

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/03/2017.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP)
São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE PEIXES ESTÉREIS UTILIZANDO A
HIBRIDAÇÃO E A MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA**

Lucas Henrique Piva
Médico Veterinário

Botucatu
2016

PRODUÇÃO DE PEIXES ESTÉREIS UTILIZANDO A HIBRIDAÇÃO E
A MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA

LUCAS HENRIQUE PIVA

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini

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

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Piva, Lucas Henrique.

Produção de peixes estéreis utilizando a hibridação e a manipulação cromossômica / Lucas Henrique Piva. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: George Shigueki Yasui

Coorientador: José Augusto Senhorini

Capes: 20400004

1. Astyanax (Peixe). 2. Infecundidade. 3. Hibridação. 4. Cromossomos. 5. Produção animal. 6. Genética.

Palavras-chave: Astyanax; Banco genético; Esterelidade; Hibridação; Triplóide.

“ A quem fiz mal peço perdão. A quem eu ajudei, queria ter feito mais.

A quem me ajudou eu agradeço de coração. ”

— Alessandro Gallagher

*A Maria Celina Piva, por tudo o que representa na minha vida, por toda
sua força, amor e dedicação ao próximo.*

Dedico.

Agradecimentos

À minha família por todo apoio, carinho e incentivo fornecidos ao longo da minha vida, agradeço de todo o coração.

À minha admirada mãe, Inês Elisabete Meneghin Piva, por todo apoio, incentivo e amor desprendido a minha pessoa, um grande exemplo de persistência e luta. Sempre dedicada e companheira nos momentos mais difíceis de minha vida.

Ao meu pai, Luis Antonio Piva, por toda sua amizade, incentivo, exemplo, confiança e apoio. Meu melhor amigo e a quem procuro sempre seguir e me espelhar, além de ser responsável pelo amor que sinto por peixes.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP, pela oportunidade de ingresso no mestrado.

Ao Programa de Zoologia a toda coordenação e funcionários pelo apoio, instruções e paciência.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental pela utilização da sua estrutura, fornecimento de peixes, alojamento, materiais e licença para as coletas. E à todos seus pesquisadores e funcionários pela dedicação, ensinamentos, suporte e amizade, muito obrigado.

Ao meu orientador, George Shigueki Yasui, por sua imensa contribuição intelectual e técnica neste trabalho, além de sua amizade e confiança.

Ao meu coorientador, José Augusto Senhorini, grande amigo, pesquisador, professor e pescador a quem tenho profunda admiração e quero me espelhar sempre na sua leveza e serenidade como líder e pessoa.

À Mariana Machado Evangelista por todo apoio e contribuição neste trabalho, desde cuidar dos peixes às análises mais complexas, sempre esteve ao meu lado incentivando, apoiando e direcionando. Além de ser a mulher que eu sempre sonhei em

ter ao meu lado, por todo seu carinho, respeito e compreensão, não possuo palavras para te agradecer

Ao irmão que a pós graduação me presenteou, Nivaldo Ferreira do Nascimento minha eterna gratidão por toda sua contribuição intelectual nesta dissertação, mas principalmente por sua amizade e pelo grande ser humano que demonstrou ser nesses anos de convivência.

À toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia de Peixes do CEPTA, Rafaela Bertolini, Matheus Pereira-Santos, Regiane da Silva, Natália Matheus, Paulo Santos, Leticia Dragone, Dilberto Ribeiro, Alan Marin, Nycolas Pereira, Leonardo Calado, Paulo Monzani por todo auxílio, companheirismo e amizade. Vocês são demais!

À Diógenes Siqueira-Silva pelas confecção e interpretação das lâminas histológicas.

À Aline Cristiane Piva e Carlos Ron, mesmo distantes, fundamentais pelo incentivo e amizade.

À FAPESP 2010/17429-1 e AES TIETÊ/ANEEL 4600000174 pelo fornecimento de equipamentos e material utilizado nesse estudo.

À CAPES pelo auxílio financeiro de bolsa de mestrado.

À todos os meus amigos e professores com quem tive oportunidade de conviver, crescer e aprender durante toda minha vida.

Sumário	
Lista de Figuras	5
Lista de Tabelas	6
Resumo	7
Abstract	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Origem dos peixes parentais	15
3.2. Obtenção de gametas, fertilização e triploidização	16
3.3. Desenvolvimento embrionário e confirmação de ploidia	18
3.4. Larvicultura e manutenção das progênes até a fase adulta	19
3.5. Biometria final	20
3.6. Confirmação da ploidia	20
3.7. Caracterização da linhagem germinativa	20
3.8. Observação de espículas sexuais	21
3.9. Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Avaliação do desenvolvimento embrionário e confirmação de ploidia	23
4.2. Larvicultura e desenvolvimento inicial	25
4.3. Análise histológica	27
4.4. Espículas sexuais	31
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	37

Lista de Figuras

- Fig. 1.** Peixes parentais das espécies utilizadas nos cruzamentos. **A.** Fêmea de *Astyanax altiparanae*. **B.** Macho de *Astyanax altiparanae*. **C.** Macho de *Astyanax fasciatus*. **D.** Macho de *Astyanax schubarti*. **E.** Macho de *Hyphessobrycon anisitsi*. **F.** Macho de *Oligosarcus pinto*. Barra 1 cm. 16
- Fig. 2.** Procedimentos de hibridação e manipulação cromossômica. **A.** Obtenção de oócitos de *Astyanax altiparanae*. **B.** Separação dos oócitos em cinco alíquotas e fertilização com sêmen de *Astyanax altiparanae* (controle), *Astyanax fasciatus*, *Astyanax schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto*. **C.** Separação da alíquota de cada cruzamento em dois grupos, e indução de um dos grupos de cada cruzamento à triploidização, com aplicação de choque térmico dois minutos pós fertilização a 40°C e duração de dois minutos. Esse delineamento experimental foi realizado em triplicatas, utilizando-se diferentes peixes parentais em cada repetição. ... 18
- Fig. 3.** Estágios do desenvolvimento embrionário e larva normal e anormal de *Astyanax altiparanae*. **A.** Duas células. **B.** Blástula. **C.** Gástrula. **D.** Segmentação. **E.** Eclosão: larva normal. **F.** Eclosão: larva anormal (Adaptado de PEREIRA-SANTOS, com autorização do autor). 19
- Fig. 4.** Híbridos resultantes dos cruzamentos realizados entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos **A.** *A. fasciatus*. **B.** *A. schubarti*. **C.** *Hyphessobrycon anisitsi*. **D.** *Oligosarcus pinto*. 25
- Fig. 5.** Caracterização da linhagem germinativa de fêmeas provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de **A.** *A. altiparanae* (prole 2n), **B.** *A. altiparanae* (prole 3n), **C.** *A. fasciatus* (prole 3n), **D.** *A. schubarti* (prole 2n), **E.** *Hyphessobrycon anisitsi* (prole 3n), **F.** *Oligosarcus pinto* (prole 3n). Barra: 200 µm. . 29
- Fig. 6.** Caracterização da linhagem germinativa de machos provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de **A.** *A. altiparanae* (prole 2n), **B.** *A. altiparanae* (prole 3n), **C.** *A. fasciatus* (prole 3n), **D.** *A. schubarti* (prole 2n), **E.** *Hyphessobrycon anisitsi* (prole 3n), **F.** *Oligosarcus pinto* (prole 3n). Barra: 200µm. .. 30
- Fig. 7.** Nadadeiras anais diafanizadas provenientes de **A.** Fêmea de *Astyanax altiparanae* diploide, **B.** Fêmea de *Astyanax altiparanae* diploide com destaque para raio sem espículas, **C.** Macho de *Astyanax altiparanae* diploide, **D.** Macho de *Astyanax altiparanae* diploide com destaque em espículas, **E.** Machos triploide resultantes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. fasciatus*, **F.** Machos triploide resultantes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. fasciatus* com destaque para raio sem espículas. Barra: 750 µm..... 32

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Desenvolvimento de embriões diploides e triploides provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligossarcus pinto*i. Os dados foram obtidos de triplicatas e estão expressos como média $\pm$ erro padrão. 24
- Tabela 2.** Características biométricas e somáticas, e número de peixes provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae* (controle), *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto*i. 26
- Tabela 3.** Gametogênese de indivíduos diploides e triploides provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto*i. 28

PIVA, Lucas Henrique. **Produção de peixes estéreis utilizando a hibridação e a manipulação cromossômica**, 2015. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, SP.

Resumo

O uso de peixes estéreis é uma alternativa viável para evitar a introgressão em ecossistemas naturais. Adicionalmente, esses peixes podem ser utilizados como receptores em transplantes de células germinativas para subsequente conservação de espécies ameaçadas. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para produção massal de peixes estéreis combinando hibridação e manipulação cromossômica. Para tal, oócitos de *Astyanax altiparanae* foram fertilizados com sêmen de *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pintoii*. Metade dos ovos fertilizados receberam choque de temperatura 40°C para indução da triploidização. Os cruzamentos intraespecíficos diploide e triploide serviram como controle. Taxas de fertilização e sobrevivência foram verificadas nos estágios de desenvolvimento embrionário (clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão), assim como a porcentagem de larvas normais e anormais. O status de ploidia das larvas foi confirmado por citometria de fluxo. Nove meses após a fertilização, 16 machos e 16 fêmeas de cada cruzamento foram sacrificados para remoção das gônadas e subsequente análise histológica e verificação de esterilidade. Adicionalmente, amostras de nadadeiras foram coletadas, fixadas e diafanizadas para verificação da presença de caracteres sexuais (espículas). Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) nas taxas de fertilização, sobrevivência nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário e porcentagem de larvas normais entre todos os cruzamentos e ploidias. Fêmeas triploides de *A. altiparanae*, fêmeas híbridas diploides e triploides de *A. fasciatus*, fêmeas híbridas diploides de *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pintoii*, machos triploides de *A. altiparanae* e machos híbridos triploides de *A. fasciatus* foram predominantemente estéreis. Fêmeas de todos os tratamentos não apresentaram espículas na nadadeira caudal, enquanto que tais estruturas foram observadas na nadadeira anal de machos, com exceção de machos triploides híbridos de *A. fasciatus*. Esses resultados demonstraram que a hibridação associada à manipulação cromossômica é uma ferramenta efetiva para esterilização massal de peixes, com aplicação na produção sustentável e conservação de recursos genéticos.

Palavras-chave: *Astyanax*, quimera, conservação, banco genético, hibridação, esterilidade, triploides.

Abstract

The use of sterile fish is a viable alternative avoid introgression in natural ecosystems. Additionally, sterile fish may be used as host in germ cell technologies for subsequent conservation of endangered species. Therefore, the present work aims to establish an efficient procedure for the mass production of sterile fish combining chromosome set manipulation and hybridization. *Altiparanae astyanax* oocytes were fertilized with sperm from *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* and *Oligosarcus pinto* males, and half of the fertilized eggs was heat shocked at 40°C to induce triploidization. The intra-specific (pure) crossing triploid and diploid served as control. Fertilization and survival rates were observed in the developmental stages (cleavage, blastula, gastrula, somite and hatching), as well as the percentage of normal and abnormal larvae. The ploidy statuses of the larvae were confirmed by flow cytometry. At 9-months post fertilization, 16 males and 16 females from each cross were sacrificed for removal of the gonads and subsequent histological and sterility analysis. Additionally, fins samples were collected, fixed and diaphonized to verify the presence of sexual characteristics (bony hooks). There was no significant difference ($P > 0.05$) on the fertilization rate, survival of different embryonic stages, and percentage of normal larvae among all crossings and ploidies. Triploid females of *A. altiparanae*, diploid and triploid hybrid females of *A. fasciatus*, diploid hybrid females of *Hyphessobrycon anisitsi* and *Oligosarcus pinto*, and triploid males of *A. altiparanae* and hybrid triploid *A. fasciatus*. were predominantly sterile. Females of all treatments showed no bony hooks in the anal fin, while such structures were observed in the anal fin of males, with the exception of hybrid triploid males of *A. fasciatus*. The results demonstrate that the hybridization associated with chromosome set manipulation showed to be an effective tool for mass sterilization of fish, with application in sustainable production and conservation of genetic resources.

Key-words: *Astyanax*, chimera, conservation, genebank, hybridization, sterility, triploids.

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da FAO, nas últimas cinco décadas a produção mundial de pescado vem aumentando a uma taxa média de 3,2% ao ano, alcançando a marca de 167 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2016). Apesar de tal incremento, a captura de pescado não apresentou a mesma tendência, mantendo-se estável e apresentando até mesmo certo decréscimo em alguns anos. Para suprir essa demanda global por alimentos, a partir dos anos 80 a aquicultura vem apresentando aumento médio de 8,6% ao ano, representando em 2014 44,1% da produção global de pescado, o que representa cerca de 74 milhões de toneladas (FAO, 2016).

Dentre os organismos aquáticos cultivados, os peixes têm a produção mais representativa, atingindo 49,8 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2016). No ranking mundial de produção aquícola, o Brasil ocupa a 14ª posição, sendo responsável por cerca de 562 mil toneladas em 2012 (FAO, 2016). Segundo projeções de aumento populacional realizadas pela FAO (2016) estima-se que até 2025, a produção mundial de peixes deve aumentar em, no mínimo, 28 milhões de toneladas, para que seja atendida a demanda da crescente população mundial.

Na tentativa de suprir tal demanda, a aquicultura tem buscado, nos últimos anos, desenvolver tecnologias para otimizar a produção de peixes. Uma delas é cultivo de organismos estéreis, o qual demonstra ser uma importante ferramenta para produção e conservação (DUNHAM, 2004; PIFERRER et al., 2009). Trabalhos relataram melhora no desempenho zootécnico de peixes estéreis quando comparados a indivíduos férteis, com incremento nos valores das taxas de crescimento (SACOBIE et al., 2012; NASCIMENTO, 2014) e rendimento de carcaça (LUTZ, 2003). Além disso, o cultivo de peixes estéreis reduz impactos ambientais uma vez que, em caso de escapes, não há o risco de contaminação genética das populações nativas (PIFERRER et al., 2009).

A produção de peixes estéreis também se mostra uma estratégia interessante do ponto de vista das aplicações biotecnológicas, como o quimerismo. Essa técnica consiste em transplantar células germinativas de um indivíduo de determinada espécie (doador) para um indivíduo de outra espécie (receptor), possibilitando que o receptor produza gametas da espécie doadora (YASUI et al., 2011). Entretanto, para o sucesso do quimerismo, é necessário que o indivíduo receptor seja estéril, caso contrário irá produzir gametas das duas espécies a partir de células endógenas e exógenas. Com esta técnica é possível utilizar peixes de desova intermitente para produzir gametas de espécies de desova anual, reduzindo, então, a sazonalidade. Essa estratégia é aplicável principalmente nas espécies reofílicas de peixes neotropicais cultivadas, as quais se reproduzem apenas nos períodos mais quentes e chuvosos (PANKHURST e PORTER, 2003), o que impossibilita a produção e consequente comercialização de alevinos de qualidade durante o ano todo (BAIRWA et al., 2013).

O primeiro passo para a aplicação do quimerismo é a obtenção de indivíduos estéreis para serem receptores de células germinativas. Um dos principais métodos empregados é a hibridização, que além da esterilização, pode conferir outros benefícios como melhor qualidade da carne, maiores valores de taxas de crescimento, resistência a doenças e adaptação a variações ambientais (BARTLEY; RANA e IMMINK, 2000). Contudo, muitos dos híbridos podem ser férteis (FUJIMOTO et al., 2008; ARIAS-RODRIGUEZ; YASUI e ARAI, 2009), com potencial impacto no ambiente e na ictiofauna nativa.

Na literatura já foram relatados outros métodos para a esterilização de peixes em larga escala, tais como manipulação de temperatura (PANDIT et al., 2015), utilização de fármacos (SIQUEIRA-SILVA et al., 2015), hibridação (BARTLEY et al., 2001) e a manipulação cromossômica por meio da produção de peixes triploides (TABATA;

RIGOLINO e TSUKAMOTO, 1999; FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011). Dentre estes, o método mais efetivo para a produção de peixes estéreis em larga escala é a triploidização, uma vez que peixes triploides diferem dos organismos normais diploides por apresentarem três conjuntos de cromossomos. Ademais por serem geralmente estéreis, apresentam melhor crescimento somático. Entretanto, muitos peixes triploides podem ser férteis (PIFERRER et al., 2009). Deste modo, uma estratégia que poderia ser empregada para contornar este problema e garantir a esterilidade massal das proles é a combinação sinérgica de duas técnicas, como a hibridação e a triploidização, por meio da produção de triploides híbridos.

Nos últimos anos, o lambari-do-rabo amarelo, *Astyanax altiparanae*, vem sendo utilizado como modelo para consolidar as técnicas supra mencionadas, devido as características da espécie tais como adaptação à alimentação artificial, facilidade de manejo e alta prolificidade, fazem com que esta apresente grande potencial para a aquicultura e experimentação (GONÇALVES et al., 2014). Além disso, *A. altiparanae* é uma espécie nativa da América do Sul pertencente à família Characidae, e que apresenta ampla distribuição na bacia do alto rio Paraná (LIMA et al., 2003).

Atualmente, a produção desta espécie no Brasil é destinada ao consumo humano direto, e, principalmente, ao mercado de iscas vivas (PORTO-FORESTI et al., 2010; MORAES FRANÇA FERREIRA et al., 2014). Ademais, o pequeno porte dos indivíduos e a facilidade de adaptação a aquários facilitam a realização de experimentos, contribuindo para que a espécie se consagre como modelo biológico (DRUMMOND et al., 2000; GOMES; COSTA e BORELLA, 2013; DE MORAES FRANÇA FERREIRA et al., 2014; YASUI et al., 2015).

No entanto, antes de consolidar o lambari-do-rabo-amarelo como modelo para estudos de quimerismo e manipulação cromossômica, foram necessárias diversas etapas prévias envolvendo estudos sobre os aspectos biológicos e reprodutivos da espécie.

Primeiramente, foi consolidado um protocolo de coleta de gametas e fertilização *in vitro* (YASUI et al., 2015) padronizando técnicas de indução hormonal, coleta de sêmen e estocagem de gametas a curto prazo, o que permitiu controlar o tempo de fertilização. A partir desse protocolo, PEREIRA-SANTOS (2014) elucidou características básicas como o tempo de fusão de pronúcleos, extrusão do segundo corpúsculo polar e desenvolvimento embrionário. Essas informações foram necessárias para estabelecer um protocolo de triploidização empregando-se choque térmico (ADAMOV, 2013), que apresentou eficácia acima de 95%. Tais triploides foram confirmados através de um protocolo de citometria de fluxo desenvolvida especificamente para a espécie (XAVIER, 2013). Para obter juvenis triploides em sistema laboratorial, foi estabelecido um protocolo de larvicultura para peixes diploides e triploides (BERTOLINI, 2015), possibilitando produzir juvenis para outras etapas de experimentação. Posteriormente, indivíduos diploides e triploides foram comparados quanto ao crescimento, esterilidade, maturação gonadal e qualidade da carcaça (NASCIMENTO, 2014). Os dados mostraram que as fêmeas triploides são estéreis e apresentam crescimento superior as fêmeas diploides, bem como aos machos diploides e triploides. No entanto, os machos triploides apresentam crescimento idêntico aos machos diploides, e, além disso, não são estéreis e podem produzir espermatozoides aneuploides (NASCIMENTO, 2014). Esse fato evidencia a esterilidade apenas para fêmeas triploides, ou seja, machos triploides podem ocasionar contaminação genética em caso de escape ao meio ambiente.

Portanto, para sanar o problema acima mencionado e garantir proles 100% estéreis, uma alternativa seria combinar hibridização e triploidização. A aplicação dessa técnica é potencialmente factível no lambari, *Astyanax altiparanae*, pois existem espécies filogeneticamente próximas que podem ser empregadas para a produção de híbridos, como *Astyanax fasciatus* e *Astyanax schubarti* (cruzamentos intragenéricos); *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pintoii* (cruzamentos intergenéricos). Portanto, os híbridos produzidos através do cruzamento de machos dessas espécies com fêmeas de *A. altiparanae* submetidos à triploidização podem constituir um protocolo efetivo para a produção massal de peixes estéreis, os quais poderão incrementar a produção e serem utilizados como receptores de células germinativas em estudos de quimerismo. Entretanto, observa-se uma inexistência de trabalhos com esse enfoque, o que nos levou a decidir pela realização da presente pesquisa.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos verificou-se que o cruzamento de fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto* mostrou-se viável, bem como a triploidização de tais híbridos. Ademais, constatou-se que fêmeas de todos os tratamentos não apresentaram espículas na nadadeira anal, enquanto que tais estruturas foram observadas na nadadeira anal de machos, com exceção de machos triploides híbridos de *A. fasciatus*. A análise histológica das gônadas, por sua vez, demonstrou que o único cruzamento que originou peixes completamente estéreis foi o híbrido triploide de *A. fasciatus*, considerado receptor ideal para transplante de células germinativas, uma vez que foram observadas apenas células somáticas nas gônadas. Dessa forma, pode-se verificar que a hibridação aliada à triploidização são ferramentas importantes para conservação e aquicultura, permitindo produção em larga escala de indivíduos estéreis.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMOV, N. **Triploidização no lambari (*Astyanax altiparanae*)**. 2013. (Trabalho de conclusão de Curso). PUC, Campinas.
- ADAMOV, N.; NASCIMENTO, N. F.; MACIEL, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L.; EVANGELISTA, M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. M.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Triploid induction in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* using temperature shock: tools for conservation and aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. x, n. x, In Press.
- ARIAS-RODRIGUEZ, L.; YASUI, G. e ARAI, K. Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. **Genetica**, v. 136, n. 1, p. 49-56, 2009/05/01 2009. ISSN 0016-6707. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10709-008-9299-x>>.
- ARUMUGANATHAN, K. e EARLE, E. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant molecular biology reporter**, v. 9, n. 3, p. 208-218, 1991.
- BAIRWA, M. K.; SAHARAN, N.; RAWAT, K. D.; JAKHAR, J. K.; BERA, A. Photoperiod, melatonin and its importance in fish reproduction. **Central European Journal of Experimental Biology**, v. 2, n. 4, p. 7-15, 2013.
- BARTLEY, D.; RANA, K. e IMMINK, A. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 325-337, 2001.
- BERTOLINI, R. M. **Larvicultura de *Astyanax altiparanae* diplóide e triplóides em sistema laboratorial**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) Fundação Hermio Ometto, Araras.
- CAL, R. M.; VIDAL, S.; GÓMEZ, C.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; MARTÍNEZ, P.; PIFERRER, F. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v. 251, n. 1, p. 99-108, 2006.
- MORAES FRANÇA FERREIRA, P.; DA SILVA NASCIMENTO, L.; COELHO DIAS, D.; DA VEIGA MOREIRA, D. M.; LÚCIA SALARO, A.; DE FREITAS, D.; BONTEMPO, M.; SOUZA CARNEIRO, A. P.; SAMPAIO ZUANON, J. A. Essential Oregano Oil as a Growth Promoter for the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, p. 28-34, 2014.
- SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DOS SANTOS SILVA, A. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1042, 2015.

DRUMMOND, C. D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 2, p. 176-182, 2000.

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. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016**. Roma: FAO, 2016.

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.

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 >.

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.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. UNESP, 2003. ISBN 8571394709.

GOMES, C.; COSTA, F. e BORELLA, M. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae*. **Micron**, v. 52, p. 33-38, 2013. ISSN 0968-4328.

GONÇALVES, L. U.; PARISI, G.; BONELLI, A.; SUSSEL, F. R.; VIEGAS, E. M. M. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*)(Garutti & Britski, 2000) broodstock. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 195-203, 2014.

GOUDIE, C. A.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B.; LIU, Q. Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. **Aquaculture**, v. 133, n. 3, p. 185-198, 1995.

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 >.

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.

LIMA, F.; MALABARBA, L.; BUCKUP, P.; SILVA, J.; VARI, R.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.; PAVANELLI, C.; MENEZES, N. Genera incertae sedis in Characidae. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p**, p. 106-169, 2003.

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.

MANNING, A. J.; BURTON, M. P. M. e CRIM, L. W. Reproductive evaluation of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). **Aquaculture**, v. 242, n. 1-4, p.625-640, 12/20/2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848604003588> >.

NA-NAKORN, U.; RANGSIN, W. e BOON-NGAM, J. Allotriploidy increases sterility in the hybrid between *Clarias macrocephalus* and *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, v. 237, n. 1, p. 73-88, 2004.

NASCIMENTO, N. F. **Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diplóides e triplóides de lambari (*Astyanax altiparanae*)**. Em **elaboração**. 2014. (Dissertação; Mestrado em Aquicultura). Centro Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007.

OMOTO, N.; MAEBAYASHI, M.; ADACHI, S.; ARAI, K.; YAMAUCHI, K. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the better (*Huso huso* female×*Acipenser ruthenus* male). **Aquaculture**, v. 245, n. 1–4, p. 39-47, 3/4/ 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848604007203> >.

PANDIT, N. P.; BHANDARI, R. K.; KOBAYASHI, Y.; NAKAMURA, M. High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **General and comparative endocrinology**, v. 213, p. 110-117, 2015.

PANKHURST, N. W. e PORTER, M. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 385-389, 2003.

PEREIRA-SANTOS, M. **Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Jaboticabal.

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. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268150000001 >.

PIVA, L. H. **Estudo da diferenciação sexual em *Astyanax altiparanae***. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria, Brazil.: Editora UFSM, v.1, 2010. p.101-115.

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.

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.

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

YASUI, G. S.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. **Cryo Letters**, v. 29, n. 5, p. 383-90, Sep-Oct 2008.

_____. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Anim Reprod Sci**, v. 116, n. 3-4, p. 335-45, Dec 2009.

YASUI, G. S.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; TAKAGI, Y.; ARAI, K. The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture**, v. 344–349, p. 147-152, 5/21/ 2012. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848612001561> >.

YASUI, G. S.; FUJIMOTO, T.; SAKAO, S.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **J Anim Sci**, v. 89, n. 8, p. 2380-8, Aug 2011.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 03, p. 464-470, 2015. ISSN 1751-732X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731114002511> >. Acesso em: 2015.