e a possível esterilidade em peixes 3n. No Capítulo I, o crescimento e as características da carcaça foram examinadas. Fêmeas 3n apresentam maiores valores de ácidos graxos saturados e menores de insaturados e poli-insaturados. Adicionalmente, foi verificada uma diminuição no IGS e maior crescimento. Machos triploides apresentaram IGS e crescimento similares em comparação com os machos diploides normais. No Capítulo II o objetivo foi analisar histologicamente as gônadas dos diploides e triploides, e adicionalmente, caracterizar a estrutura das espículas presentes nas nadadeiras pélvicas e anal (característica sexual secundária em machos) e alguns parâmetros seminais (motilidade, concentração e viabilidade, ultraestrutura e ploidia). Machos 3n apresentam espículas nas nadadeiras pélvicas e anal, assim como observado nos diploides. Análise histológica mostrou que fêmeas 2n apresentaram gônadas desenvolvidas com ovócitos vitelogênicos. Por outro lado, fêmeas 3n exibiram gônadas imaturas. As gônadas dos machos 2n e 3n apresentaram morfologia similar, no entanto, machos 2n exibiram maior quantidade espermatozoides. Machos 3n apresentaram menor concentração espermática, motilidade e duração da motilidade. No que se refere à viabilidade espermática, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$). Em ambas ploidias, os espermatozoides apresentaram ultraestrutura similar e mesmo número de mitocôndrias, com estruturas morfológicas características: cabeça (redonda), peça intermediária e

flagelo, este com formação tubular típica (9+2). Adicionalmente, a análise de citometria de fluxo mostrou que machos triploides produzem espermatozoides aneuploides (n=1,71). Em conclusão, a triploidização não garante a esterilidade nos machos, no entanto, fêmeas 3n (estéreis) podem ser utilizadas na aquicultura e para aumento da produção do *A. altiparanae.*

Palavras – chave: *Astyanax*, triploides, crescimento, esterilidade, gônadas.

NASCIMENTO, Nivaldo Ferreira do. **Growth performance and characterization of the germinative cells of diploid and triploid fishes of the lambari (*Astyanax altiparanae*)**.2015 Master Thesis (Master Degree in Aquaculture) – Aquaculture Center of São Paulo State University, Jaboticabal, SP.

General Abstract

In this study, aspects related with growth performance and characterization of the germ cells from diploids (2n) and triploids (3n) males and females of yellow tail tetra *Astyanax altiparanae* were analyzed. The principal aim was to verify the performance and sterility of 3n fish. In the Chapter I, growth and carcass traits were examined. Female 3n presented high values of saturated fatty acids in comparison with unsaturated and polyunsaturated. Additionally, decreased GSI and better growth performance was verified within triploids. Triploid males presented similar GSI and similar performance parameters in comparison with normal diploid males. In the Chapter II, the aim was to study histologically the gonads of diploids and triploids, and additionally to characterize the spines in the pelvic and anal fins (sexual secondary trait in male), and some sperm parameters (motility, concentration and viability, ultrastructure and ploidy) of 2n and 3n fishes. Triploid males presented spines in the anal fin, similarly as observed in diploids. Histological analysis showed that 2n female present developed gonads with vitelogenic oocytes. On the other hand, 3n female exhibit immature gonads. The gonads of 2n and 3n males presented similar morphology, however, 2n male presented increased amount of spermatozoa. Triploid males also presented decreased sperm concentration, motility and duration of motility. Regarding the sperm viability, no significant differences were observed ($P > 0.05$). In both statuses, the spermatozoa presented similar ultrastructures and same number of mitochondria, with characteristic morphological structures: head (round), midpiece and flagela, which have a typical tubular formation (9+2). Additionally, the flow cytometrycal analysis showed that 3n male produce aneuploid

spermatozoa (n=1.71). In conclusion, the triploidization does not ensure sterility in males, however, 3n female (sterile) may be used for aquaculture purposes and increase production of *A. altiparanae*.

Key-words: *Astyanax*, triploids, growth, sterility, gonads.

1. Introdução Geral

A aquicultura nacional vem apresentando um crescimento contínuo ao longo das últimas décadas. Em 2011, a produção de pescado atingiu 1.431.974,4 toneladas, e deste total, 628.704,3 toneladas (44%) são provenientes da aquicultura (MPA, 2011). Portanto, estímulos públicos como a criação do Ministério da Pesca e Aquicultura e da Embrapa Pesca e Aquicultura em 2009, só evidenciam a importância estratégica deste setor para o desenvolvimento econômico do Brasil. Vale destacar a importante criação de 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos e o PIB pesqueiro, estimado em R$ 5 bilhões (MPA, 2011).

No cenário atual, a aquicultura continental responde por 80% da produção aquícola, com 544.490 toneladas. Já a aquicultura marinha representa uma pequena parcela, com 84.214,3 toneladas (MPA, 2011). No entanto, o potencial de produção é ainda pouco explorada, pois possuímos a maior reserva de água doce do mundo e oito mil quilômetros de costa. No Brasil, levando em conta as características atuais, a FAO estima que a produção de pescado pode chegar a 20 milhões de toneladas em 2030 (FAO, 2010). Adicionalmente, de acordo com o relatório do Rabobank (2013), o Brasil tem o potencial de se tornar a nova grande fonte mundial de pescado, com possibilidade de competir com grandes produtores, como Tailândia, Noruega e até mesmo a China.

Contudo, para alcançar este objetivo e concretizar o potencial de produção, é necessário um grande esforço conjunto, envolvendo instituições de pesquisa, produtores, governo e a sociedade. Faz-se necessário conscientizar a população sobre os benefícios do consumo do pescado. No Brasil, em 2011, a média anual de consumo por habitante atingiu a marca de 11,7 kg, o que significa um aumento de 23,7% em relação à 2009 (MPA, 2011). Apesar do cenário animador, muito deve ser feito para alcançar a

média mundial, que atinge 17 kg de pescado/habitante (FAO, 2010). Além disso, apesar do grande mercado interno, as oportunidades para exportação são enormes, pois a demanda global está aumentando, e especialistas apontam o Brasil como um dos únicos países com capacidade de aumentar consideravelmente sua produção e suprir o mercado global (RABOBANK, 2013).

Assim sendo, as instituições de pesquisa tem um importante papel no desenvolvimento da aquicultura nacional, pois através dela é possível melhorar a qualidade biológica e genética dos animais produzidos, propiciando maior resistência a doenças, crescimento, qualidade da carne, etc. Neste aspecto, o emprego da Biotecnologia aplicada é um imprescindível passo para alcançar esses objetivos e suprir a crescente demanda (MELAMED et al., 2002; NKWKWA, 2012).

Ao longo das últimas décadas, uma variedade de tecnologias foi desenvolvida e muitas foram e estão sendo pesquisadas para melhorar e otimizar a aquicultura mundial. Neste cenário, a manipulação cromossômica vem ganhando destaque, principalmente pelos efeitos imediatos na produção. Vale destacar a poliploidia através da produção de peixes triploides, uma realidade já vivida na criação de salmões, ostras e carpas (ARAI, 2001; PIFERRER et al., 2009). Os primeiros estudos nesta linha remontam às décadas de 1970 e 80, tendo o Japão como um dos países pioneiros (ARAI, 2001). Estes trabalhos permitiram melhorar consideravelmente a qualidade dos animais produzidos, o que influenciou diretamente a produção de pescado.

1. Manipulação cromossômica

Na manipulação cromossômica, conjuntos de cromossomos podem ser adicionados ou subtraídos durante os processos de divisão celular (meiose e mitose) (ARAI, 2001). Como resultado, pode-se induzir três fenômenos: poliploidia, ginogênese e androgênese (KOMEN e THORGAARD, 2007).

Na ginogênese os ovócitos são fertilizados por espermatozoides geneticamente inativados. Posteriormente, é realizada a diploidização pela retenção do segundo corpúsculo polar ou bloqueio da primeira clivagem. Portanto, a herança nuclear é totalmente materna. Na androgênese, a herança nuclear é totalmente paterna. Assim, o DNA materno é eliminado (geralmente pela utilização de UV) dos ovócitos e, após a fertilização por um espermatozoide, a condição diploide é restabelecida através do bloqueio da primeira divisão mitótica. Já na poliploidia ocorre a adição de um ou mais conjunto de cromossomos num indivíduo diploide "Normal".

Outra forma de manipulação cromossômica é a obtenção de indivíduos híbridos. Vale destacar a produção de peixes triploides por meio da hibridização entre animais diploides e tetraploides (ARAI, 2001) e o uso de diferentes espécies com o objetivo de gerar proles com distintos fenótipos e genótipos (XIAO et al., 2014).

2. Poliploidia e produção de peixes triploides

A reprodução sexuada é dominante entre as espécies utilizadas na aquicultura (LUTZ, 2003). De um ponto de vista evolutivo, esta modalidade reprodutiva apresenta vantagens, pois possibilita o aumento da variabilidade genética entre os indivíduos. Para que ocorra o número diploide de cromossomos (2n) normalmente encontrado, ao final

do processo de gametogênese formam-se gametas haploides (n), os quais irão reconstituir o número normal de cromossomos após a fertilização (LUTZ, 2003).

No entanto, esse processo de reconstituição da ploidia normal pode ser alterado através da adição de um ou mais conjuntos de cromossomos. Quando esse processo é consolidado, o indivíduo resultante é chamado de poliploide (PIFERRER et al., 2009). Portanto, triploides, tetraploides e hexaploides são organismos poliploides com três, quatro e seis conjuntos de cromossomos, respectivamente (DUNHAM, 2004).

A poliploidia pode ocorrer naturalmente (DUNHAM, 2004) e sua origem é devido ao processo evolutivo (BORIN; MARTINS-SANTOS e OLIVEIRA, 2002). Peixes triploides naturais, por exemplo, foram encontrados em diversas espécies, como *Astyanax scabripinnis* (LUIS MAISTRO et al., 1994*)*, *Trichomycterus davisi* (BORIN; MARTINS-SANTOS e OLIVEIRA, 2002) e loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) (ZHANG e ARAI, 1999). Em algumas espécies, triploides naturais podem ocorrer pela retenção espontânea do segundo corpúsculo polar (PIFERRER et al., 2009), enquanto em outras este fenômeno se da pela produção de gametas não reduzidos (ZHANG e ARAI, 1999; PIFERRER et al., 2009). Em plantas, o fenômeno de duplicação dos conjuntos cromossômicos foi importante durante o processo evolutivo, além de ser amplamente induzido como forma de aumentar a produtividade (PIFERRER et al., 2009).

A produção de poliploides tem sido muito estudada tanto em peixes como em crustáceos (DUNHAM, 2004). Em peixes de cultivo, a triploidização tem sido a técnica mais empregada, principalmente devido às grandes diferenças fisiológicas e biológicas em relação aos organismos diploides. Vale destacar a possibilidade de esterilização pela supressão do desenvolvimento gonadal com subsequente incremento no crescimento

somático (FELIP; CARRILLO e ZANUY, 2009; WEBER et al., 2014), maior sobrevivência (devido à baixa agressividade) (LUTZ, 2003) e melhor eficiência na conversão alimentar. Além disso, esta técnica diminui os riscos de introgressão quando espécies nativas, exóticas, híbridas ou transgênicas estão sendo produzidas (LUTZ, 2003). Adicionalmente, através da criação de peixes estéreis, problemas associados à maturação sexual, como suscetibilidade a doenças e redução da qualidade da carne, são evitados (TARANGER et al., 2010).

O maior desempenho no crescimento de indivíduos triploides estéreis está ligado ao desenvolvimento diferencial das gônadas (em alguns casos), pois não ocorre deslocamento de energia para a produção de gametas e comportamentos reprodutivos. Em trabalho desenvolvido por Carrillo e Zanuy (2009), fêmeas triploides de *Dicentarchus labrax* apresentaram menor índice gonadossomático e gônadas imaturas, concomitante com o maior crescimento somático. Em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), após um período de jejum, os peixes triploides apresentaram melhor recuperação e crescimento (CLEVELAND e WEBER, 2013). No entanto, exceções existem, e nem sempre é observado um maior desempenho nestes animais (FRIARS et al., 2001; LUTZ, 2003; SACOBIE et al., 2012), o que indica uma resposta espécie-específica.

A triploidia também pode influenciar nas características de carcaça, como rendimento e composição de ácidos graxos (BUCHTOVA et al., 2004; MANOR et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012). Vale destacar que os peixes são a principal fonte de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente da série ômega 3, sendo altamente recomendado seu consumo como forma de prevenir doenças cardíacas (TURNER; ELSE e HULBERT, 2003). Portanto, estas variáveis devem ser avaliadas, pois estão diretamente ligadas à aceitação dos peixes no mercado (DUNHAM, 2004).

Adicionalmente, o desenvolvimento gonadal reduzido nos triploides também pode facilitar o processamento dos mesmos, o que, em conjunto com o maior rendimento de carcaça, aumentaria consideravelmente a rentabilidade da produção (DUNHAM, 2004).

Para a indução de peixes triploides, alguns aspectos genético-reprodutivos básicos devem ser elucidados para a aplicação dos choques no momento adequado. Como visto anteriormente, durante o processo de formação dos gametas (gametogênese), o DNA deve ser reduzido à metade para que a quantidade normal (característica da espécie) seja reconstituída na fertilização, por meio da junção do gameta feminino e masculino. Esse processo, fundamental para manutenção da quantidade de DNA nas células vivas e aumento da variabilidade genética, é conhecido como meiose, um evento típico dos animais com reprodução sexuada.

Na meiose ocorrem duas divisões nucleares consecutivas (Meiose I e II) (Ver Fig. 1). No entanto, esse processo acontece de forma diferente em machos e fêmeas. Nos machos, a partir de uma célula germinativa diploide (2n) são produzidos quatro espermatozoides haploides (n). Estes contêm exatamente a metade do número de cromossomos da célula mãe. Nas fêmeas, as células não se dividem de forma igualitária. Na primeira divisão (Meiose I), uma célula (ovócito) permanece com metade dos cromossomos e com todo o citoplasma, liberando uma vesícula com a outra metade do material genético. O mesmo processo acontece na Meiose II, onde metade das cromátides irmãs e o citoplasma são retidos no ovócito junto com o citoplasma, sendo a outra metade do DNA liberado por outra vesícula (KUNZ, 2004).

Essas vesículas, chamadas de corpúsculos polares, tem a função de descartar o material genético do ovócito. Assim, uma célula germinativa diploide dará origem a um gameta haploide grande (ovócito) e três corpúsculos polares, os quais posteriormente

serão absorvidos. A produção de um gameta grande (ovócito) é importante para garantir nutrientes necessários durante o desenvolvimento embrionário e larval, o que aumenta as chances de sobrevivência (BROOKS; TYLER e SUMPTER, 1997).

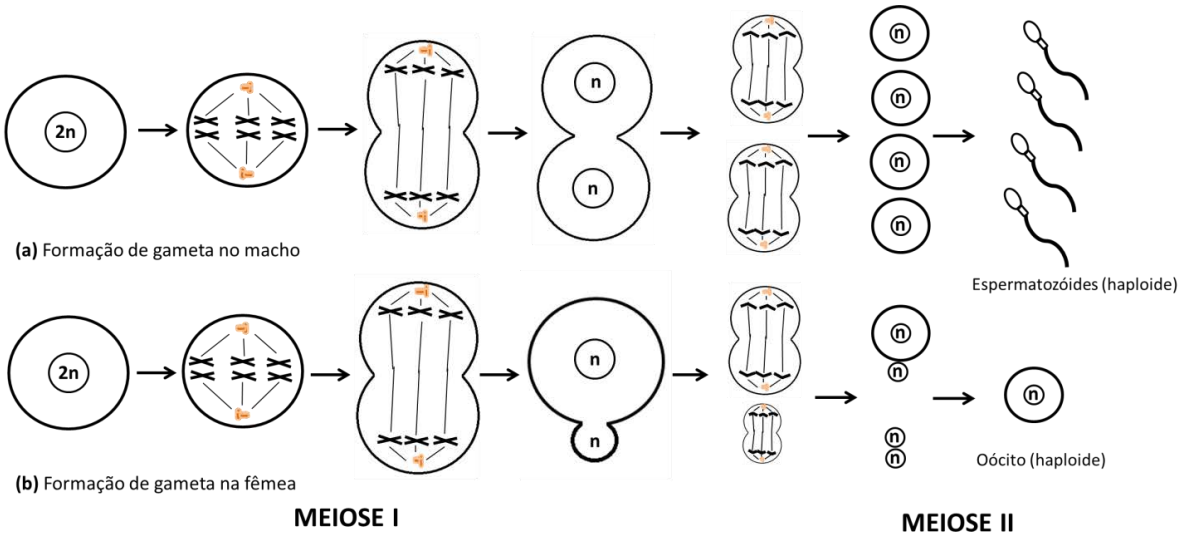

Figura 1. Gametogênese no macho e fêmea. Meiose I: separação dos cromossomos homólogos e liberação do primeiro corpúsculo polar. Meiose II: separação das cromátides irmãs e expulsão do segundo corpúsculo polar. No final uma célula germinativa diploide dá origem a quatro gametas haploides no macho e um gameta haploide na fêmea. Adaptado de Kunz (2004).

Em peixes, a liberação do primeiro corpúsculo polar ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento ovariano. Já o segundo corpúsculo somente é liberado momentos após a ativação pelo espermatozoide (PIFERRER et al., 2009). Portanto, durante um curto período de tempo (logo após a fertilização) o ovócito apresenta três genomas e caso a liberação do segundo corpúsculo polar seja inibida, um ovo triploide será produzido (3n), contendo 2n de origem materna e um n de origem paterna. A inibição da saída do segundo corpúsculo pode ser realizada por meio de um choque de temperatura, químico ou pressão (Fig. 2).

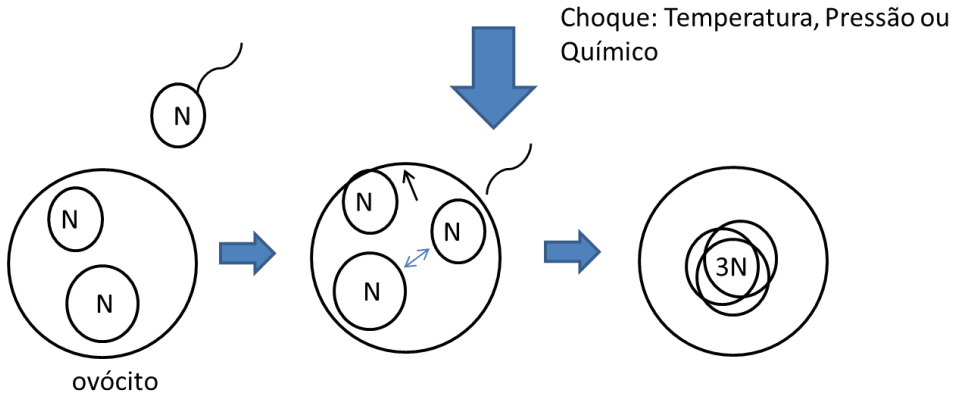

Figura 2. Processo de triploidização. Logo após a fertilização um choque é aplicado para evitar a liberação do segundo corpúsculo polar, originando um zigoto triploide (3n). Adaptado de Lutz (2003).

O choque tem como objetivo inibir os mecanismos que levariam à expulsão do segundo corpúsculo polar. Na aquicultura, esta é a técnica mais comum para a produção de triploides (ARAI, 2001). Por outro lado, uma forma alternativa de produzir triploides é cruzar um indivíduo tetraploide (4n), que gera gametas diploides (2n), com um diploide normal. Para a produção de tais tetraploides, procede-se a fertilização com um espermatozoide e um ovócito haploide, gerando uma célula ovo diploide (2n). Posteriormente, quando os cromossomos se replicam para a primeira divisão, ou primeira clivagem, um choque é aplicado, o que inibe a segunda divisão celular, produzindo um organismo com quatro conjuntos de cromossomos (2n de origem materna e 2n de origem paterna)(ZHANG e ONOZATO, 2004).

De acordo com Malison et al. (1993) os choques de pressão ou de temperatura podem afetar negativamente o crescimento dos organismos triploides. Assim, o menor desempenho destes indivíduos em alguns relatos pode não estar diretamente ligado à poliplodia, mas ao processo de indução. De acordo com Fjelldal e Hansen (2010) a maior mortalidade observada nos estágios iniciais em triploides de salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.), pode ser devido ao processo de indução (FJELLDAL e HANSEN, 2010). Já a ploidia poderia afetar a sobrevivência em estágios mais avançados

(OPSTAD et al., 2013). Como alternativa ao primeiro problema, os pesquisadores afirmam ser necessário produzir triploides através do cruzamento de tetraploides com diploides, o que isolaria o efeito do choque de temperatura ou pressão (como dito acima). E para melhorar a sobrevivência nos estágios posteriores, seria necessário realizar mudanças na temperatura de criação e alimentação (OPSTAD et al., 2013).

Após a indução de um organismo poliploide é necessário realizar a confirmação da ploidia. Para tanto, várias técnicas podem ser empregadas, como: citometria de fluxo, esfregaço sanguíneo, cariótipo e marcadores moleculares (LUTZ, 2003; DUNHAM, 2004).

A citometria de fluxo é o método mais comum e ele se baseia na mensuração do DNA nuclear das células (ALLEN, 1983). Nesta técnica, os núcleos são retirados de uma amostra (Ex: um pedaço de nadadeira) e corados com um corante fluorescente (Fig. 1 A, B e C). Posteriormente, essa amostra é levada a um aparelho chamado citômetro (Fig. 1 E), o qual irá classificar e quantificar as células de acordo com a intensidade da fluorescência. Como um peixe triploide contém núcleos com mais DNA, estes irão liberar fluorescência de maior intensidade, sendo então facilmente identificados. O resultado da citometria é apresentado em gráficos, chamados de histogramas, que evidenciam a quantidade de DNA nas células (Fig. 1 F). Esta técnica é vantajosa, pois a confirmação da ploidia é realizada rapidamente e pode ser empregada em larvas pós-eclosão ou em peixes adultos (sem necessidade de sacrificá-los).

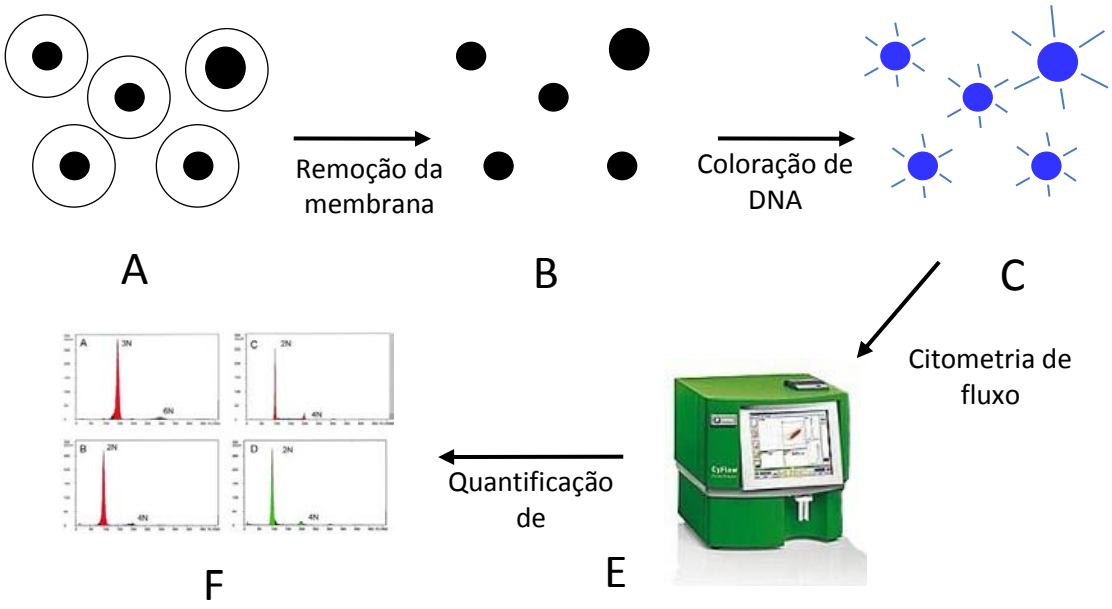

Figura 3 Procedimento para citometria de fluxo. Remoção da membrana e coloração dos núcleos (A,B,C), os quais são analisados no citômetro de fluxo (E) e o resultado apresentado em histogramas (F). Fonte: Xavier (2013).

A avaliação da ploidia por meio do volume nuclear dos eritrócitos é muito comum. Lu et al. (2009) avaliaram o sangue periférico de peixes com diferentes ploidias (2n, 3n, 4n e 5n), constatando que quanto maior o conteúdo de DNA, maior o volume nuclear. Ainda, de acordo com estes autores, o maior tamanho dos eritrócitos alteraria processos baseados na área de superfície, como trocas metabólicas e de nutrientes, passagem passiva e ativa de íons, ligação de hormônios na membrana, etc. (BENFEY, 2001). Esta técnica apresenta vantagens por ser fácil e rápida, no entanto, é necessário esperar que o animal atinja tamanho adequado para a coleta do sangue.

Como visto, o diâmetro nuclear segue o aumento da ploidia, e este fenômeno é refletido no tamanho das células, as quais são maiores em poliploides (OPSTAD et al., 2013). Porém, este aumento no número de células é compensado pela diminuição no número das mesmas(LUTZ, 2003), o que explana a semelhança na morfologia externa destes animais. Mesmo assim, como resultado do maior crescimento, peixes triploides são maiores e pesados, o que altera o fator de condição, sendo reportado um menor

valor para esta variável em triploides de diversas espécies (FJELLDAL e HANSEN, 2010; CANTAS et al., 2011; FRASER et al., 2012).

A triploidia também tem um considerável efeito na produção de esteroides gonadais. Vários trabalhos descrevem que machos triploides apresentam menor nível de Testosterona (T), enquanto as fêmeas têm redução na síntese de Estradiol (E2) (FELIP; CARRILLO e ZANUY, 2009). Este fenômeno é esperado devido ao menor desenvolvimento gonadal nestes animais. Em truta arco íris, a concentração de esteroides gonadais nas fêmeas triploides (17 β-estradiol) foi mais baixa em relação às fêmeas diploides durante todo o ano de experimento (ESPINOSA et al., 2013). Ainda de acordo com estes autores, a produção de menos hormônios em peixes triploides os fazem mais adequados para consumo humano.

De uma forma geral, fêmeas triploides são estéreis, como observado para truta arco-íris (PIFERRER et al., 2009; WEBER et al., 2014). Já os machos podem chegar a produzir espermatozoides, os quais geralmente apresentam baixa capacidade fecundante (ARAI, 2001; PIFERRER et al., 2009; ZHAO et al., 2012). No entanto, a razão para esta resposta diferenciada ainda é pouco conhecida (HULAK et al., 2010). De acordo com Hulak et al. (2010), nos machos, a mitose de espermatogônias e formação de cistos de divisão de células esteroidogênicas são eventos pré-meioticos, o que explicaria o desenvolvimento gonadal mais comum em machos triploides. Krisfalusi e Cloud (1999) corroboram este dado, afirmando que em fêmeas a triploidia afeta o pareamento dos cromossomos na fase inicial da meiose, e nos machos este evento ocorre no final, o que explica o desenvolvimento gonadal similar em machos 2n e 3n. Vale destacar que exceções existem, principalmente em espécies onde indivíduos com diferentes ploidias são encontradas na natureza, como em *Squalius alburnoides,* um pequeno peixe da família Ciprinidae (SOUSA-SANTOS; COLLARES-PEREIRA e ALMADA, 2007).

Portanto, pelo avaliado, alguns aspectos sobre os triploides já foram elucidados. Mas ainda há um grande caminho pela frente. Benfey et al. (2001) chegam a afirmar que os triploides devem ser tratados como uma nova "espécie", sendo necessário muitos estudos para adequar um sistema ótimo para sua criação, como tolerância ambiental (temperatura, oxigênio, salinidade, etc), aspectos nutricionais (energia, micronutrientes), sanitários e comportamentais (agressão, competição, etc.).

3. Lambari (*Astyanax altiparanae*) como espécie modelo

O lambari (*Astyanax altiparanae*) é uma espécie nativa do Brasil e com potencial para aquicultura, tendo grande aceitabilidade quando comercializada na forma de petiscos em bares e restaurantes, além de ser usado como isca viva para pesca ou industrializado para consumo (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEDIA e FORESTI, 2005). É pertencente ao gênero *Astyanax,* um dos mais importantes componentes da cadeia alimentar nos rios da América do Sul, o qual participa na dieta de peixes de grande porte (PRIOLI et al., 2002). Esta espécie se adapta bem a rações comerciais, tem um amplo espectro de alimentação e produz pequenos e numerosos ovos com rápido desenvolvimento (DIAS et al., 2005). Portanto, o lambari *(A. altiparanae)* é um forte candidato a ser uma espécie modelo para estudos em biotecnologia, pois preenche os requisitos para tanto. No que se refere aos estudos de manipulação cromossômica, o emprego do lambari é interessante, pois para o estabelecimento de um protocolo confiável e seguro, é importante que a espécie seja de fácil manejo e reprodução, o que possibilita um maior número de repetições e réplicas. Vale destacar que após o desenvolvimento e conhecimento aprofundado da tecnologia desenvolvida no lambari, esta poderá ser aplicada em outras espécies nativas de grande interesse comercial e alto valor de mercado.

4. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo verificar a possível esterilidade e existência de vantagens na produção de peixes 3n de *Astyanax altiparanae.*

5. Referências

ALLEN, S. K. Flow-Cytometry - Assaying Experimental Polyploid Fish and Shellfish. **Aquaculture,** v. 33, n. 1-4, p. 317-328, 1983 1983. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983QX51900032 >.

ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture,** v. 197, n. 1-4, p. 205-228, Jun 1 2001. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168775000010 >.

BENFEY, T. J. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. **Ices Journal of Marine Science,** v. 58, n. 2, p. 525-529, Apr 2001. ISSN 1054-3139. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169186300024 >.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. e OLIVEIRA, C. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. **Genetica,** v. 115, n. 3, p. 253-258, Aug 2002. ISSN 0016-6707. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178541200002 >.

BROOKS, S.; TYLER, C. e SUMPTER, J. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in Fish Biology and Fisheries,** v. 7, n. 4, p. 387-416, 1997/12/01 1997. ISSN 0960-3166. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1018400130692 >.

BUCHTOVA, H.; SMUTNA, M.; VORLOVA, L.; SVOBODOVA, Z.; FLAJSHANS, M. Fatty acid composition of diploid and triploid populations of tench (*Tinca tinca* L.). **Acta Veterinaria Brno,** v. 73, n. 2, p. 235-245, Jun 2004. ISSN 0001-7213. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223216200014 >.

CANTAS, L.; FRASER, T. W. K.; FJELLDAL, P. G.; MAYER, I.; SORUM, H. The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - a comparison of composition and drug resistance. **Bmc Veterinary Research,** v. 7, Nov 17 2011. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298228000001 >.

CLEVELAND, B. M. e WEBER, G. M. Effects of triploidy on growth and protein degradation in skeletal muscle during recovery from feed deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology,** v. 166, n. 1, p. 128-137, Sep 2013. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322693200016 >.

DIAS, R. M.; BAILLY, D.; ANTÔNIO, R. R.; SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin.Goiás State, Brazil) by the "lambari" *Astyanax altiparanae* (Tetragonopterineae; Characidae). **Brazilian Archives o Biology and Techonology,** v. 48, n. 3, p. 467-476, 2005.

DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Oxford: GABI Publishing, 2004.

ESPINOSA, E.; JOSA, A.; GIL, L.; MALO, C.; MITJANA, O. Comparing Sex Steroid Levels During the Annual Cycles of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Diploid Female (XX) and Triploid Female (XXX) Genotypic Sex. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 48, n. 1, p. 149-155, Feb 2013. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313875800026 >.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2010**. Rome: FAO 2010.

FELIP, A.; CARRILLO, M. e ZANUY, S. Older triploid fish retain impaired reproductive endocrinology in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Fish Biology,** v. 75, n. 10, p. 2657-2669, Dec 2009. ISSN 0022-1112. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273899600015 >.

FJELLDAL, P. G. e HANSEN, T. Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. **Aquaculture,** v. 309, n. 1-4, p. 131-136, Nov 22 2010. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284817600018 >.

FRASER, T. W. K.; FJELLDAL, P. G.; HANSEN, T.; MAYER, I. Welfare Considerations of Triploid Fish. **Reviews in Fisheries Science,** v. 20, n. 4, p. 192-211, 2012 2012. ISSN 1064-1262. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310138800002 >.

FRIARS, G. W.; MCMILLAN, I.; QUINTON, V. M.; O'FLYNN, F. M.; MCGEACHY, S. A.; BENFEY, T. J. Family differences in relative growth of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture,** v. 192, n. 1, p. 23-29, Jan 1 2001. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165053700002 >.

HULAK, M.; KASPAR, V.; PSENICKA, M.; GELA, D.; LI, P.; LINHART, O. Does triploidization produce functional sterility of triploid males of tench *Tinca tinca* (L.)? **Reviews in Fish Biology and Fisheries,** v. 20, n. 3, p. 307-315, Sep 2010. ISSN 0960-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281111600005 >.

KOMEN, H. e THORGAARD, G. H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. **Aquaculture,** v. 269, n. 1-4, p. 150-173, Sep 14 2007. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249143600016 >.

KRISFALUSI, M. e CLOUD, J. G. Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J Exp Zool,** v. 284, n. 4, p. 466-72, Sep 1 1999.

KUNZ, Y. W. **Developmental Biology of Teleost Fishes**. Dordrecht: Springer, 2004.

LU, W.; LIU, S.; LONG, Y.; TAO, M.; ZHANG, C.; WANG, J.; XIAO, J.; CHEN, S.; LIU, J.; LIU, Y. Comparative study of erythrocytes of polyploid hybrids from various fish subfamily crossings. **Cell and Tissue Research,** v. 336, n. 1, p. 159-163, Apr 2009. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268294900014 >.

LUIS MAISTRO, E.; LUCIA DIAS, A.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA FILHO, O. Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia,** v. 47, n. 3-4, p. 233-239, July-December 1994. ISSN 0008-7114. Disponível em: < <Go to ISI>://ZOOREC:ZOOR13200006007 >.

LUTZ, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. London: Blackwell, 2003.

MALISON, J. A.; PROCARIONE, L. S.; HELD, J. A.; KAYES, T. B.; AMUNDSON, C. H. The influence of triploidy and heat and hydrostatic-pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca-flavescens*). **Aquaculture,** v. 116, n. 2-3, p. 121-133, Oct 1 1993. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LZ59100003 >.

MANOR, M. L.; WEBER, G. M.; SALEM, M.; YAO, J.; AUSSANASUWANNAKUL, A.; KENNEY, P. B. Effect of sexual maturation and triploidy on chemical composition and fatty acid content of energy stores in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, p. 312-321, 2012.

MELAMED, P.; GONG, Z. Y.; FLETCHER, G.; HEW, C. L. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. **Aquaculture,** v. 204, n. 3-4, p. 255-269, Feb 11 2002. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173785900003 >.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasilia: MPA**:** 60 p. 2011.

NKWKWA, M. C. The review of recent advances in fish genetics and biotechnology. **Continental J. Fisheries and Aquatic Science,** v. 6, n. 1, p. 9-18, 2012.

OPSTAD, I.; FJELLDAL, P. G.; KARLSEN, O.; THORSEN, A.; HANSEN, T. J.; TARANGER, G. L. The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on survival, growth and deformities during early life stages. **Aquaculture,** v. 388, p. 54-59, Apr 15 2013. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316195600009 >.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIERE, J.-C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture,** v. 293, n. 3-4, p. 125-156, Aug 16 2009. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268150000001 >.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEDIA, R. B. e FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSERTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.105-120.

PRIOLI, S.; PRIOLI, A. J.; JULIO, H. F.; PAVANELLI, C. S.; DE OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D. M.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, characidae) in the Iguacu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology,** v. 25, n. 4, p. 421-430, Dec 2002. ISSN 1415-4757. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181200200011 >.

RABOBANK. **Brazilian Aquaculture : A Seafood Industry Giant in the Making**. January. 2013

RIBEIRO, C. S.; GOMES, A. D.; VIEIRA, V. A. R. O.; TABATA, Y. A.; TAKAHASHI, N. S.; MOREIRA, R. G. The effect of ploidy on the fatty acid profile during the reproductive cycle of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International,** v. 20, p. 1117-1137, 2012.

SACOBIE, C. F. D.; GLEBE, B. D.; BARBEAU, M. A.; LALL, S. P.; BENFEY, T. J. Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. **Aquaculture,** v. 334, p. 58-64, Mar 7 2012. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301693600008 >.

SOUSA-SANTOS, C.; COLLARES-PEREIRA, M. J. e ALMADA, V. Fertile triploid males - An uncommon case among hybrid vertebrates. **Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology,** v. 307A, n. 4, p. 220-225, Apr 1 2007. ISSN 1932-5223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244975800004 >.

TARANGER, G. L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R. W.; FONTAINE, P.; ZANUY, S.; FELIP, A.; WELTZIEN, F.-A.; DUFOUR, S.; KARLSEN, O.; NORBERG, B.; ANDERSSON, E.; HAUSEN, T. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology,** v. 165, n. 3, p. 483-515, Feb 2010. ISSN 0016-6480. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273765300009 >.

TURNER, N.; ELSE, P. L. e HULBERT, A. J. Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. **Naturwis-sensachaften,** v. 90, p. 521 - 523, 2003.

WEBER, G. M.; HOSTUTTLER, M. A.; CLEVELAND, B. M.; LEEDS, T. D. Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. **Aquaculture,** v. 433, p. 85-93, Sep 20 2014. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342529400013 >.

XAVIER, P. L. P. **Métodos de fixação de amostras para citometria de fluxo em peixes**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Abi - Ciências Biológicas). Pontifícia Universidade Católica de Campinas

XIAO, J.; KANG, X.; XIE, L.; QIN, Q.; HE, Z.; HU, F.; ZHANG, C.; ZHAO, R.; WANG, J.; LUO, K.; LIU, Y.; LIU, S. The fertility of the hybrid lineage derived from female *Megalobrama amblycephala* x male *Culter alburnus*. **Animal Reproduction Science,** v. 151, n. 1-2, p. 61-70, Dec 10 2014. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000345819700010 >.

ZHANG, Q. Q. e ARAI, K. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the leach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Ichthyological Research,** v. 46, n. 2, p. 153-161, May 25 1999. ISSN 1341-8998. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081856600006 >.

ZHANG, X. e ONOZATO, H. Hydrostatic pressure treatment during first mitousis does not supress the first cleavage but the second one. **Aquaculture,** v. 240, p. 101-103, 2004.

ZHAO, Y.; PSENICKA, M.; FUJIMOTO, T.; SAITO, T.; YASUI, G. S.; YAMAHA, E.; ARAI, K. 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, Dec 2012. ISSN 0175-8659. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310976600027 >.

Capitulo I: Características de carcaça e crescimento de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*)

O manuscrito será submetido ao periódico "Aquaculture" (Fator de Impacto: 1.8).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento, rendimento e composição de ácidos graxos da carcaça de peixes diploides e triploides de *Astyanax altiparanae*. A triploidização foi induzida por choque de temperatura (40°C/ 2 minutos) 2 minutos após a fertilização, sendo os ovos tratados e o grupo controle criados separadamente e em condições semelhantes até 175 dias pós-eclosão. Foi observado para fêmeas triploides maiores valores de ácidos graxos saturados e menores de insaturados e poli-insaturados. Fêmeas triploides apresentaram gônadas pouco desenvolvidas, maior crescimento, peso e rendimento de carcaça. Por outro lado, fêmeas diploides apresentaram maior índice gonadossomático e viscerossomático. Já os machos triploides exibiram gônadas semelhantes aos diploides, com pouca diferença nas variáveis analisadas. Este estudo mostra que o reduzido desenvolvimento gonadal nas fêmeas triploides influenciou no desempenho (positivamente), assim como na síntese e mobilização de ácidos graxos. Portanto, peixes triploides de *A. altiparanae*, em especial as fêmeas, podem ser utilizados para o aumento da produção em cativeiro do *A. altiparanae.*

Palavras-chave: *A. altiparanae*, ácidos graxos, crescimento, manipulação cromossômica.

1. Introdução

A produção de organismos estéreis na aquicultura é vantajosa, pois possibilita maior crescimento somático e caso haja escapes na natureza os impactos são reduzidos (PIFERRER et al., 2009). Em peixes, a triploidização é uma das técnicas mais empregadas (ARAI, 2001) e a indução deste fenômeno geralmente é alcançada pela supressão da liberação do segundo corpúsculo polar, através de um choque térmico, químico ou de pressão (PIFERRER et al., 2009).

Em peixes triploides, devido ao genoma adicional, a gametogênese é comprometida, principalmente pela dificuldade no pareamento dos cromossomos homólogos durante a meiose (LUTZ, 2003; FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011). Assim, pode ocorrer esterilidade e maior crescimento, pois a energia extra que seria destinada às gônadas é empregada no crescimento somático (LECLERCQ et al., 2011). No entanto, os resultados podem ser imprevisíveis. Em alguns casos, o crescimento dos triploides pode ser semelhante (SACOBIE et al., 2012) ou até inferior (FRIARS et al., 2001) ao observado para os diploides, devendo ser analisado para cada espécie (DUNHAM, 2004).

Além das vantagens de esterilidade e maior crescimento, peixes triploides podem apresentar diferenças nas características de composição da carcaça, como seu rendimento e perfil de ácidos graxos (BUCHTOVA et al., 2004; MANOR et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012). Vale destacar que os peixes são a principal fonte de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente da série ômega 3, sendo altamente recomendado seu consumo como forma de prevenir doenças cardíacas (TURNER; ELSE e HULBERT, 2003). Portanto, como estas variáveis estão diretamente ligadas à

aceitabilidade dos peixes no mercado, devem ser avaliadas em indivíduos triploides (DUNHAM, 2004).

O lambari (*Astyanax altiparanae*) é uma espécie nativa do Brasil e de grande potencial para aquicultura, sendo muito apreciada para o consumo como petiscos e para pesca como isca viva (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEDIA e FORESTI, 2005). Além disso, é interessante como um modelo experimental em genética e manipulação cromossômica, pois apresenta pequeno porte, amplo espectro de alimentação, rusticidade e produz pequenos e numerosos ovos com rápido desenvolvimento.

Com o protocolo de manipulação e gametas e fertilização artificial estabelecido para o *A. altiparanae* (YASUI et al., 2014), foi possível iniciar as pesquisas de manipulação cromossômica, como a produção de peixes triploides. Neste trabalho foi avaliado o crescimento, características de carcaça e o perfil de ácidos graxos em peixes diploides e triploides de lambari (*A. altiparanae*) induzidos por choque térmico.

2. Material e Métodos

2.1 Local, reprodução e peixes

Foram utilizados três casais adultos de *Astyanax altiparanae* (separadamente), provenientes do plantel existente no Centro de Conservação da Biodiversidade (ICMbio/CEPTA), Pirassununga, São Paulo, Brasil. Os procedimentos de fertilização artificial foram realizados de acordo com Yasui et al. (2014). As fêmeas foram selecionadas por apresentarem ventre abaulado e papila genital avermelhada. Já os machos por apresentarem espículas na nadadeira anal. Os peixes foram submetidos a

indução hormonal empregando dose única de hipófise de carpa, com dosagem de 3 mg/kg^{-1} para fêmeas e machos.

Após dez horas da aplicação hormonal, os peixes foram selecionados e transferidos para um balde com anestésico mentol (~100 mg L^{-1}, Êxodo Científica, Brasil). O Sêmen foi coletado com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL (Eppendorf, Alemanha), e transferido diretamente para 400 µL de uma solução de Ringer (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM $CaCl_2$, 2,1 mM $MgCl_2$) para imobilização dos espermatozoides (YASUI et al., 2014). A fêmea foi extrusada em placa de petri revestida por filme plástico de PVC. Posteriormente, o sêmen diluído em Ringer foi adicionado à massa de ovos e os gametas ativados pela adição de água.

Após a fertilização, cada desova foi separada em dois tratamentos, um que recebeu choque de temperatura para indução à triploidia (40°C, 2 minutos) dois minutos após a fertilização (ADAMOV, 2013) e outro que permaneceu intacto (grupo controle). Os ovos de cada tratamento foram separados em aquários de 40 litros, onde permaneceram da eclosão até 30 dias de vida. Neste momento, 120 peixes de cada tratamento e de cada repetição foram alocados em seis aquários de 75 litros (3 diploides e 3 triploides), com recirculação de água e temperatura controlada à 28°C. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (até saciedade aparente) com ração comercial contendo 45 % de proteína bruta.

2.2 Biometrias, coletas e análises

Foram realizadas cinco amostragens, a primeira com 52 dias de vida e as demais a cada 30 dias (até os peixes completarem 175 dias). Em cada intervalo, 10 peixes de cada repetição aletoriamente selecionados (independente do sexo), pesados e medidos (comprimento padrão) e eutanasiados, sendo as vísceras e gônadas pesadas para o

calculo do índice viscerossomático (IVS) e índice gonadossomático (IGS), respectivamente. A carcaça também foi pesada para mensuração do rendimento de carcaça (%). O Fator de condição (K) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$K = (P * 100) / (CP^3)$, onde P = peso (g) e CP = comprimento padrão (cm).

Durante as duas primeiras coletas, machos e fêmeas foram separados e mensurados por meio da visualização macroscópica das gônadas dos peixes eutanasidados (n=10 para cada repetição). No entanto, a partir da terceira coleta, todos os peixes foram pesados e medidos, sendo a diferenciação sexual realizada pelo toque na nadadeira anal (com presença de espiculas nos machos).

Ao final do período experimental machos e fêmeas diploides e triploides (n=6) foram aleatoriamente selecionados para análise do perfil de ácidos graxos da carcaça e mantidos em freezer -18 C, até posterior análise.

2.3 Análise de ácidos graxos da carcaça

A quantidade total de lipídios presente na carcaça de machos e fêmeas diploides e triploides foi mensurada pelo método de Bligh e Dyer (1959), realizada em cromatógrafo a Gás CG-14B (Shimadzu) com coluna capilar sílica fundida OMEGAWAX250 (30m x 0,25mm x 0,25μm) e detector FID (Detector de Ionização de Chama). A temperatura da coluna foi programada para 100°C por 2 minutos, seguida de aquecimento de 4°C por minuto até alcançar 220°C, permanecendo nesta temperatura por mais 25 minutos. As temperaturas de injeção e detecção foram de 250°C e 280°C, respectivamente. A vazão do gás de arraste (H2) foi de 1 ml/min e dose de 1 μL.

2.4 Confirmação da ploidia

A ploidia dos peixes diploides e triploides foi confirmada através de citometria de fluxo em relação ao conteúdo relativo de DNA (Fig. 1), por meio da comparação com controles diploides. Para tanto, foi retirada uma pequena porção da nadadeira caudal inserida em solução de remoção de membrana (9,53 mM $MgSO4.7H_2O$, 47,67mM KCl, 15 mM Tris, 74 mM Sucrose, 0,8% Triton X-100) por 10 minutos. Posteriormente, para coloração dos núcleos liberados, foi adicionado 800 μL de solução de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride - DAPI (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline). As amostras foram filtradas em telas de nylon de 30 μm e analisadas em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer,Partec, GMBh, Alemanha).

3. Análise estatística

Os resultados obtidos são apresentados como média ± erro padrão. Após serem previamente testados quanto à normalidade (Lilliefors 5%), os dados obtidos da análise de ácidos graxos foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey (5%). Já os demais dados foram comparados pelo teste t pareado (5%). A análise foi realizada por meio do software STATISTICA (Versão 10.0, Statsoft, Tulsa, U.S.A.).

4. Resultados

4.1 Crescimento e peso

Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) da ploidia sobre o crescimento e peso de fêmeas até 114 dias (Fig. 2 e 3). No entanto, nas últimas amostragens, fêmeas triploides (3n) passaram a apresentar maior comprimento padrão e peso em relação às fêmeas diploides (2n) (Fig. 2 e 3).

Para machos, só foi verificado efeito significativo ($P < 0,05$) da ploidia sobre o comprimento a partir da 144 dias, quando peixes 3n apresentaram valores superiores. Contudo, este cenário foi invertido com 175 dias, quando foi registrado maior comprimento para os machos 2n (Fig. 2). No que se refere ao peso, machos 3n apresentaram médias significativamente maiores ($P < 0,05$) de 83 até 144 dias de vida (Fig. 3).

Vale destacar que durante o período experimental, não foi verificada significativa mortalidade entre machos e fêmeas de ambas ploidias.

4.2 Rendimento de carcaça

Aos 52 e 83 dias não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para o rendimento de carcaça entre fêmeas 2n e 3n (Fig. 4). No entanto, de 114 até 175 dias, fêmeas 3n passaram a apresentar valores maiores (Fig. 4). Para os machos, não foi verificada diferença estatística ($P > 0,05$) para o rendimento de carcaça em nenhuma das amostragens realizadas (Fig. 4).

4.3 Índice gonadossomático (IGS) e viscerossomático (IVS)

Nas fêmeas, com 52 e 83 dias, não foi verificada diferença estatística ($P > 0,05$) para o índice viscerossomático (IVS) e gonadossomático (IGS) entre as duas ploidias. No entanto, de 114 até 175 dias, fêmeas 2n passaram a apresentaram valores de IVS e IGS superiores (Fig. 5 e 6). Nos machos, entre os peixes 2n e 3n, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) para os valores de IVS e IGS em nenhum dos tempos analisados.

Macroscopicamente, machos 2n e 3n apresentaram gônadas semelhantes (Fig. 7 C,D). Por outro lado, gônadas de fêmeas 2n e 3n mostraram morfologia distinta, sendo evidente o menor desenvolvimento nas fêmeas 3n (Fig. 7 A,B).

4.4 Fator de condição

De 52 até 144 dias, não foi observado diferença significativa ($P > 0,05$) para o fator de condição entre fêmeas 2n e 3n, assim como para os machos 2n e 3n. No entanto, com 144 e 175 dias, fêmeas 2n apresentaram médias maiores ($P < 0,05$) em comparação com as 3n (Fig. 8). Para os machos, com 144 dias, foram observados valores superiores para os 2n (Fig. 8). Contudo, este resultado foi invertido com 175 dias, quando os machos 3n passaram a exibir maior fator de condição (Fig. 8).

4.5 Ácidos graxos

A composição de ácidos graxos referente à ploidia e sexo (F 2n, M 2n, F 3n, M 3n) está apresentada na Tabela 1. De maneira geral, as maiores diferenças foram observadas entre as fêmeas 2n e 3n.

4.5.1 Saturados

Em comparação com os 3n, foi observado que peixes 2n apresentaram maior nível de ácidos graxos saturados ($P < 0,05$), em especial o hexadecanóico para fêmeas 2n (C16:0) ($P < 0,05$). Por outro lado, peixes (3n) apresentaram uma diminuição nos níveis desses ácidos graxos, como observado o pentadecanóico (C15:0) e hexadecanóico (C16:0) ($P < 0,05$) e o ácido graxo araquidônico (20:0), o qual foi significativamente menor em fêmeas 3n ($P < 0,05$).

4.5.2 Monoinsaturados

No entanto, em relação aos ácidos graxos monoinsaturados, os maiores níveis foram observados para peixes 3n ($P < 0,05$) e em especial as fêmeas 3n ($P < 0,05$). Os ácidos graxos éster metílico (C18:1n9c) e ecosenóico (C20:1n9) apresentaram expressivos níveis em fêmeas 3n ($P < 0,05$), o que explica o resultado observado. Por

outro lado, fêmeas e machos 2n apresentaram baixos níveis de ácidos graxos monoinsaturados ($P < 0,05$), em especial o ecosenóico (C20:1n9c) para fêmeas 2n ($P < 0,05$).

4.5.3 Poli-insaturados

Os menores níveis de ácidos graxos poli-insaturados foram observados nos peixes 3n ($P < 0,05$), com expressiva diferença para as fêmeas ($P < 0,05$), como no C20:5n3 ($P < 0,05$), C20:4n6 ($P < 0,05$), C18:3n6 ($P < 0,05$) e C18:3n3 ($P < 0,05$). Portanto, peixes 2n apresentaram maiores níveis de ácidos graxos poli-insaturados ($P < 0,05$), com destaque para as fêmeas, como no C20:4n6 ($P < 0,05$), C18:2n6c ($P < 0,05$), C18:3n6 ($P < 0,05$) e C20:3n6 ($P < 0,05$), C20:4n6 ($P < 0,05$). Fêmeas 2n também apresentaram maiores níveis na soma dos ácidos graxos da série n6 e n3 em comparação com as fêmeas 3n ($P < 0,05$). Já os machos diploides apresentaram maiores valores que as fêmeas 3n ($P < 0,05$), no entanto, com valores semelhantes aos machos 3n ($P > 0,05$).

5. Discussão

Foi observado que fêmeas 3n apresentam maior crescimento e peso do que fêmeas 2n. Este resultado, provavelmente, é efeito do índice gonadossomático reduzido nas fêmeas 3n, ou seja, a energia que seria destinada para os processos reprodutivos foi convertida para o crescimento somático. Este resultado é comumente encontrado na literatura (PIFERRER et al., 2009), sendo relatado para triploides de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (TABATA; RIGOLINO e TSUKAMOTO, 1999), bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011) e truta marrom (*Salmo trutta fario*) (KIZAK et al., 2013).

A partir do momento em que fêmeas 2n atingem a maturação sexual, evento que requer grande despendimento de energia, fêmeas 3n passam a apresentar vantagens no crescimento e superam as 2n (KOEDPRANG e NAKORN, 2000; LUTZ, 2003; DUNHAM, 2004). Este fato é corroborado no presente estudo, pois no mesmo momento (144 e 175 dias) em que fêmeas 3n apresentaram menor IGS e maior crescimento, foi observado um aumento no IGS das fêmeas 2n.

No que se refere ao rendimento de carcaça, este foi maior nas fêmeas 3n, sendo, provavelmente, reflexo da energia desviada das gônadas. Este resultado é vantajoso, pois os ganhos de produção podem ser incrementados, como observado por Feindel et al. (2011). De acordo com Werner et al. (2008), a esterilização pode afetar positivamente o rendimento do filé, através de um processo de hipertrofia muscular, o que também pode ter ocorrido no *A. altiparanae*.

O índice viscerossomático (IVS) acompanhou os resultados do IGS, sendo que fêmeas 2n apresentaram altos valores, ao contrário dos peixes 3n. Este resultado destaca a vantagem apresentada pelas fêmeas 3n, as quais exibem menor conteúdo de vísceras. Adicionalmente, o menor fator de condição (K) encontrado para fêmeas 3n vai de acordo com diversos outros estudos (FRIARS et al., 2001; CANTAS et al., 2011; FRASER et al., 2012; FRASER et al., 2013; TAYLOR et al., 2014), corroborando que estes peixes têm mais comprimento e peso.

Machos 3n exibem, frequentemente, crescimento similar aos 2n (DUNHAM, 2004; PERUZZI et al., 2009; FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2010; KIZAK et al., 2013). Neste estudo, apesar de apresentarem maior crescimento e peso em algumas épocas, esta vantagem foi superada pelos diploides com 175 dias, único momento em que houve diferença no fator de condição (K). Estes resultados similares são,

possivelmente, reflexos do IGS semelhante entre as duas ploidias, fato que também é usualmente encontrado na literatura (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011; KIZAK et al., 2013). No entanto, apesar da semelhança macroscópica das gônadas, o sêmen dos machos 3n apresenta geralmente pouca concentração, são anormais e aneuploides (LINHART et al., 2006; FUJIMOTO et al., 2008; HAMASAKI et al., 2013), o que reduz consideravelmente a capacidade de fertilização ou até inviabiliza a prole (PERUZZI et al., 2009; FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2010).

Nos machos, o rendimento de carcaça e IVS também foi similar para ambas ploidias, sugerindo que, ao contrário das fêmeas 3n, não houve energia extra destinada ao crescimento somático nos peixes 3n, como observado por Kizak et al. (2013). Portanto, de um ponto de vista de produção aquícola, machos 3n não apresentam vantagens em relação aos 2n.

No que se refere a composição de ácidos graxos, esta pode ser influenciada por diversos fatores, como alimentação, época do ano, qualidade da água, ploidia, espécie etc. (BUCHTOVA et al., 2004). Neste estudo, foram observadas pequenas diferenças na composição de ácidos graxos entre machos 2n e 3n. Este resultado indica que, apesar de apresentarem IGS semelhante, a triploidia também afeta a fisiologia e mobilização de ácidos graxos nos machos (MANOR et al., 2012). No entanto, a maior diferença foi identificada quando as fêmeas são comparadas. Este resultado é esperado, pois os eventos de reprodução requerem alta quantidade de energia e a principal função dos ácidos graxos é fornecer a mesma na forma de ATP (TURCHINI; TORSTENSEN e NG, 2009), portanto, o desenvolvimento gonadal reduzido em fêmeas 3n influenciou consideravelmente no perfil de ácidos graxos.

Nas gônadas, os ácidos graxos saturados são importantes na formação, estruturação e funcionamento das membranas celulares (NG e WANG, 2011) e neste estudo, fêmeas 2n apresentaram maiores valores destes ácidos graxos. Em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), Manor et al. (2012) observaram que o desenvolvimento dos ovos foi associado a diminuição nos ácidos graxos saturados do tecido adiposo presente músculo e principalmente nas vísceras. Portanto, mesmo fenômeno poderia estar ocorrendo nas fêmeas 2n de *A. altiparanae*, ou seja, os ácidos graxos saturados estariam sendo mobilizados, especialmente das vísceras, para o desenvolvimento gonadal.

Por outro lado, foi observado que fêmeas 3n contém maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados. O ácido graxo C 18: 1n9 foi o principal responsável por este resultado, pois foi significativamente menor nas fêmeas 2n. Ribeiro et al. (2012) observou que ácidos graxos monoinsaturados, em especial o ácido oleico (C 18: 1n9), foram deslocados para os ovários pós-ovulatórios em fêmeas de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*). Adicionalmente, de acordo com Henderson et al. (1984), os peixes necessitam de C 18: 1n 9 durante o período de ovulação e desova. Portanto, a diferença observada para os ácidos graxos monoinsaturados em fêmeas, provavelmente, é devido à mobilização dos mesmos para o desenvolvimento ovariano e ovulação em fêmeas 2n.

No que se refere aos ácidos graxos poli-insaturados, estes foram observados em maior quantidade nas fêmeas 2n. Mesmo resultado foi observado por Buchotová et al. (2004) para *Tinca tinca* com 42 meses de idade. Em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), como as fêmeas 3n são estéreis, não acumulam tais ácidos graxos nos músculos (RIBEIRO et al., 2012), o que explica a maior concentração dos mesmos em fêmeas 2n. Nestas, a presença de ácidos graxos n3 e n6 acumulados no músculo, como o C20:5n3,

são importantes, pois podem ser facilmente deslocados para as gônadas, facilitando a vitelogênese e reprodução (BELL e TOCHER, 1995; RIBEIRO et al., 2012).

Os ácidos graxos poli-insaturados, em especial ômega 3 e ômega 6, são interessantes para o consumo e produção, pois influenciam na qualidade e valor nutricional do filé (MANOR et al., 2012). Adicionalmente, de acordo com Ribeiro et al. (2012) a menor porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados e maior de saturados e monoinsaturados, não são comercialmente interessantes. Portanto, devido às importantes vantagens apresentadas no desempenho de fêmeas 3n de *A. altiparanae*, o menor valor para os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 e 6 poderia ser compensado através da suplementação dos mesmos na dieta.

Concluindo, triploides de *A. altiparanae* apresentam características típicas e similares ao já descrito para outras espécies, onde machos 3n não apresentam vantagens em relação aos 2n. Por outro lado, fêmeas 3n, além de apresentarem desenvolvimento gonadal reduzido, exibem vantagens no crescimento, o que as coloca como interessante opção para incrementar a produção. Adicionalmente, a produção de proles 100% fêmeas 3n seria um passo importante para aumentar ainda mais os ganhos e diminuir os riscos de introgressão.

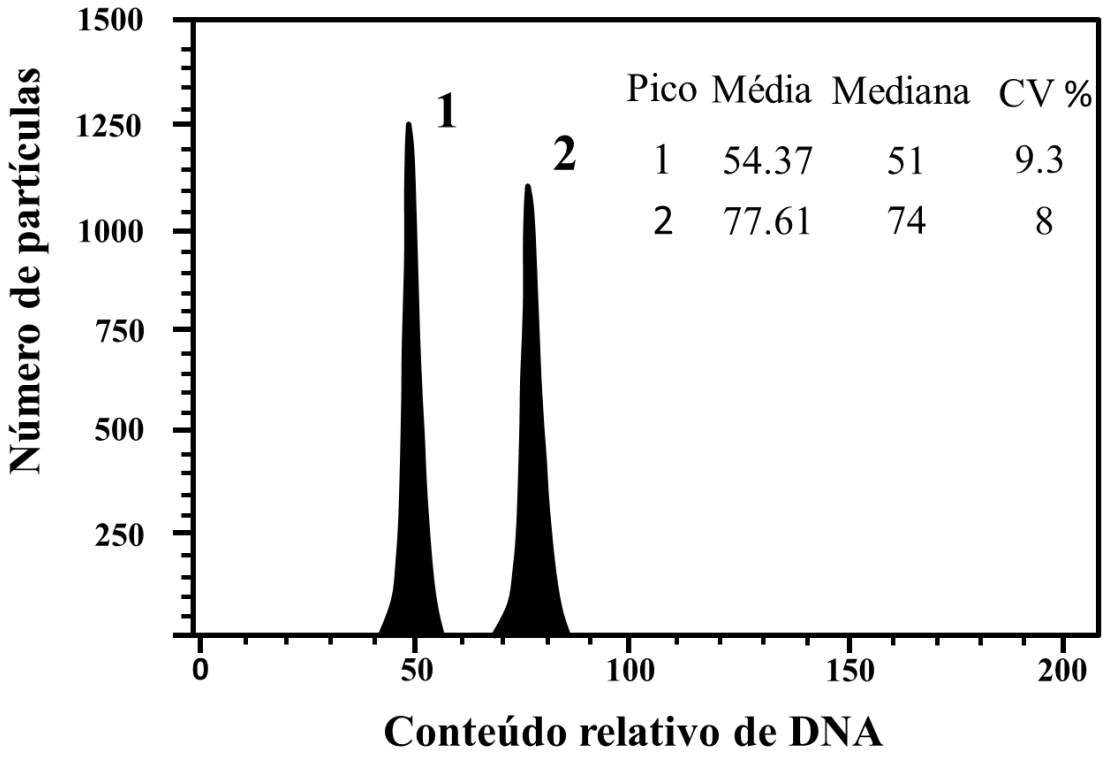

Figura 1. Histograma de citometria de fluxo da nadadeira de um indivíduo diploide (1) e triploide (2) de lambari (*Astyanax altiparanae*).

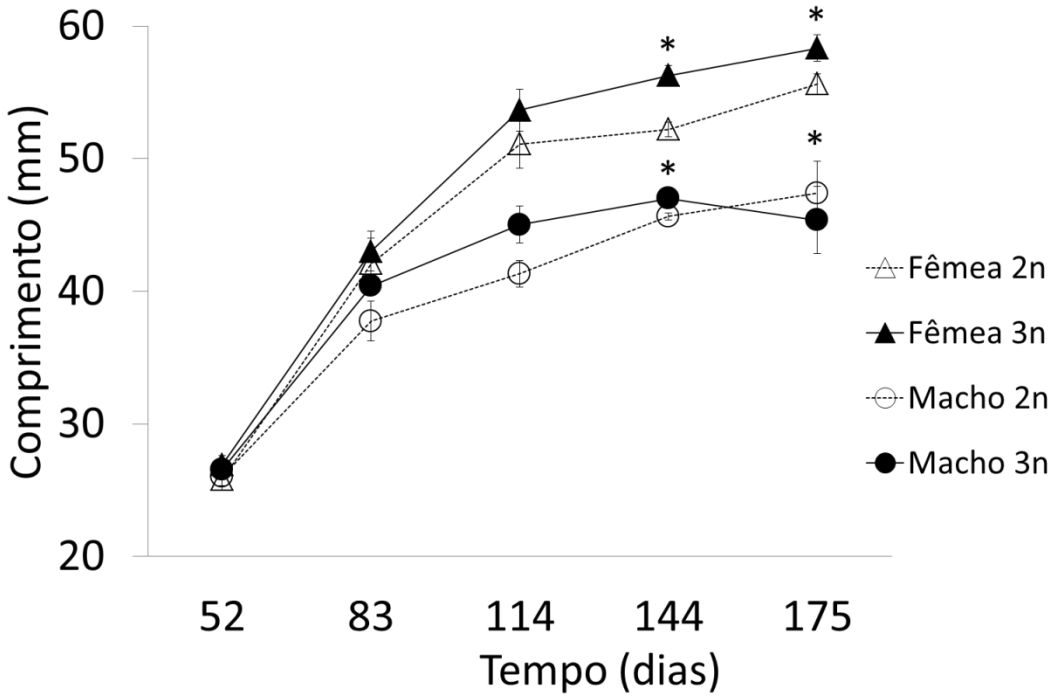

Figura 2. Comprimento padrão (mm) de fêmeas e machos 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triploides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$).

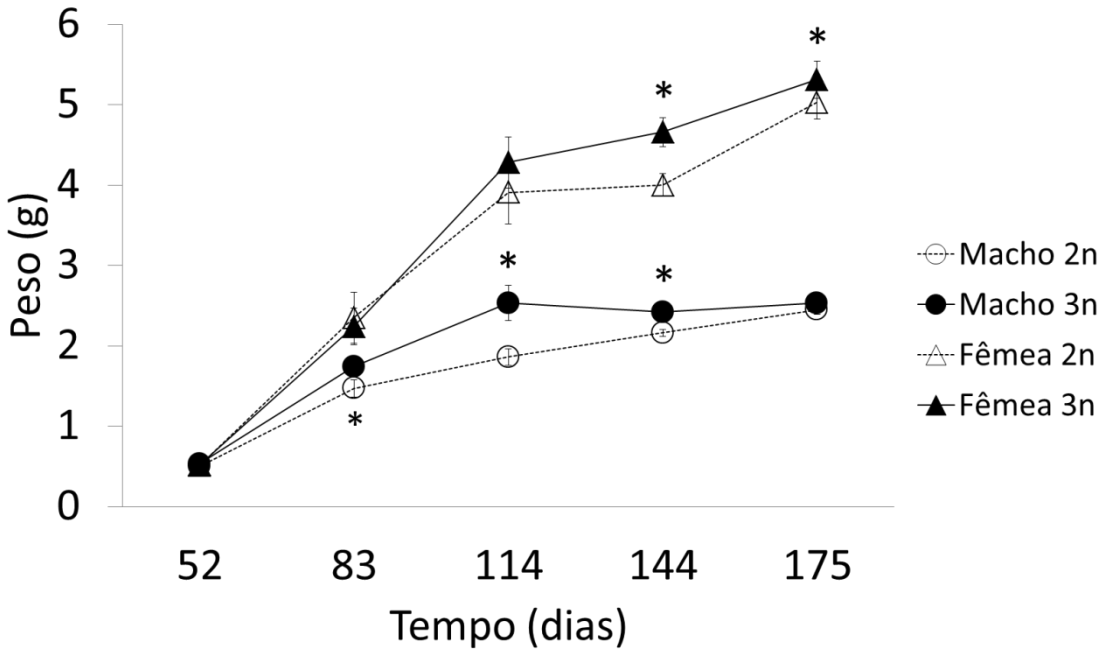

Figura 3. Peso (g) de fêmeas e machos 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triploides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$).

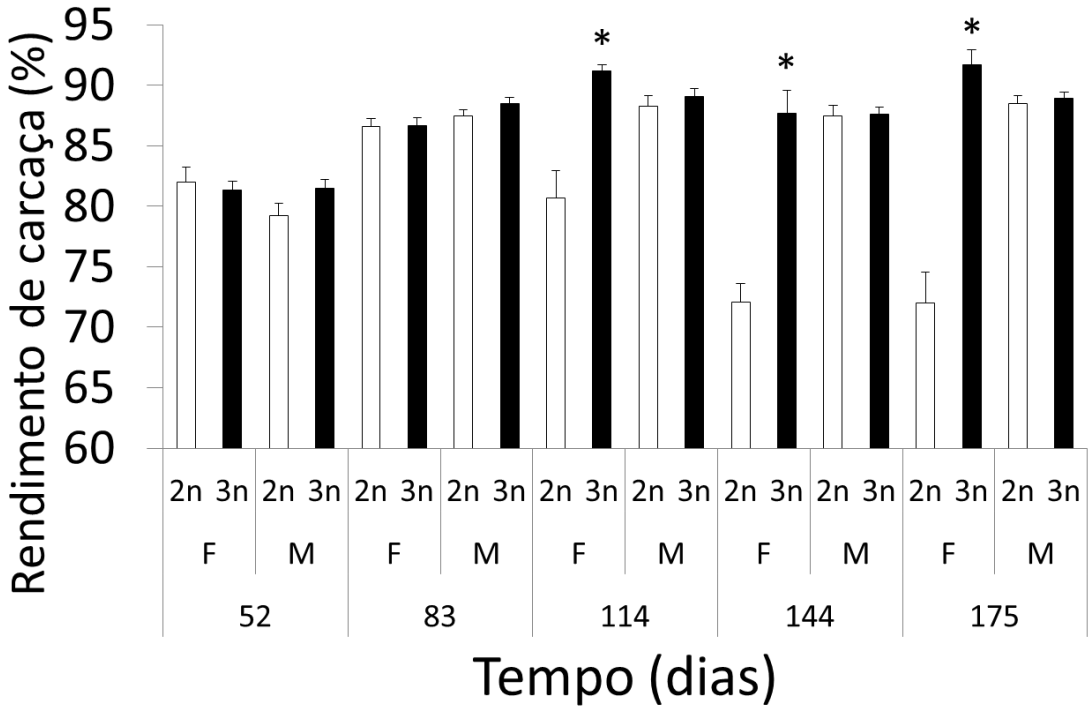

Figura 4. Rendimento de carcaça (%) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão) Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triploides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$).

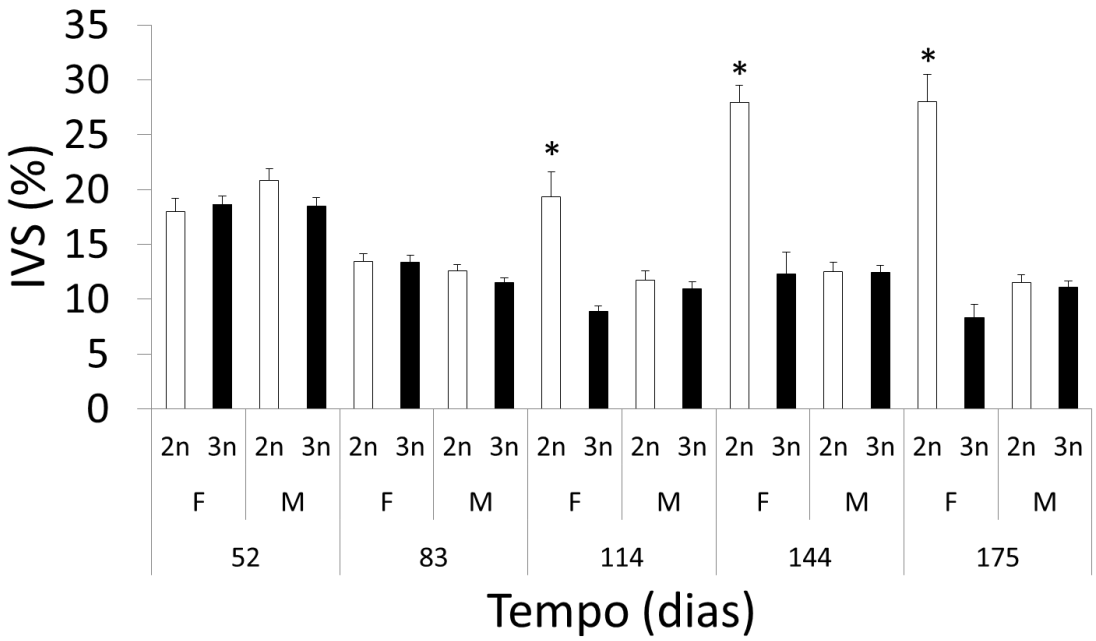

Figura 5. Índice viscerossomático (IVS, %) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triploides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$).

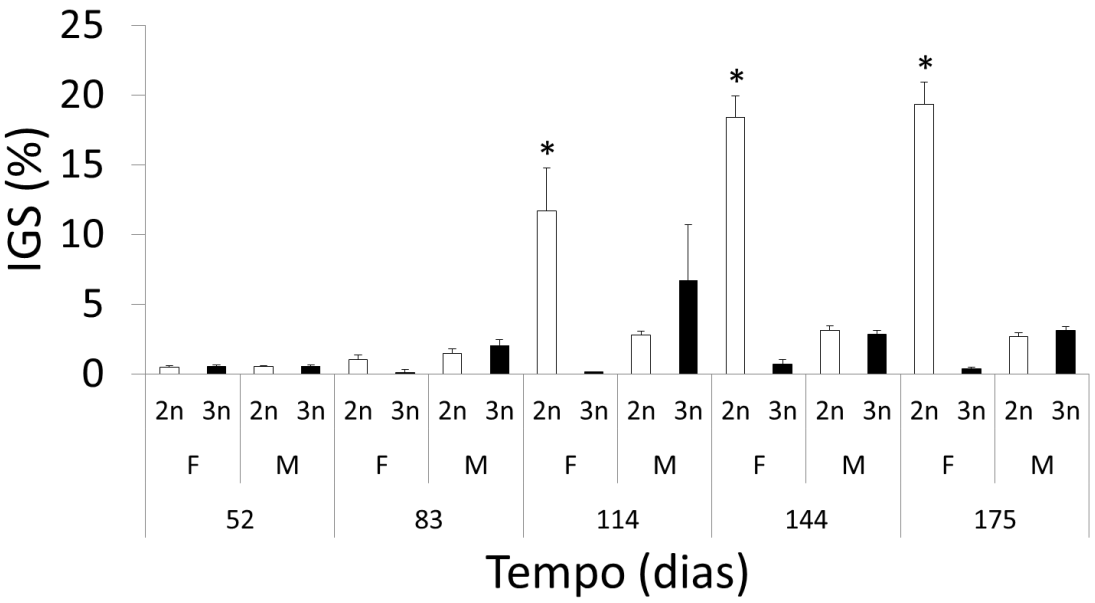

Figura 6. Índice gonadossomático (IGS, %) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triploides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$).

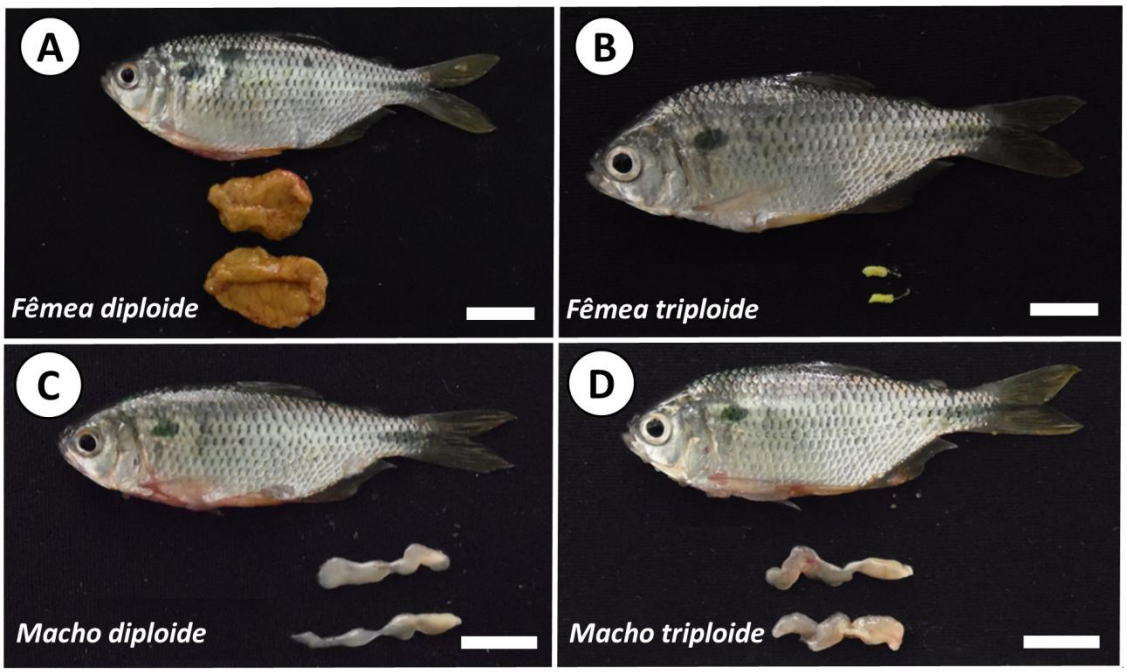

Figura 7. Morfologia externa de peixes e gônadas de *Astyanax altiparanae*. Fêmeas 2n (A) e 3n (B) e machos 2n (C) e 3n (D). Escala: 1 cm.

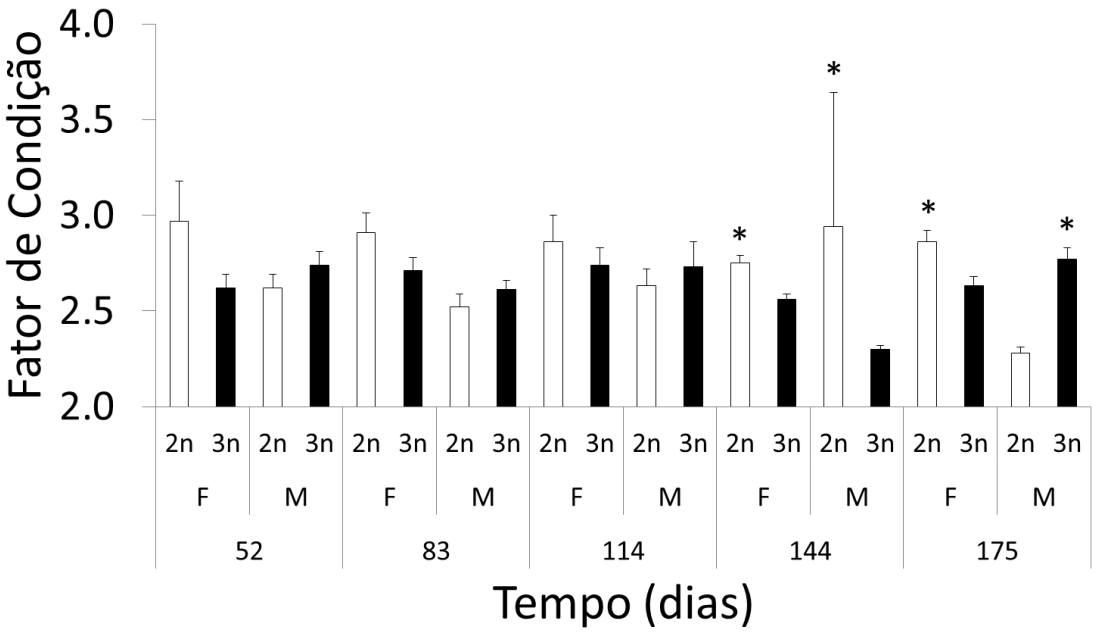

Figura 8. Fator de condição (K) de fêmeas (F) e machos (M) 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* com 52 até 175 dias de vida. Médias ± erro padrão. Asteriscos indicam significância estatística entre diploides e triploides do mesmo sexo (teste t, $P < 0,05$).

Tabela 1 Composição de ácidos graxos (%) de diploides (2n) e triploides (3n) de *Astyanax altiparane* (F-fêmea, M-macho).

Index (%)	Fêmea 2n Média ± SE	n 7	Macho 2n Média ± SE	n 6	Fêmea 3n Média ± SE	n 6	Macho 3n Média ± SE	n 6	Significância estatística
Ácidos graxos saturados									
C12:0	0,04 ± 0,01		0,04 ± 0,01		0,03 ± 0,01		0,04 ± 0,01		_*
C14:0	1,67 ± 0,07		1,57 ± 0,05		1,50 ± 0,05		1,56 ± 0,03		_*
C15:0	0,44 ± 0,06^{a}		0,45 ± 0,04^{a}		0,32 ± 0,03^{b}		0,38 ± 0,01^{ab}		$p < 0,05$
C16:0	23,23 ± 0,48^{a}		22,04 ± 0,42^{ab}		21,5 ± 0,16^{b}		21,44 ± 0,08^{b}		$p < 0,05$
C17:0	0,69 ± 0,08		0,7 0 ± 0,04		0,55 ± 0,04		0,60 ± 0,01		_*
C18:0	9,48 ± 0,09		9,53 ± 0,08		9,51 ± 0,15		9,30 ± 0,04		_*
C 20:0	0,29 ± 0,01^{ab}		0,32 ± 0,01^{a}		0,26 ± 0,01^{b}		0,29 ± 0,01^{a}		$p < 0,05$
SFA $_{soma}$	35,89 ± 0,59^{a}		34,71 ± 0,50^{ab}		33,7 ± 0,27^{b}		33,65 ± 0,08^{b}		$p < 0,05$
Ácidos graxos monoinsaturados									
C14:1	0,06 ± 0,01		0,05 ± 0,01		0,06 ± 0,01		0,06 ± 0,01		_*
C16:1	3,03 ± 0,13		2,95 ± 0,06		2,98 ± 0,02		3,06 ± 0,02		_*
C 17:1	0,37 ± 0,02		0,38 ± 0,03		0,32 ± 0,01		0,37 ± 0,01		_*
C18:1n9c	34,59 ± 2,32^{a}		36,16 ± 1,02^{a}		41,25 ± 1,21^{b}		39,00 ± 0,15^{ab}		$p < 0,05$
C18:1n7	2,23 ± 0,07^{a}		2,09 ± 0,06^{a}		1,77 ± 0,11^{b}		2,11 ± 0,05^{a}		$p < 0,05$
C20:1n9	0,69 ± 0,02^{a}		0,84 ± 0,02^{b}		0,84 ± 0,01^{b}		0,88 ± 0,01^{b}		$p < 0,05$
C24:1n9	0,45 ± 0,06		0,49 ± 0,03		0,38 ± 0,05		0,40 ± 0,01		_*
MUFA $_{soma}$	41,42 ± 2,25^{a}		42,96 ± 0,92^{a}		47,59 ± 1,07^{b}		45,87 ± 0,13^{ab}		$p < 0,05$
Ácidos graxos poliinsaturados									
C18:2n6c	11,82 ± 0,66^{a}		11,10 ± 0,29^{ab}		10,01 ± 0,12^{b}		11,16 ± 0,20^{ab}		$p < 0,05$
C18:3n6	0,16 ± 0,02^{a}		0,14 ± 0,01^{ab}		0,09 ± 0,01^{b}		0,13 ± 0,01^{ab}		$p < 0,05$
C18:3n3	1,22 ± 0,22^{ab}		1,49 ± 0,19^{a}		0,80 ± 0,09^{b}		1,15 ± 0,05^{ab}		$p < 0,05$
C18:2c9,t11	0,21 ± 0,04		0,24 ± 0,03		0,15 ± 0,01		0,19 ± 0,01		_*
C18:2t10,c12	0,02 ± 0,01		0,02 ± 0,01		0,02 ± 0,01		0,02 ± 0,01		_*
C20:2	0,41 ± 0,06		0,46 ± 0,03		0,26 ± 0,01		0,40 ± 0,01		_*
C20:3n6	0,5 ± 0,07^{a}		0,38 ± 0,02^{ab}		0,28 ± 0,02^{b}		0,33 ± 0,01^{b}		$p < 0,05$
C20:4n6	1,44 ± 0,33^{a}		1,38 ± 0,11^{ab}		0,75 ± 0,10^{b}		1,06 ± 0,02^{ab}		$p < 0,05$
C20:3n3	0,10 ± 0,02		0,12 ± 0,01		0,08 ± 0,01		0,09 ± 0,01		_*
C20:5n3	0,90 ± 0,05^{a}		0,92 ± 0,05^{a}		0,72 ± 0,03^{b}		0,85 ± 0,03^{ab}		$p < 0,05$
C22:4n6	0,24 ± 0,06		0,21 ± 0,03		0,12 ± 0,02		0,16 ± 0,01		_*
C 22:5n6	0,49 ± 0,16		0,53 ± 0,05		0,25 ± 0,06		0,37 ± 0,01		_*
C22:6n3	5,19 ± 0,86		5,38 ± 0,36		3,73 ± 0,41		4,58 ± 0,14		_*
PUFA n6$_{soma}$	14,65 ± 1,88^{a}		13,74 ± 1,77^{ab}		11,50 ± 1,62^{b}		13,21 ± 1,80^{ab}		$p < 0,05$
PUFA n3$_{soma}$	7,41 ± 1,14^{ab}		7,91 ± 1,68^{a}		5,33 ± 0,81^{b}		6,67 ± 1,00^{ab}		$p < 0,05$
PUFA $_{soma}$ total	22,70 ± 2,10^{a}		22,37 ± 0,73^{a}		16,83 ± 0,77^{b}		20,50 ± 0,18^{ab}		$p < 0,05$
n-6/n-3	1,98^{ab}		1,74^{a}		2,16^{b}		1,98^{ab}		$p < 0,05$

_* Sem diferença significativa à ($P < 0,05$)

Valores com distintas letras sobrescritas expressam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$)

6. Agradecimentos

O Autor é grato ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida, ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), FAPESP (JP - FAPESP 2010/17429-1), ao CEPTA/ICMBio pelo fornecimento dos animais e à FCAV/UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) pelo auxílio na análise de ácidos graxos.

6. Referências

ADAMOV, N. **Triploidização no lambari (*Astyanax altiparanae*)**. 2013. (Trabalho de conclusão de Curso). PUC, Campinas.

ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture,** v. 197, n. 1-4, p. 205-228, Jun 1 2001. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168775000010 >.

BELL, M. V. e TOCHER, D. R. Biosynthesis of polyunsatured fatty acids in aquatic ecosystems: General patways and new directions. In: ARTS, M. T.; BRET, M. T.*, et al* (Ed.). **Lipid in aquatic ecosystems**. New York: Springer Science, v.37, 1995.

BUCHTOVA, H.; SMUTNA, M.; VORLOVA, L.; SVOBODOVA, Z.; FLAJSHANS, M. Fatty acid composition of diploid and triploid populations of tench (*Tinca tinca* L.). **Acta Veterinaria Brno,** v. 73, n. 2, p. 235-245, Jun 2004. ISSN 0001-7213. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223216200014 >.

CANTAS, L.; FRASER, T. W. K.; FJELLDAL, P. G.; MAYER, I.; SORUM, H. The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - a comparison of composition and drug resistance. **Bmc Veterinary Research,** v. 7, Nov 17 2011. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298228000001 >.

DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Oxford: GABI Publishing, 2004.

FEINDEL, N. J.; BENFEY, T. J. e TRIPPEL., E. A. Competitive spawning success and fertility of triploid male Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture Environment Interactions,** v. 1, p. 47 - 55, 2010.

_____. Gonadal development of triploid Atlantic Cod *Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology,** v. 79, p. 1900 - 1912, 2011.

FRASER, T. W. K.; FJELLDAL, P. G.; HANSEN, T.; MAYER, I. Welfare Considerations of Triploid Fish. **Reviews in Fisheries Science,** v. 20, n. 4, p. 192-211, 2012 2012. ISSN 1064-1262. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310138800002 >.

FRASER, T. W. K.; HANSEN, T.; SKAJAERAASEN, J. E.; MAYER, I. The effect of triploidy on the culture performance, deformity prevalence and heart morphology in Atlantic salmon. **Aquaculture**, p. 255 - 264, 2013.

FRIARS, G. W.; MCMILLAN, I.; QUINTON, V. M.; O'FLYNN, F. M.; MCGEACHY, S. A.; BENFEY, T. J. Family differences in relative growth of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture,** v. 192, n. 1, p. 23-29, Jan 1 2001. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165053700002 >.

FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S.; YOSHIKAWA, H.; YAMAHA, E.; ARAI, K. 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, Aug 2008. ISSN 0175-8659. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258458400013 >.

HAMASAKI, M.; TAKEUCHI, Y.; MIYAKI, K.; YOSHIZAKI, G. Gonadal Development and Fertility of Triploid Grass Puffer *Takifugu niphobles* Induced by Cold Shock Treatment. **Marine Biotechnology,** v. 15, n. 2, p. 133-144, Apr 2013. ISSN 1436-2228. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314987500002 >.

HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R. e HOPKINS, C. C. E. Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin, *Mallotus villosus*, during sexual maturation and spawning. **Marine Biology,** v. 78, n. 255 - 263, 1984.

KIZAK, V.; GUNER, Y.; TUREL, M.; KAYIM, M. Comparison of Growth Performance, Gonadal Structure and Erythrocyte Size in Triploid and Diploid Brown Trout (*Salmo trutta fario* L, 1758). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,** v. 13, p. 571 - 580, 2013.

KOEDPRANG, W. e NAKORN, U. N. Preliminary study on performance of triploid Thai silver barb, *Puntius gonionotus*. **Aquaculture,** v. 190, p. 211 - 221, 2000.

LECLERCQ, E.; TAYLOR, J. F.; FISON, D.; FJELLDAL, P. G.; DIEZ-PADRISA, M.; HANSEN, T.; MIGAUD, H. Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology,** v. 158, n. 1, p. 116-125, Jan 2011. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286027200016 >.

LINHART, O.; RODINA, M.; FLAJSHANS, M.; MAVRODIEV, N.; NEBESAROVA, J.; GELA, D.; KOCOUR, M. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). **Aquaculture International,** v. 14, n. 1-2, p. 9-25, Feb 2006. ISSN 0967-6120. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234692500003 >.

LUTZ, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. London: Blackwell, 2003.

MANOR, M. L.; WEBER, G. M.; SALEM, M.; YAO, J.; AUSSANASUWANNAKUL, A.; KENNEY, P. B. Effect of sexual maturation and triploidy on chemical composition and fatty acid content of energy stores in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, p. 312-321, 2012.

NG, W. K. e WANG, Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reprodutive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. **Aquaculture,** v. 314, p. 122 - 131, 2011.

PERUZZI, S.; RUDOLFSEN, G.; PRIMICERIO, R.; FRANTZEN, M.; KAURIC, G. Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture Research,** v. 40, n. 10, p. 1160-1169, Jul 7 2009. ISSN 1355-557X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267657000006 >.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIERE, J.-C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture,** v.

293, n. 3-4, p. 125-156, Aug 16 2009. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268150000001 >.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEDIA, R. B. e FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSERTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.105-120.

RIBEIRO, C. S.; GOMES, A. D.; VIEIRA, V. A. R. O.; TABATA, Y. A.; TAKAHASHI, N. S.; MOREIRA, R. G. The effect of ploidy on the fatty acid profile during the reproductive cycle of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International,** v. 20, p. 1117-1137, 2012.

SACOBIE, C. F. D.; GLEBE, B. D.; BARBEAU, M. A.; LALL, S. P.; BENFEY, T. J. Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. **Aquaculture,** v. 334, p. 58-64, Mar 7 2012. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301693600008 >.

TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. e TSUKAMOTO, R. Y. Production of all female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III. Growth up to first sexual maturation. **Boletim do Instituto de Pesca,** v. 4, p. 101 - 102, 1999.

TAYLOR, J. F.; BOZZOLLA, P.; FRENZL, B.; MATTHEW, C.; HUNTER, D.; MIGAUD, H. Triploid Atlantic salmon growth is negatively affected by communal ploidy rearing during seawater grow-out in tanks. **Aquaculture,** v. 432, n. 0, p. 163-174, 8/20/ 2014. ISSN 0044-8486. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614002336 >.

TURCHINI, G. M.; TORSTENSEN, B. E. e NG, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture,** v. 1, p. 10 - 57, 2009.

TURNER, N.; ELSE, P. L. e HULBERT, A. J. Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. **Naturwis-sensachaften,** v. 90, p. 521 - 523, 2003.

WERNER, C.; POONTAWEE, K.; MUELLER-BELECKE, A.; HOERSTEGEN-SCHWARK, G.; WICKE, M. Flesh characteristics of pan-size triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in a commercial fish farm. **Arch. Tierz.,** v. 51, p. 71 - 83, 2008.

YASUI, G. S.; SANTOS, M. P.; NAKAGHI, L. S. O.; SENHORINI, J. A.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, p. 1-10, 2014.

Capitulo II Aspectos reprodutivos de peixes diploides e triploides de lambari (*Astyanax altiparanae*)

O manuscrito será submetido ao periódico **"**Aquaculture" (Fator de Impacto: 1.8).

RESUMO

O *Astyanax altiparanae* é uma espécie interessante para aquicultura e estudos de manipulação cromossômica. Fêmeas triploides desta espécie apresentam desenvolvimento gonadal reduzido e maior crescimento, enquanto que nos machos tais características são similares. Assim, para verificar a possível esterilidade e existência de vantagens na produção de peixes 3n, este estudo tem como objetivo analisar histologicamente as gônadas, as espículas das nadadeiras pélvicas e anais (características sexuais secundárias em machos), alguns parâmetros seminais (motilidade, concentração, viabilidade), a ultraestrutura dos espermatozoides e ploidia do sêmen de peixes 2n e 3n. A triploidia foi induzida por choque de temperatura (40°C por 2 minutos) 2 minutos após a fertilização, sendo os ovos tratados e o grupo controle criados separados e em condições semelhantes até 186 dias pós-eclosão. Machos 3n (175 dias) apresentaram espículas nas nadadeiras pélvicas e anal, assim como os 2n. Os resultados da histologia evidenciam que fêmeas 2n (175 dias) exibiram gônadas desenvolvidas e ovócitos vitelogênicos. Por outro lado, fêmeas 3n exibiram gônadas imaturas. Nas gônadas dos machos 2n e 3n foram identificadas espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides. No entanto, machos 2n mostraram maior quantidade espermatozoides em relação aos 3n. Machos 3n também apresentaram menor concentração espermática, motilidade e tempo de motilidade. No que se refere à viabilidade espermática, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$). Os espermatozoides de ambas ploidias apresentaram ultraestrutura similar e mesmo número

de mitocôndrias, sendo constituídos de três componentes: cabeça (redonda), peça intermediária e flagelo, este com constituição tubular típica (9+2). Adicionalmente, a análise de citometria de fluxo mostrou que machos triploides produzem espermatozoides aneuplóides (n=1,71). Em conclusão, a triploidização não garante a esterilidade nos machos, no entanto, as fêmeas 3n podem ser consideradas estéreis e são recomendadas para produção do *A. altiparanae*.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*, esterilidade, manipulação cromossômica, triploidia.

1. Introdução

O lambari (*Astyanax altiparanae*) tem recebido especial atenção por ser um peixe cada vez mais importante para aquicultura no Brasil. Nesta espécie, as fêmeas crescem significativamente mais que os machos e estes, quando atingem a maturação sexual, apresentam espículas nas nadadeiras pélvicas e anal. Devido ao pequeno porte, resistência e fácil reprodução (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEDIA e FORESTI, 2005), o *A. altiparanae* têm sido empregado em diversos estudos básicos e aplicados.

Recentemente, um protocolo de fertilização artificial foi desenvolvido para esta espécie (YASUI et al., 2014), o que possibilitou estudos de manipulação cromossômica, como a produção de peixes triploides. No *A. altiparanae*, fêmeas 3n apresentam gônadas reduzidas e maior crescimento (ver capítulo I). No entanto, nos machos, tais características são similares aos 2n (ver capítulo I). Atualmente, a indução à triploidia é um dos métodos mais eficientes para geração de peixes estéreis, sendo empregado em diversas espécies (PIFERRER et al., 2009). Nestes estudos, a fêmea geralmente é estéril e o macho não (PIFERRER et al., 2009). No entanto, mesmo o sêmen dos machos

triplóides apresentando anormalidades que inviabilizam a fertilização (PERUZZI et al., 2009), alguns são capazes de fertilizar e gerar proles viáveis (LINHART et al., 2006).

Neste estudo, pretende-se avaliar histologicamente as gônadas de fêmeas e machos diploides e triploides e as espículas das nadadeiras pélvicas e anal (características sexuais secundárias em machos). Adicionalmente, alguns parâmetros seminais (motilidade, concentração e viabilidade), ultraestrutura dos espermatozoides e ploidia do sêmen serão avaliados. Estes resultados fornecerão subsídios para confirmar a possível esterilidade e a existência de vantagens na produção de peixes triploides.

2. Material e Métodos

2.1. Animais, reprodução e indução à triploidia

Foram utilizados três casais adultos de *Astyanax altiparanae* (separadamente), provenientes do plantel existente no Centro de Conservação da Biodiversidade (ICMbio/CEPTA), Pirassununga, São Paulo, Brasil. Os procedimentos de fertilização artificial foram realizados de acordo com Yasui et al. (2014). As fêmeas foram selecionadas por apresentarem ventre abaulado e papila genital avermelhada. Já os machos por apresentarem espículas na nadadeira anal. Os peixes foram submetidos a indução hormonal empregando dose única de hipófise de carpa, com dosagem de 3 mg/kg^{-1} para fêmeas e machos.

Após dez horas da aplicação hormonal, os peixes foram selecionados e transferidos para um recipiente com anestésico mentol (~100 mg L^{-1}, Êxodo Científica, Brasil). O sêmen foi coletado com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL (Eppendorf, Alemanha), e transferido diretamente para 400 µL de uma solução de Ringer (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM $CaCl_2$, 2,1 mM $MgCl_2$) para imobilização dos espermatozoides (YASUI et al., 2014). A fêmea foi extrusada em placa de Petri

revestida por filme plástico de PVC. Posteriormente, o sêmen diluído em Ringer foi acrescido à massa de ovos e os gametas ativados pela adição de água.

Após a fertilização, cada desova foi separada em dois tratamentos, um que recebeu choque de temperatura para indução à triploidia (40°C, 2 minutos) 2 minutos após a fertilização (ADAMOV, 2013) e outro que permaneceu intacto (grupo controle). Os ovos de cada tratamento foram separados em aquários de 40 litros, onde permaneceram da eclosão até 30 dias de vida. Neste momento, 120 peixes de cada tratamento e repetição foram alocados em seis aquários de 75 litros (3 diploides e 3 triploides), com recirculação de água e temperatura controlada à 28°C. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (até a saciedade aparente) com ração comercial contendo 45% de proteína bruta.

2.2. Coletas e análises

Foram realizadas cinco amostragens para coleta das nadadeiras pélvica e anal, a primeira com 52 dias de vida e as demais a cada 30 dias (até os peixes completarem 175 dias). Em cada intervalo, todos os peixes foram pesados e medidos (comprimento padrão), sendo que 10 peixes de cada ploidia foram aleatoriamente selecionados e eutanasiados para coleta e fixação das nadadeiras pélvica e anal (formol 5%). Com 175 dias, 10 peixes de cada ploidia foram eutanasiados e as gônadas retiradas e fixadas em Bouin para posterior análise histológica. Com 186 dias, o sêmen de machos diploides e triploides foram coletados (como descrito no item 2.1), sendo avaliada a concentração espermática, motilidade, viabilidade e ploidia.

2.3. Diafanização

Os peixes diploides e triploides foram diafanizados baseados em um protocolo adaptado de Potthoff (1984). Os peixes foram fixados em solução de formol a 5%. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada (24 horas), sendo então desidratados em duas baterias crescentes de álcool (50% e 95%; 24 horas cada). Os peixes foram imersos em solução de Azul de Alcian (30% de azul de alcian diluído em 60% álcool absoluto e 40% ácido acético; 24 horas), para coloração da cartilagem. Os animais foram transferidos para solução saturada de Borato (5hs), solução de branqueamento (2hs, 3% H_2O_2 em KOH 2%) e solução de clareamento (7hs, 35% de borato saturado e 65% de H_2O_2 destilada). Logo após, os exemplares foram imersos em solução para coloração dos ossos (Alizarina 2% em solução de KOH 2%) por 24 horas, sendo então transferidos para solução de preservação I (24 hs, Glicerina 30% + KOH 2%), solução de preservação II (24hs, Glicerina 60% + KOH 2%) e finalmente a solução de manutenção (Glicerina + Timol).

2.4. Histologia

Para descrição dos estágios de desenvolvimento gonadal, as amostras fixadas (n=10) em solução de Bouin por 24 horas e lavadas em álcool 70% foram encaminhadas para processamento histológico no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Brasil (UNESP). As gônadas foram estocadas em álcool 70%, e subsequentemente, desidratadas em etanol, diafanizadas em Xilol e incluídas em blocos de parafina. Foram realizados cortes de 5µm, que foram corados com hematoxilina-eosina e observados sob fotomicroscópio (Axioplan 2, ZEISS, United States), acoplado a câmera CCD (MC 80 DX, ZEISS, United States).

2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

O processamento foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade Medicina em Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. As amostras de sêmen de machos diploides (n=2) e triploides (n=1) foram fixadas em solução de Karnovsky modificado por 3 horas e lavadas em tampão fosfato de sódio (pH de 7,4). Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, ressuspensas em ágar 2% (formando um bloco), sendo então desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95%) por 10 minutos e acetona 100% por 20 minutos. Para pré-infiltração, as amostras foram imersas em resina araldite e acetona 100% (1:1) permanecendo "overnight". Na infiltração foi utilizada resina pura por 2 horas (40°C), e a inclusão e polimerização em resina por 72 horas (60°C). Foram realizados cortes semifinos (0,5 μm) em ultramicrótomo com lâmina de vidro, sendo então corados com Azul de Toluidina (1%). Posteriormente, cortes foram selecionados para realização dos cortes ultrafinos com navalha de diamante a 70nm de espessura, sendo logo após contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e eletronmicrografados em microscópio eletrônico de transmissão (marca JEOL, modelo JEM-100 CX II, Tokyo, Japão).

2.6. Avaliação do conteúdo de DNA da nadadeira e sêmen por citometria de fluxo

Foi realizada citometria de fluxo de uma pequena porção da nadadeira de cada peixe (para determinar a ploidia) e dos espermatozoides coletados na solução imobilizadora (Fig. 1). A amostra foi inserida em solução de remoção de membrana (9,53 mM MgSO4.7H_2O, 47,67mM KCl, 15 mM Tris, 74 mM Sucrose, 0,8% Triton X-100) por 10 minutos. Posteriormente, para coloração dos núcleos, foi adicionado 800 μL

de solução de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride - DAPI (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline). As amostras foram filtradas em telas de nylon de 30 μm e analisadas em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer,Partec, GMBh, Alemanha). Foi avaliado o coeficiente de variação de cada pico e a confirmação da ploidia determinada através da comparação com controles diploides conhecidos.

2.7. Avaliação da concentração espermática e motilidade

Para estimativa da concentração espermática, o sêmen de cada peixe foi diluído em solução fixadora (5% $NaHCO_3$, 1% formalina). Posteriormente, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer após sedimentação por aproximadamente 5 minutos. Para análise de motilidade, uma alíquota de 1 μL de sêmen foi alocado em câmera de Makler previamente revestida com albumina bovina séria (BSA 1%), para evitar que os espermatozóides ficassem aderidos na câmera. Logo após, para ativação dos espermatozóides, 19 μL de água destilada foi adicionada. A motilidade foi registrada e armazenada em vídeo utilizando o software Nis-ArElements para posterior análise subjetiva (% de motilidade total, % de motilidade progressiva e % de imóveis). Foram avaliados 12 machos diploides e 22 triploides.

2.8. Porcentagem de espermatozoides vivos e mortos

A análise de viabilidade espermática foi conduzida na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), Pirassununga. O sêmen dos machos diploides (n=10) e triploides (n=10) foi avaliado quanto a porcentagem de células vivas e mortas. Foi empregado o kit de viabilidade espermática (Sperm Viability Kit, Molecular Probes, USA) e microscópio de fluorescência (Axioplan 2, ZEISS, United States), acoplado a câmera CCD (MC 80 DX, ZEISS, United States).

3. Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± erro padrão. Após serem previamente testados quanto à normalidade (Lilliefors 5%), os resultados obtidos foram comparados pelo teste t pareado (5%). A análise foi realizada no software STATISTICA (Versão 10.0, Statsoft, Tulsa, U.S.A.).

4. Resultados

4.1. Citometria de fluxo

Um histograma mostrando a ploidia de espermatozoides de um peixe 3n e a nadadeira de um peixe 2n e 3n é apresentado na Fig. 1. Foi observado que machos diploides apresentam espermatozoides haploides (n), com 8,72% de coeficiente de variação, quando comparado com o controle diploide (2n). Por outro lado, machos triploides exibiriam espermatozoides aneuploides, com conteúdo médio de DNA de 1,71n e coeficiente de variação maior, de 11,3%. O conteúdo de DNA obtido nas nadadeiras dos peixes triploides foi significativamente maior (2,92n) da obtida nos diploides (2n).

4.2. Diafanização

Na primeira coleta (52 dias) todos os peixes analisados (2n e 3n) não apresentavam espículas nas nadadeiras pélvica e anal (Fig. 2 A-D). No entanto, a partir da segunda coleta (84 dias) até o final do experimento, foi observado que machos diploides e triploides passam a exibir espículas nas nadadeiras pélvicas e anal (Fig.2 E-H).

4.3. Motilidade, viabilidade e concentração espermática

Machos triploides apresentam menor concentração espermática (Tabela 1; $P < 0,05$), motilidade (Fig. 3 A; $P < 0,05$) e tempo de motilidade (Fig. 3 B; $P < 0,05$). No que se refere à viabilidade espermática, não foi observada diferença significativa (Tabela 1; $P > 0,05$).

4.4. Histologia

Foi observado diferenças nas características das gônadas das fêmeas 2n e 3n. Nas gônadas das fêmeas 2n foram identificados poucos ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário e muitos vitelogênicos (Fig. 4 A,B). Por outro lado, as gônadas das fêmeas 3n estavam imaturas, estando repletas de ninhos de oogônias e poucos ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário (Fig. 4 C,D).

Nas gônadas dos machos 2n e 3n foram identificadas células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides). No entanto, os machos 2n exibiram maior quantidade de espermatozoides (Fig. 5 A,B). Já machos 3n apresentam pequena quantidade de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos (Fig. 5 C,D).

4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os espermatozoides dos peixes 2n e 3n apresentaram morfologia similar, sendo constituídos de três componentes: cabeça, peça intermediária e flagelo (Fig. 6 A,D). A cabeça era circular e recoberta por uma membrana celular de contorno irregular, além de ausência de acrossomo (Fig. 6 A,D). O núcleo acompanhou a forma da cabeça e era formando por material eletrondenso (Fig. 6 C,F). Além disso, o mesmo ocupava basicamente toda a cabeça, não sendo observado nenhum tipo de organela na região.

A peça intermediária apresentou posição simétrica em relação ao flagelo, sendo constituída de mitocôndrias de formato alongado (Fig. 6 C,F). Foi observado o canal citoplasmático, que é um espaço entre a peça intermediária e o flagelo (Fig. 6 C,F). O flagelo apresentou eixo perpendicular à base do núcleo, com a constituição microtubular típica (9 +2)(Fig. 6 B,E). Peixes 2n apresentaram média de 5,86 ± 0,34 mitocôndrias, enquanto que nos peixes 3n este valor foi de 6,5 ± 0,81, não diferindo significativamente entre ambas ploidias ($P > 0,05$).

5. Discussão

Foi observado que fêmeas (2n e 3n) não apresentam significativo desenvolvimento de espículas anais e pélvicas. Por outro lado, nos machos houve desenvolvimento, sendo semelhante entre 2n e 3n. A presença de espículas, principalmente na nadadeira anal, é muito utilizada como forma de diferenciar machos e fêmeas de *A. altiparanae*, estando presente majoritariamente nos machos (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEDIA e FORESTI, 2005). Aqui, foi observado que machos triplóides podem ser distinguidos das fêmeas pelo mesmo método.

A presença de espículas está diretamente ligada ao período reprodutivo e foram observadas em *Astyanax bimaculatus* (GARUTTI, 1990), *Gnathonemus pertesi* (PEZZANITE e MOLLER, 1998), *Aphyocharax anisitsi* (GONÇALVES et al., 2005) e *Bryconamericus iheringii* (LAMPERT; AZEVEDO e FIALHO, 2004). Dependendo da espécie, as espículas podem se desenvolver apenas na época de reprodução, diminuindo ou até desaparecendo nas demais épocas (GARUTTI, 1990). No entanto, em outras espécies, as espículas aparecem e permanecem sem alteração (LAMPERT; AZEVEDO e FIALHO, 2004; GONÇALVES et al., 2005) e os peixes que não apresentam as mesmas são provavelmente jovens que não atingiram a maturação sexual.

A função das espículas ainda não é muito conhecida. Azevedo et al. (2000) afirmam que estas estruturas estão ligadas ao comportamento de corte. Assim, como os machos 3n apresentam desenvolvimento gonadal semelhante aos 2n (Capítulo I) e as espículas aparecem a partir da maturação sexual, acredita-se que tais estruturas podem atuar no comportamento reprodutivo de machos 2n e 3n, como forma de estimular a fêmea à desova.

A morfologia gonadal semelhante entre machos 2n e 3n também foi descrito por outros autores (LINHART et al., 2006). Geralmente, fêmeas triploides apresentam esterilidade e os machos não (PIFERRER et al., 2009). Neste estudo, a análise histológica mostra que fêmeas 3n, com idade para reprodução, apresentam gônadas em estágio imaturo. Este fenômeno é comumente encontrado na literatura (PIFERRER et al., 2009) e como exemplo vale citar a truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011). No entanto, a razão para esta resposta diferenciada ainda é pouco conhecida (HULAK et al., 2010). De acordo com Hulak et al., (2010), nos machos, a mitose de espermatogônias e formação de cistos de divisão de células esteriodogênicas são eventos pre-meioticos, o que explicaria o desenvolvimento gonadal mais comum em machos triplóides. Krisfalusi e Coud (2011) corroboram este dado, afirmando que em fêmeas a triploidia afeta o pareamento dos cromossomos na fase inicial da meiose e nos machos este evento ocorre no final, o que explica o desenvolvimento gonadal similar em machos 2n e 3n.

Por outro lado, apesar do desenvolvimento de testículos, machos 3n de *A. altiparanae* apresentam sêmen com motilidade e concentração espermática reduzidas, assim como observado por Linhart et al. (2006) e Fujimoto et al. (2008). Este resultado é corroborado pela análise histológica, na qual machos 3n apresentaram menor quantidade de espermatozoides. Tais características, provavelmente, é resultado da

desorganização dos cromossomos nas células germinativas, o que prejudica a meiose e consequentemente a formação de gametas, os quais, neste estudo, são aneuploides e apresentaram ploidia média de 1,71n.

A produção de espermatozoides aneuploides foi relatado em triploides de diversas outras espécies, como em tench *Tinca tinca* (LINHART et al., 2006) e *Gadus morhua* (PERUZZI et al., 2009*)*. Nestes estudos, quando ocorre o cruzamento de um macho triploide com uma fêmea diploide, é observada uma forte redução na taxa de sobrevivência. De acordo com Cotter et al. (2000) a produção de espermatozoides aneuploides levaria a formação de larvas também aneuploides, o que inviabilizaria o desenvolvimento e aumentaria consideravelmente a mortalidade. Os autores verificaram que larvas provenientes de cruzamentos de machos triploides com fêmeas diploides resultaram em sobrevivência da progênie de apenas 1,6%, enquanto que no cruzamento entre peixes diploides este valor foi de 92,7%.

É importante destacar que muitas vezes machos triploides são férteis e seu sêmen pode apresentar características semelhantes ou até superiores aos diploides, como observado por Linhart et al. (2006). No *A. altiparanae*, a ultraestrutura dos espermatozoides foi semelhante em 2n e 3n e similar ao relatado para peixes teleósteos de fertilização externa, como ausência de acrossomo, núcleo circular e a subdivisão típica entre cabeça, peça intermediária e flagelo (PSENICKA et al., 2006; ALAVI et al., 2013).

Além disso, devido ao maior conteúdo de DNA em triploides/poliploides, é geralmente relatado um aumento no tamanho da cabeça dos espermatozóides, o que pode prejudicar a motilidade espermática. No entanto, tal característica pode ser compensada por um aumento no número de mitocôndrias (ALAVI et al., 2013; ZHAO

et al., 2014). Neste estudo, a quantidade de mitocôndrias não diferiu entre as ploidias, e a menor motilidade em peixes 3n pode ser devido a presença de más formações. Em triploides de *Misgurnus anguillicaudatus* (ZHAO et al., 2014), mesmo apresentando maior quantidade de ATP, a presença de más formações conferiu a estes espermatozoides uma menor motilidade. Adicionalmente, Linhart et al. (2006) afirmam que a motilidade pode ser mais influenciada pela quantidade de ATP do que o número de mitocôndrias. De acordo com estes autores, quando a motilidade é ativada o consumo de energia é muito rápido e as mitocôndrias não conseguem suprir a demanda rapidamente. Assim, a quantidade de ATP acumulada no flagelo no momento da ativação deve ser considerada. Não obstante, geralmente é observada uma correlação direta entre a quantidade de mitocôndrias, ATP e motilidade (ALAVI et al., 2013).

Portanto, os resultados deste estudo mostram que fêmeas 3n são mais interessantes para produção, pois além de apresentarem maior desempenho (ver capítulo I), exibem gônadas em estágio imaturo. Deste modo, fêmeas 3n de *A. altiparanae* podem ser consideradas estéreis, pois são incapazes de gerar ovos viáveis, o que diminui consideravelmente as chances de impacto caso haja escape destes peixes ao ambiente. Adicionalmente, a triploidização não garante a esterilidade nos machos, os quais podem produzir espermatozoides com motilidade. Assim, futuros estudos são interessantes no intuito de verificar a capacidade de fertilização do sêmen de peixes 3n e analisar citogeneticamente as células germinativas, o que aumentaria a compreensão sobre a biologia e fertilidade destes peixes.

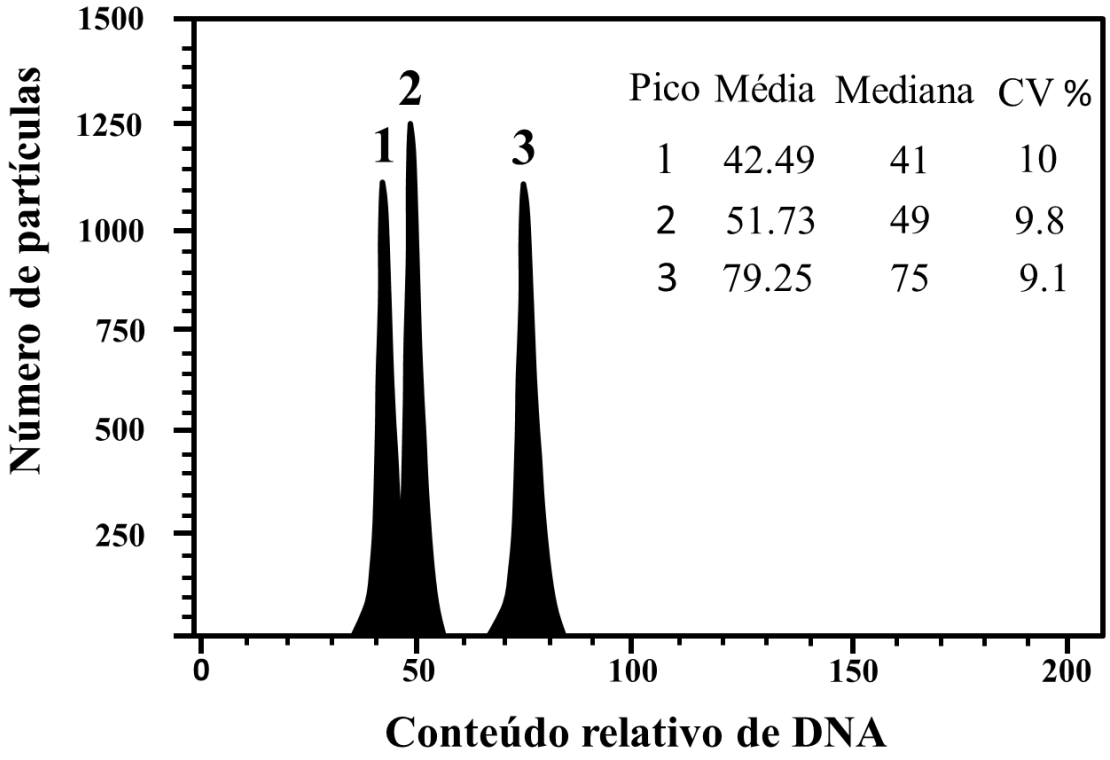

Figura 1. Histograma de citometria de fluxo de espermatozoides de um peixe triploide (1) e nadadeira de um peixe diploide (2) e triploide (3) de lambari (*Astyanax altiparanae*).

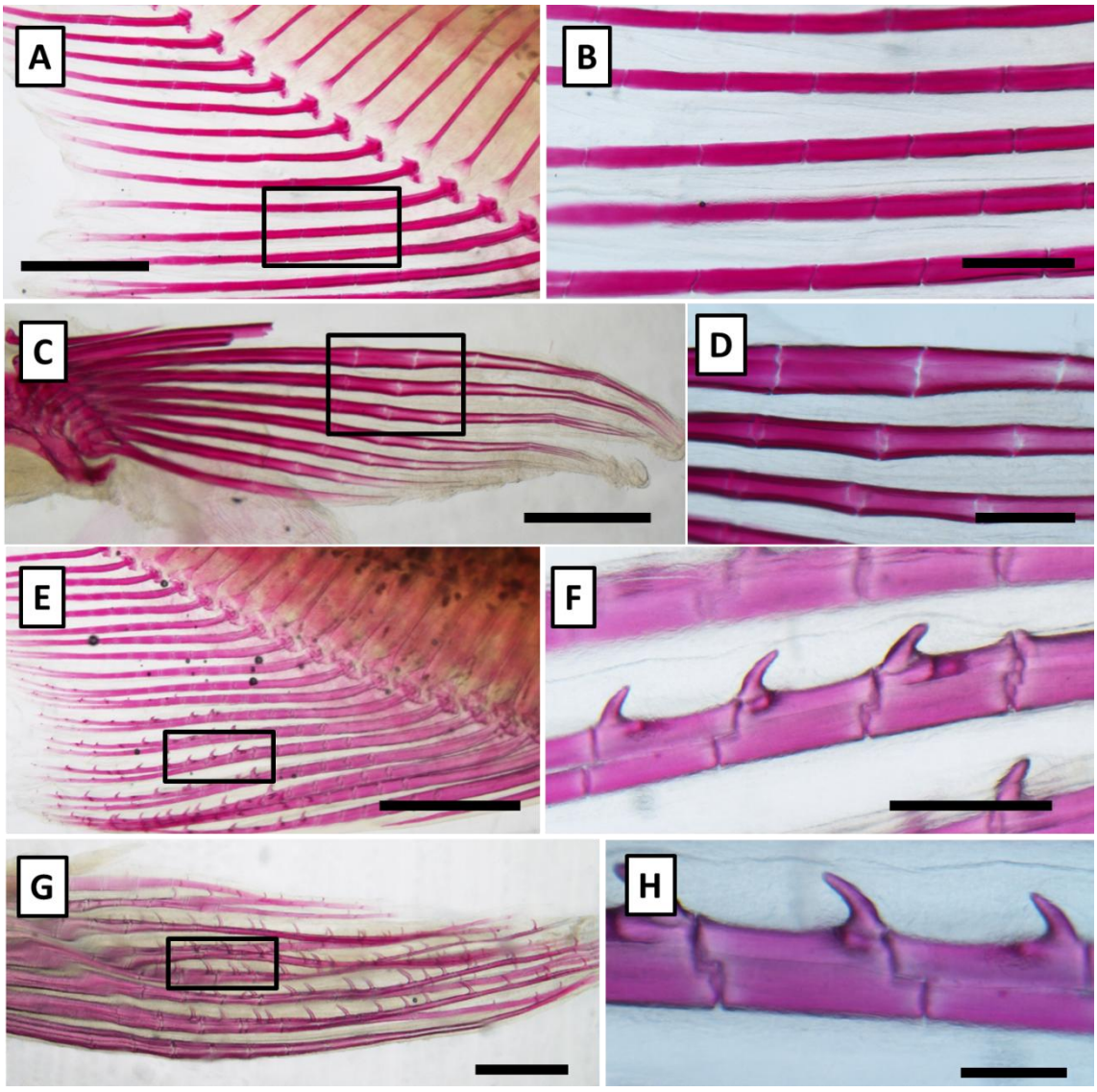

Figura 2. Diafanização das nadadeiras de machos de *Astyanax altiparanae*. Raios das nadadeiras anal (A,B) e pélvica (C,D) diploides com 52 dias e raios das nadadeiras anal (E,F) e pélvica (G,H) de diploides com 84 dias. Barra de calibração A, C, E e G: 1000 µm. B, D, F, 200 µm. H: 100 µm.

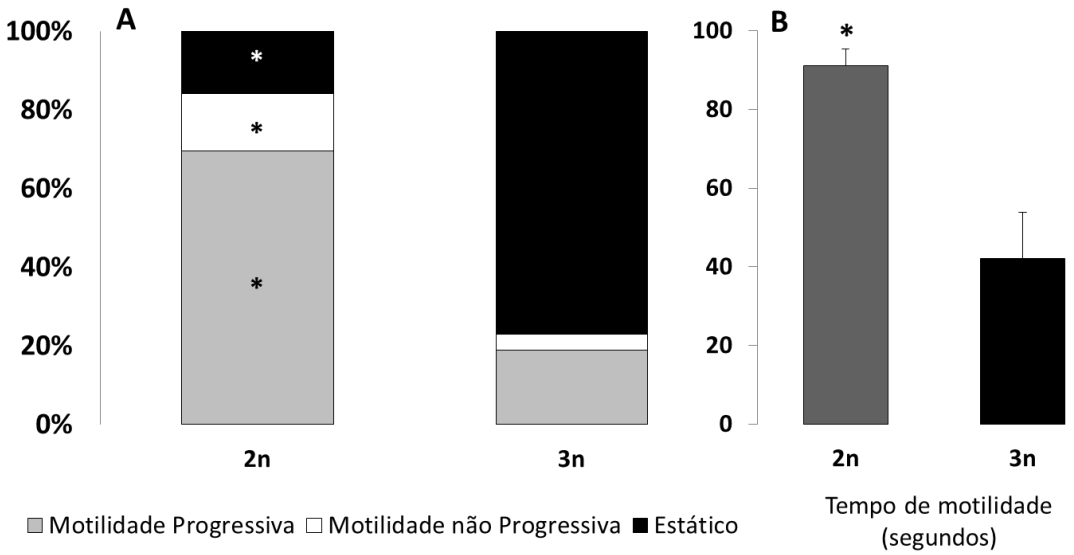

Figura 3. Parâmetros espermáticos de *Astyanax altiparanae*. A, Motilidade progressiva, não progressiva e espermatozoides estáticos de machos 2n e 3n. B, tempo de motilidade de machos 2n e 3n (Médias ± erro padrão). Asteriscos indicam significância estatística entre 2n e 3n (teste t, $P < 0,05$).

Tabela 1. Concentração (sptz/ml) e viabilidade espermática (% de células vivas) de machos 2n e 3n de *Astyanax altiparanae* (Médias ± erro padrão) .

Parâmetro	Diplóide	Triplóide
Concentração (sptz/ml)	$6{,}75x10^{8} \pm 1{,}22 \times 10^{8}$ a	$7{,}43x10^{7} \pm 2{,}77x10^{7}$ b
Viabilidade espermática (%)	93,03 ± 1,67	85,55 ± 7,08

Letras diferentes na mesma linha indica significância estatística entre 2n e 3n teste t, $P < 0{,}05$).

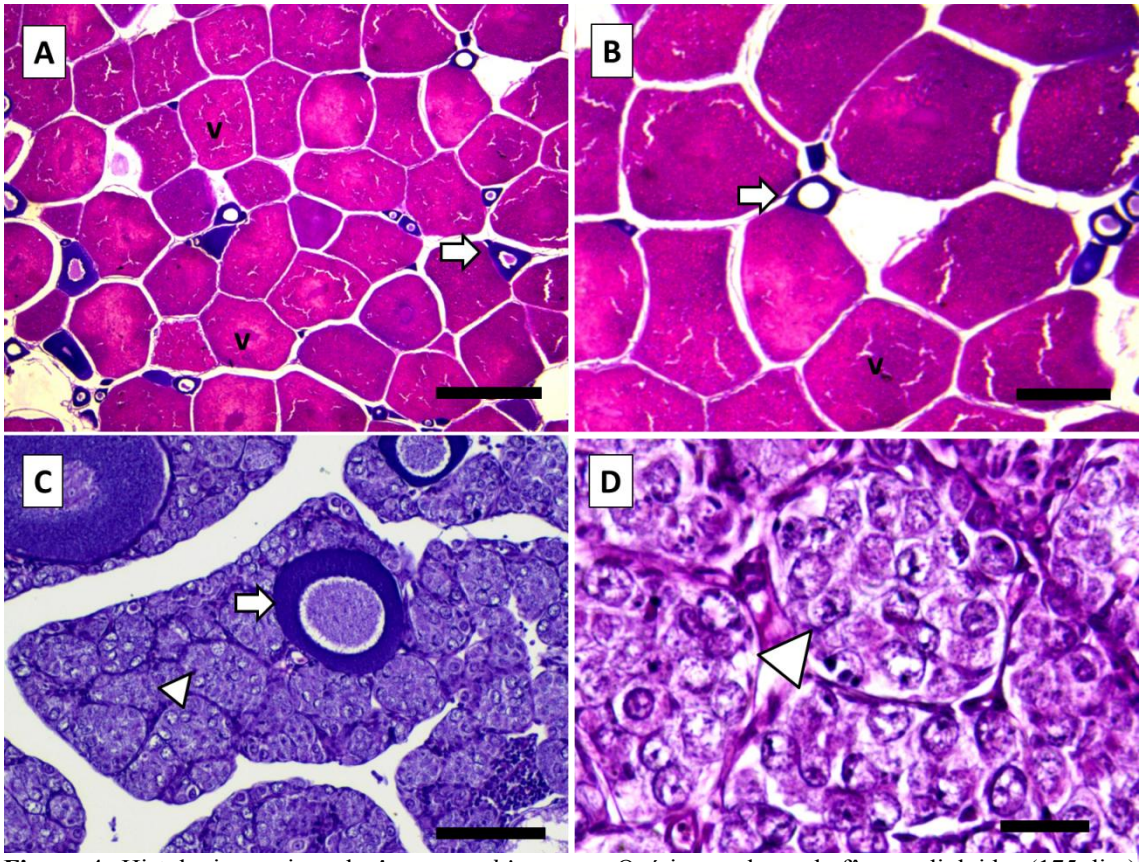

Figura 4. Histologia ovariana de *Astyanax altiparanae*. Ovários maduros de fêmeas diploides (175 dias) (A, B). Ovários imaturos de fêmeas triplóides (175 dias) (C, D). Seta: ovócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário; Cabeça de seta: ninhos de oogônias; v: ovócitos vitelogênicos. Escala, A: 100 µm; B: 25 µm; C: 500 µm, D: 250 µm.

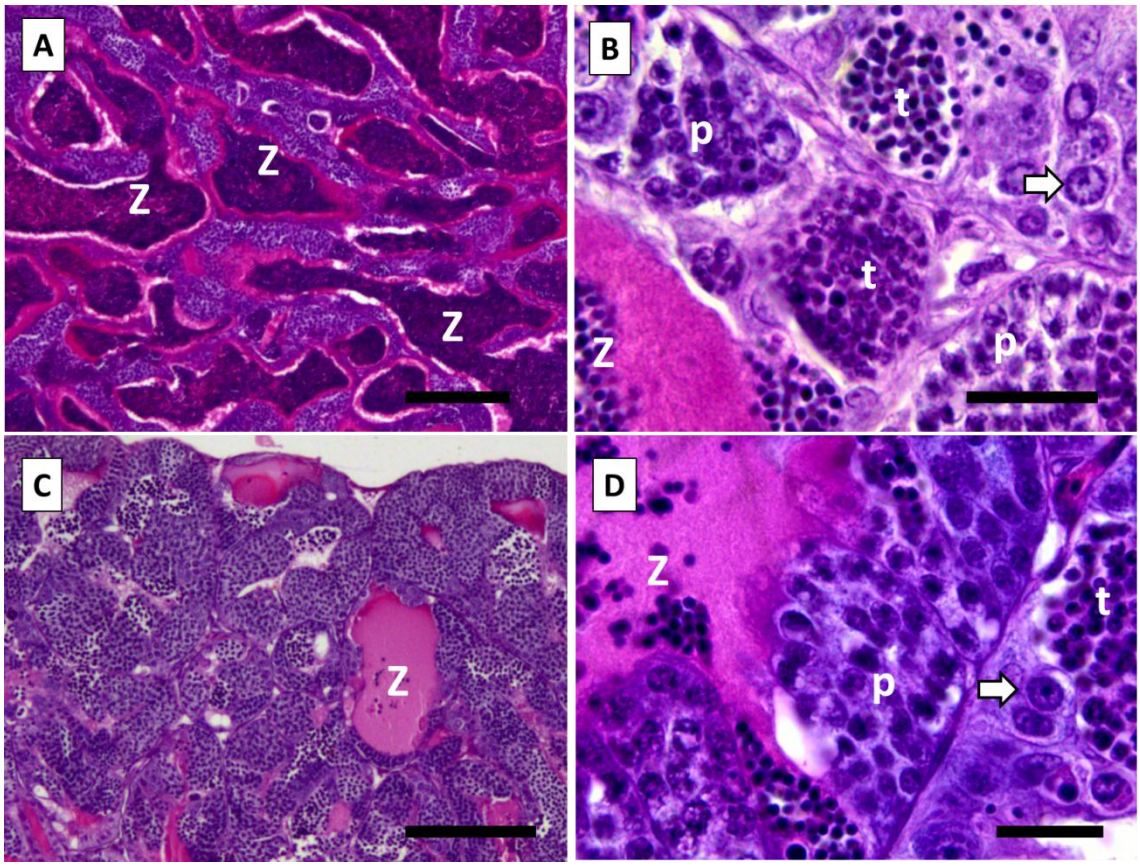

Figura 5. Histologia testicular de *Astyanax altiparanae*.Testículos de machos diploides (175 dias) (A, B). Testículos de machos triploides (175 dias) (C, D). Seta: espermatogônias, p: espermatócitos, t:espermátides e z: espermatozoides. A: 100 µm; B: 20 µm; C: 200 µm, D: 20 µm.

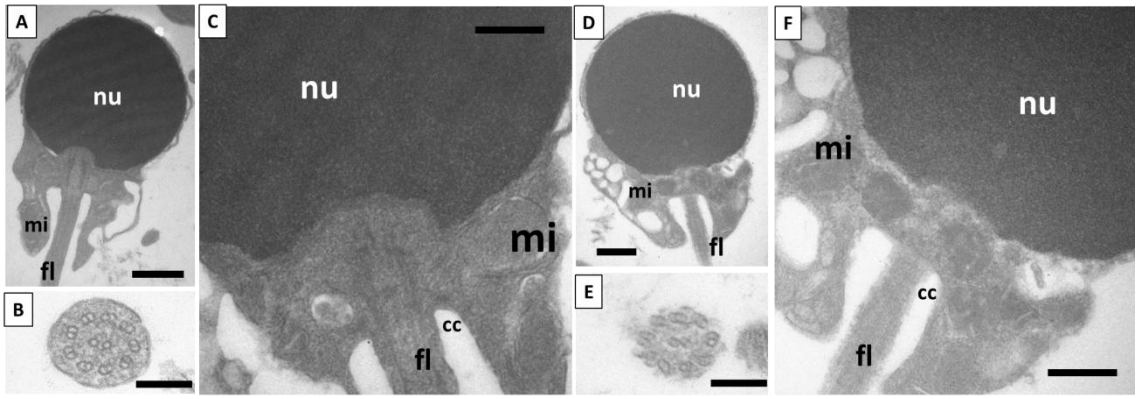

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide de peixes diploides (A-C) e triploides (D-F) de *Astyanax altiparanae*. (A, D) Evidenciação da morfologia externa (B, E) Flagelo em corte transversal mostrando axonema com padrão morfológico de nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. (C, F) Detalhe do núcleo e peça intermediária evidenciando as mitocôndrias. Abreviaturas: nu = núcleo; mi = mitocôndria; fl = flagelo; cc = canal citoplasmático. Escala das barras: (A,D): 1 µm; (B,E): 250nm; (C,F): 0,5 µm.

6. Agradecimentos

O Autor é grato ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida, ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), FAPESP (JP FAPESP 2010/17429-1), ao CEPTA/ICMBio pelo fornecimento dos animais, à FCAV/UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias), à FZEA/USP (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos) pelo suporte na análise de viabilidade espermática, à FMRP/USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) pelo auxílio na Microscopia Eletrônica de Transmissão.

7. Referências

ADAMOV, N. **Triploidização no lambari (*Astyanax altiparanae*)**. 2013. (Trabalho de conclusão de Curso). PUC, Campinas.

ALAVI, S. M.; DROZD, B.; HATEF, A.; FLAJSHANS, M. Sperm morphology, motility, and velocity in naturally occurring polyploid European weatherfish (*Misgurnus fossilis* L.). **Theriogenology,** v. 80, n. 2, p. 153-60, Jul 15 2013.

AZEVEDO, M. A.; MALABARBA, L. R. e FIALHO, C. B. Reproductive biology of the inseminating glandulocaudine *Diapoma speculiferum* Cope (Teleostei: Characidae). **Copeia,** v. 2000, p. 983-989, 2000.

COTTER, D.; O'DONOVAN, V.; O'MAOILEIDIGH, N.; ROGAN, G.; ROCHE, N.; WILKINS, N. P. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. **Aquaculture,** v. 186, n. 1-2, p. 61-75, Jun 1 2000. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086694500005 >.

FEINDEL, N. J.; BENFEY, T. J. e TRIPPEL., E. A. Gonadal development of triploid Atlantic Cod *Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology,** v. 79, p. 1900 - 1912, 2011.

FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S.; YOSHIKAWA, H.; YAMAHA, E.; ARAI, K. 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, Aug 2008. ISSN 0175-8659. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258458400013 >.

GARUTTI, V. Caráter sexual secundário em *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), relacionado às nadadeiras anal e pélvicas. **Naturalia,** v. 15, p. 109-119, 1990.

GONÇALVES, T. K.; AZEVEDO, M. A.; MALABARBA, L. R.; FIALHO, C. B. Reproductive biology and development of sexually dimorphic structures in *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). **Neotropical Ichthyology,** v. 3, p. 433-438, 2005. ISSN 1679-6225. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252005000300012&nrm=iso >.

HULAK, M.; KASPAR, V.; PSENICKA, M.; GELA, D.; LI, P.; LINHART, O. Does triploidization produce functional sterility of triploid males of tench *Tinca tinca* (L.)? **Reviews in Fish Biology and Fisheries,** v. 20, n. 3, p. 307-315, Sep 2010. ISSN 0960-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281111600005 >.

LAMPERT, V. R.; AZEVEDO, M. A. e FIALHO, C. B. Reproductive biology of *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) from rio Vacacaí, RS, Brazil. **Neotropical Ichthyology,** v. 2, p. 209-215, 2004. ISSN 1679-6225. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252004000400003&nrm=iso >.

LINHART, O.; RODINA, M.; FLAJSHANS, M.; MAVRODIEV, N.; NEBESAROVA, J.; GELA, D.; KOCOUR, M. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca*

(L.). **Aquaculture International,** v. 14, n. 1-2, p. 9-25, Feb 2006. ISSN 0967-6120. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234692500003 >.

PERUZZI, S.; RUDOLFSEN, G.; PRIMICERIO, R.; FRANTZEN, M.; KAURIC, G. Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture Research,** v. 40, n. 10, p. 1160-1169, Jul 7 2009. ISSN 1355-557X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267657000006 >.

PEZZANITE, B. e MOLLER, P. A sexually dimorphic basal anal-fin ray expansion in the weakly discharging electric fish *Gnathonemus petersii*. **Journal of Fish Biology,** v. 53, n. 3, p. 638-644, 1998. ISSN 1095-8649. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01007.x >.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIERE, J.-C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture,** v. 293, n. 3-4, p. 125-156, Aug 16 2009. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268150000001 >.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEDIA, R. B. e FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSERTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.105-120.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: MOSER, H. G. (Ed.). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. Lawrence, KS, USA: Allen Press, 1984. p.35-37.

PSENICKA, M.; RODINA, M.; NEBESAROVA, J.; LINHART, O. Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. **Theriogenology,** v. 66, n. 5, p. 1355-63, Sep 15 2006.

YASUI, G. S.; SANTOS, M. P.; NAKAGHI, L. S. O.; SENHORINI, J. A.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, p. 1-10, 2014.

ZHAO, Y.; SAITO, T.; PŠENIČKA, M.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Comparison of spermatozoa parameters, fine structures, and energy-related factors among tetraploid, hyper-tetraploid, and hyper-triploid loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology,** v. 321, n. 4, p. 198-206, 2014. ISSN 1932-5231. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/jez.1851 >.

8. Conclusões

As principais conclusões com os resultados deste estudo foram:

a) Fêmeas 3n apresentam esterilidade e maior crescimento.
b) A triploidização não garante esterilidade nos machos, no entanto, estes apresentam baixa motilidade, concentração espermática e espermatozoides aneuplóides.

9. Considerações Finais

Mesmo a aquicultura no Brasil apresentando uma continuada expansão, muitas biotecnologias ainda são escassas. Estes avanços, como a produção de peixes triplóides, são necessários e imprescindíveis para o pleno sucesso da atividade.

Neste aspecto, este trabalho trouxe importantes contribuições à academia, principalmente por ser o primeiro a avaliar o crescimento de peixes triplóides em uma espécie nativa. Além disso, os interessantes resultados mostram os futuros passos a seguir, ou seja, a obtenção de proles 100% fêmeas triplóides.