

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/08/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari
Astyanax Altiparanae, um peixe teleósteo

Marcos Natom Pereira Dias

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Botucatu – SP

2025

Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari
Astyanax Altiparanae, um peixe teleósteo

Marcos Natom Pereira Dias

Orientador:

Dr. George Shigueki Yasui

Coorientadores:

Dra. Lucia Suárez López

Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento

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.

D541f

Dias, Marcos Natom Pereira

Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari
Astyanax Altiparanae, um peixe teleósteo / Marcos Natom Pereira
Dias. -- Botucatu, 2025

40 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: George Shigueki Yasuí

Coorientadora: Lucia Suárez López

1. *Astyanax altiparanae*. 2. Androgênese. 3. Manipulação
cromossômica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fertilizações fria e quente induzem androgênese em lambari *Astyanax Altiparanae*, um peixe teleósteo

AUTOR: MARCOS NATOM PEREIRA DIAS

ORIENTADOR: GEORGE SHIGUEKI YASUI

COORIENTADOR: NIVALDO FERREIRA DO NASCIMENTO

COORIENTADORA: LUCIA SUÁREZ LÓPEZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI (Participação Presencial)
Ciências Biológicas / Universidade estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - Unesp/Câmpus de Bauru

Prof. Dr. ANDRÉ FURUGEN CÉSAR DE ANDRADE (Participação Presencial)
Departamento de Reprodução Animal / Universidade de São Paulo - USP

Botucatu, 05 de agosto de 2025



Documento assinado digitalmente
FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Data: 11/08/2025 15:59:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

"Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida"

– SÓCRATES.

***"Estudar os peixes é mergulhar em um universo silencioso,
onde cada espécie guarda, nas profundezas, os segredos da vida
e da evolução."***

– Autoria Própria

***A Gracivany Pereira de Araujo, por todo apoio
por toda luta que enfrentamos para podermos
chegar aqui, se não fosse pela senhora nada
disso estaria acontecendo.***

DEDICO!

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente a Deus, pela vida, pela coragem, pela determinação, pelos livramentos, pôr o meu maior expirador e que fez com que tudo desse certo na minha vida.

Quero agradecer a minha família, em especial a minha mãe Gracivany pereira de Araujo, que sempre me ajudou e sempre me motivou, que sempre fez de tudo por mim e meus irmãos. Agradecer ao meu tio Fabiano Pereira De Araujo que foi um pai pra mim, que me ensinou muitas coisas valiosas que levarei por resto da vida, que sempre me ajudou como pode.

Quero agradecer aos meus irmãos, Emanuel Dias Pereira Neto e Jhennyfer emmanuele Isabela Pereira Dias, que sempre me ajudaram e me incentivaram a continuar mesmo pensando em desistir na maioria das vezes.

Quero agradecer a minha namorada, Thais Oliveira Lopes da Silva, pelo companheirismo, por sempre me incentivar a não desistir, pelo carinho, amor e admiração que tens por me, obrigado por tudo que fez e faz pela gente.

Ao Dr. José Augusto Senhorini (im-memoriám), que mesmo com dificuldades, sempre me ajudou de alguma forma, agradecer também pelos ensinamentos que foi passado para mim, e pela amizade e companheirismo ao longa de sua carreira.

Quero agradecer ao coordenador do Laboratório de Biotecnologia de Peixes, Dr. George Shigueki Yasui, que me ajudou no meu trabalho, me deu uma força para que eu conseguisse concluir meu mestrado, me deu conselhos que irei levar para o resto da vida. Me ensinou técnicas inovadoras que usarei na minha carreira profissional, mostrou que com peixe quase tudo é possível, obrigado professor.

Quero agradecer ao meu Coorientador, Nivaldo Ferreira Do Nascimento, que me incentivou a não parar, me ajudou a vim pra São Paulo para poder fazer Pós-graduação, que me ajudou na minha dissertação, e que se tornou um grande amigo.

Quero agradecer a minha coorientadora, Lucia Suarez Lopez, que sempre me apoiou com meus trabalhos em laboratórios e sempre me deu bronca quando ensinava uma coisa e eu ainda fazia errado, agradecer pela paciência que teve comigo e pelo aprendizado passado a me, muito obrigado.

Quero agradecer ao Laboratório de Biotecnologia de Peixes, por ter me acolhido e me dado oportunidade para desenvolver meu trabalho de pesquisa, por todo material cedido pra mim e por todo apoio.

Quero agradecer também aos integrantes do laboratório, Alice Xavier Soares, Brenda Dumbra Lançone, Gabriella Braga Carvalho, Leydiane da Paixão Serra, Tamiris Imaeda Yassumoto, por sempre me ajudar quando precisei, por ter me dado apoio dentro do laboratório, pela amizade e companheirismo.

Quero agradecer a Augusto herrique, Lais Pereira, Nathalia Gleice e Roberto Ruy, pela amizade e companheirismo dentro do laboratório.

Quero agradecer a Pós-graduação por sempre ter respondido rápido e sempre ter tirado as dúvidas que tinha.

Quero agradecer a Capes pela bolsa concedida, pois foi de grande ajuda para minha carreira acadêmica, sem a bolsa não teria conseguido chegar até aqui, muito obrigado.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Fabio Porto-foresti e ao seu laboratório de Genômica e conservação de peixes, pela parceria e ajuda com as análises de dados para conclusão do meu trabalho.

Agradeço a todos que fazem parte dessa conquista na minha vida, a caminhada até aqui nunca foi fácil, mais Deus está comigo e eu não irei desistir.

OBRIGADO A TODOS!!!

RESUMO

Considerando os desafios associados ao uso de radiação na produção de peixes androgenéticos, nesse estudo mostra que é possível induzir com sucesso a androgênese em *Astyanax altiparanae* utilizando apenas o choque térmico durante a ativação dos gametas. Primeiramente, foi verificada a motilidade espermática a 4°C, 26°C e 40°C. Posteriormente, foi validado o potencial de fertilização desses espermatozoides. Constatada a motilidade espermática, passou-se então para testes de fertilização, foram então utilizados cinco casais diploides (2n), previamente submetidos à indução hormonal para obtenção de desovas por extrusão. Após a coleta dos gametas, os ovócitos foram divididos em três grupos: controle (sem choque térmico), fertilização com água fria (4°C) e fertilização com água quente (40°C). O desenvolvimento embrionário foi monitorado para avaliação da fertilização e eclosão. Foram também coletadas 25 larvas de cada tratamento para análise por citometria de fluxo e genotipagem, com o objetivo confirmar a herança uniparental. Embora motilidade espermática não tenha diferido entre os grupos, o tempo de motilidade foi significativamente maior a 4°C, indicando que temperaturas mais baixas prolongam a duração da motilidade espermática. A citometria revelou que a fertilização fria gerou 14 larvas haploides, 9 diploides e 2 triploides, enquanto a fertilização quente resultou em 14 haploides, 2 diploides e 15 triploides (dentre 50 larvas analisadas). Os resultados demonstram o potencial da fertilização com choque térmico como estratégia viável para indução de androgênese em *A. altiparanae*, contribuindo para o desenvolvimento de biotecnologias aplicáveis à conservação genética e à produção de linhagens monosexo na aquicultura.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*, androgênese, manipulação cromossômica.

ABSTRACT

Considering the challenges associated with the use of radiation in the production of androgenetic fish, this study shows that it is possible to successfully induce androgenesis in *Astyanax altiparanae* using only temperature shock during gamete activation. Firstly, sperm motility was verified at 4°C, 26°C and 40°C, to verify the fertilization potential of these spermatozoa. Once sperm motility was verified, fertilization tests were then carried out, and five diploid couples (2n) were used, previously submitted to hormonal induction to obtain spawning by stripping. After the collection of the gametes, the oocytes were divided into three groups: control (without temperature shock), fertilization with cold water (4°C) and fertilization with warm water (40°C). Embryonic development was monitored to evaluate fertilization and hatching. 25 larvae of each treatment were also used for analysis by flow cytometry and genotyping, in order to confirm uniparental inheritance. Although sperm motility did not differ between the groups, the motility duration was significantly longer at 4°C, indicating that lower temperatures prolong the duration of sperm motility. Flow cytometric analysis revealed that cold fertilization generated 14 haploid, 9 diploid and 2 triploid larvae, while warm fertilization resulted in 14 haploid, 2 diploid and 15 triploid larvae (out of 50 larvae analyzed). The results demonstrate the potential of heat shock fertilization as a viable strategy for androgenesis induction in *A. altiparanae*, contributing to the development of biotechnologies applicable to genetic conservation and the production of monosex lines in aquaculture.

Keywords: *Astyanax altiparanae*, androgenesis, chromosomal manipulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de lambari-do-rabo-amarelo (<i>Astyanax altiparanae</i>).....	15
Figura 2 - Representação esquemática do sistema utilizado para avaliação da motilidade espermática em diferentes temperaturas. A – Circulação de água fria (4°C) a partir de um aquário resfriado, passando pela lâmina e retornando ao aquário. B – Circulação de água quente (40°C) a partir de um banho-maria, passando pela lâmina e retornando ao banho-maria.	18
Figura 3 - Procedimentos adotados para a obtenção dos gametas e realização dos protocolos de fertilização. A fertilização controle foi realizada a 26°C, a fertilização fria a 4°C, e a fertilização quente a 40°C.	21
Figura 4 - Trajetória dos espermatozoides de <i>Astyanax lacustris</i> durante 1 segundo de motilidade, após ativação com água a 26 °C (A), 4 °C (B) e 40 °C (C).	23
Figura 5 - Motilidade espermática e parâmetros cinemáticos de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes temperaturas (Controle, Quente e Frio) ao longo do tempo após a ativação. (A) Motilidade (%); (B) Velocidade curvilínea (VCL, µm/s); (C) Velocidade média de deslocamento (VMD, µm/s); (D) Velocidade em linha reta (VLR, µm/s). Os dados representam média ± erro padrão (n = 3). As letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em cada tempo (ANOVA; P < 0,05). A partir de 60 segundos, apenas o tratamento Frio apresentou motilidade, sendo os dados apresentados de forma descritiva.	25
Figura 6 - Histogramas de citometria de fluxo representando o conteúdo relativo de DNA após fertilização a quente (40°C); A –sêmen haploide; B –larvas haploides; C – larvas diploides; D – larva triploide.....	29
Figura 7 - Histogramas de citometria de fluxo representando o conteúdo relativo de DNA após fertilização a frio (4°C). A – sêmen haploide; B – larvas haploides; C – larvas diploides; D – larvas triploides.	29
Figura 8 - Exemplos de larvas com diferentes graus de deformidade morfológica. A e B – Larvas com morfologia normal. C, D, E e F – Larvas com deformidades leves. G, H, I, J e K – Larvas com deformidades severas.	30
Figura 9 - Cromossomos metafásicos das larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> , A – haploide; B – diploide; C – triploide.....	31

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Desenvolvimento embrionário do lambari do rabo amarelo (<i>Axtyanax altiparanae</i>) após fertilização do controle (26°C), fria (4,0°C) e quente (40°C).	27
Tabela 2 - Resultado da citometria de fluxo do controle, da fertilização fria e fertilização quente.	28

SUMÁRIO

1.	Introdução	11
1.1	Manipulação cromossômica.....	12
1.2	Lambari (<i>Astyanax altiparanae</i>) como espécie modelo.....	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Local e Aspectos Éticos	16
3.2	Motilidade espermática em água quente e fria	17
3.3	Origem dos parentais e Indução hormonal	19
3.4	Fertilização fria e quente.....	20
3.5	Confirmação da ploidia por citometria de fluxo	21
3.6	Confirmação por citogenética	22
3.7	Análise estatística	22
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Motilidade espermática em água quente e fria	23
4.2	Desenvolvimento embrionário e sobrevivência.....	26
4.3	Confirmação da ploidia por citometria de fluxo	28
4.4	Citogenética	31
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO.....	35
7	REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical concentra a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, com mais de 6.000 espécies registradas (Albert et al., 2020). Dentre esses, o Brasil concentra mais da metade dessa diversidade, com mais de 3.000 espécies (ICMBio, 2018). Essa expressiva biodiversidade faz dos peixes continentais um recurso de grande importância nutricional, econômica e social, especialmente para comunidades ribeirinhas.

A aquicultura brasileira tem apresentado crescimento constante nos últimos anos. Segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura (PEIXE BR, 2024), em 2023 foram produzidas 887.029 toneladas de pescado, movimentando aproximadamente R\$ 9 bilhões e gerando mais de 3 milhões de empregos diretos e indiretos em todo o país. Entre as espécies com relevância crescente na aquicultura nacional, destaca-se o lambari-de-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Algumas espécies ganham destaque na aquicultura por apresentarem rápido crescimento e bom desempenho zootécnico (Winemiller et al., 2007). Este peixe é amplamente utilizado tanto para consumo humano quanto como isca na pesca esportiva (Nascimento, 2015). Recentemente, a espécie tem sido utilizada também como modelo experimental em estudos laboratoriais no Brasil (Yasui et al., 2022), devido à sua ampla adaptabilidade a diversos ambientes e manejo, que vai desde ambientes naturais como açudes e rios até sistemas de cultivo em cativeiro.

Em condições laboratoriais ou sistemas de cultivo intensivo, o lambari pode se reproduzir durante todo o ano (Evangelista et al., 2019), o que o torna ideal para experimentação. Devido ao seu tamanho reduzido, facilidade de manejo e reprodução fácil, *A. altiparanae* tem se destacado como espécie modelo em pesquisas sobre manipulação reprodutiva e melhoramento genético. Técnicas testadas nesse modelo podem, posteriormente, ser aplicadas com eficiência em espécies de maior porte e maior valor comercial (Yasui et al., 2015).

Nesse contexto, a Biotecnologia surge como uma importante aliada no desenvolvimento de ferramentas inovadoras para a produção e conservação de genótipos ameaçados de peixes. Dentre essas ferramentas, destaca-se a manipulação cromossômica, com grande potencial de impacto na aquicultura (Arai, 2001). Instituições de pesquisa têm desempenhado papel crucial no aprimoramento dessas tecnologias, contribuindo para o avanço da aquicultura nacional. A aplicação da biotecnologia permite a geração de animais com melhor desempenho zootécnico,

maior resistência a doenças, crescimento acelerado e melhor qualidade de carne, o que contribui para atender à crescente demanda global por alimentos de origem aquática (de Siqueira-Silva et al., 2018; Nascimento, 2015).

Dentre essas técnicas com potencial de alavancar a produção aquícola, se destaca a manipulação cromossômica, que são biotécnicas que alteram cromossomos dos peixes. As principais técnicas de manipulação cromossômica utilizadas na aquicultura, destacam-se a poliploidia, a ginogênese e a androgênese (Basavaraju, 2022; Goswami et al., 2022; Komen & Thorgaard, 2007). A produção de indivíduos triploides ($3n$), por exemplo, tem ganhado destaque em diversas espécies de peixes de interesse comercial, pois combina vantagens como a esterilidade, que impede a reprodução não controlada, e um potencial aumento no crescimento somático (Arai & Fujimoto, 2018; do Nascimento et al., 2017). A utilização de peixes estéreis também é uma estratégia eficaz para mitigar riscos ambientais, como o escape de animais provindos de cultivo e sua subsequente reprodução em ambientes naturais (Piferrer et al., 2009).

1.1 MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA

A manipulação cromossômica é um conjunto de técnicas utilizadas para alterar a quantidade e a organização dos cromossomos em diferentes espécies (Arai & Fujimoto, 2018). A poliploidia refere-se à presença de múltiplos conjuntos de cromossomos além do padrão diploide, como nos organismos triploides ($3n$), tetraploides ($4n$) e hexaploides ($6n$) (Dunham, 2023). Em peixes, embora esses fenômenos ocorram naturalmente em algumas espécies devido ao processo evolutivo (Borin et al., 2002), a poliploidia também pode ser induzida em laboratório por meio de procedimentos que afetam o desenvolvimento natural dos cromossomos (Arai, 2001). Outra forma de manipulação cromossômica é a produção de progênies de derivação uniparental, ou seja, peixes gerados exclusivamente a partir do genoma paterno ou materno, que são conhecidos como androgênese e ginogênese, respectivamente. Essas tecnologias objetivam produzir animais de alta performance, como linhagens melhoradas, populações monossexuais, e estudar a determinação do sexo em peixes.

A ginogênese é um tipo de reprodução uniparental em que o DNA paterno é eliminado, originando descendentes exclusivamente maternos (Komen & Thorgaard, 2007). A ginogênese clássica envolve duas etapas, a primeira delas é a inativação do material genético dos espermatozoides com radiação não-ionizante (ultravioleta - UV), radiações ionizantes (raios gama ou raios-X) (Arai & Fujimoto, 2018). As radiações não ionizantes são as mais sugeridas

e empregadas, pois oferecem menor risco ao manipulador, além de serem mais efetivas. Para inativar os espermatozoides com radiações não-ionizantes, suspensões de células são mantidos em solução salina ou fluido seminal em camadas finas, devido à baixa penetração da radiação (Arai & Fujimoto, 2018). A fertilização com espermatozoides irradiados gera embriões haploides, que, por não possuírem um genoma completo, geralmente apresentam malformações e não sobrevivem, condição conhecida como “síndrome haploide” (Pan et al., 2017), o que indica que os indivíduos haplóides são inviáveis. Para restaurar o estado diplóide, é realizada a segunda etapa, de diploidização, quando são aplicados choques físicos (temperatura ou pressão) ou químicos. A diploidização pode ocorrer na meiose, inibindo a formação e liberação do segundo corpúsculo polar (Zou et al., 2011), ou na mitose, bloqueando a segunda clivagem celular (Meng et al., 2016).

Na aquicultura, a ginogênese é valorizada por permitir a produção de populações monossexuais ou clonais (Dunham, 2023) e ajudar a entender os mecanismos de determinação sexual nas espécies. No entanto, a técnica ainda apresenta desafios, como baixa sobrevivência, aumento da endogamia e protocolos laboratoriais complexos, dificultando sua aplicação comercial. Em espécies Neotropicais como o lambari-do-rabo-amarelo (*A. altiparanae*), estudos com ginogênese induzida por UV conseguiram produzir ginogenéticos diploides utilizando choque térmico para restaurar a ploidia (Nascimento et al., 2020).

A androgênese, por sua vez, é uma biotecnologia reprodutiva que resulta na transmissão exclusiva do genoma paterno. Para isso, genoma do oócito é previamente inativado por meio de radiação gama, raios X ou radiação ultravioleta (UV), como demonstrado em estudos com a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Komen & Thorgaard, 2007). Esses oócitos, uma vez irradiados, são fertilizados com espermatozoides normais, originando embriões haploides sem contribuição materna. Assim como na ginogênese, é necessário aplicar um choque térmico ou de pressão durante a primeira divisão celular para duplicar o material genético e restaurar a diploidia (Dos Santos, 2017).

A aplicação da técnica de androgênese para reconstituição de peixes tem se mostrado uma estratégia viável na reprodução uniparental, permitindo a geração de indivíduos com material genético exclusivamente paterno (Dos Santos, 2017). Diversos estudos vêm demonstrando o sucesso da indução androgenética em diferentes espécies, por meio da inativação do DNA materno utilizando radiação ultravioleta ou choques térmicos, seguidos de mecanismos para restaurar a diploidia (Arai & Fujimoto, 2018).

Contudo, a duplicação de embriões haploides para obtenção de indivíduos diploides androgenéticos ainda representa um desafio técnico significativo (Komen & Thorgaard, 2007), causando baixas sobrevivências e deformidades. Como alternativa, alguns pesquisadores propuseram o uso de espermatozoides diploides provenientes de peixes tetraploides para induzir a androgênese diretamente, eliminando a etapa de diploidização. Essa abordagem mostrou-se eficaz em espécies como o salmão masu (*Oncorhynchus masou ishikawae*) (Nagoya et al., 2010), a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Thorgaard et al., 1990) e a dojo (*M. anguillicaudatus*) (Yasui et al., 2010).

Buscando otimizar a sobrevivência e simplificar o protocolo, Morishima et al., (2011) desenvolveram a técnica de fertilização a frio em *M. anguillicaudatus*, submetendo oócitos irradiados a um choque térmico entre 0 e 3 °C durante 60 minutos após a fertilização. Embora a fertilização tenha sido bem-sucedida, a eclosão foi baixa, com a maioria dos embriões permanecendo haploides. Estudos subsequentes demonstraram que a utilização de espermatozoides diploides nesse mesmo protocolo resultou na formação de embriões diploides viáveis, evitando a ocorrência da síndrome haploide comumente associada ao uso de espermatozoides (Hou et al., 2013; Yasui et al., 2010). Embora promissora, essa tecnologia ainda não foi empregada em espécies Neotropicais, embora no lambari *Astyanax altiparanae* esse procedimento seja promissor, já que existem indícios de herança uniparental através de choques frios (Adamov et al., 2017).

A escolha da espécie *A. altiparanae* para a aplicação de técnicas biotecnológicas de manipulação cromossômica fundamenta-se em sua ampla distribuição na região Neotropical, adaptabilidade a condições laboratoriais e histórico consolidado de estudos em reprodução e genética. Sua utilização visa inovar estratégias de conservação e manejo de espécies nativas, aproveitando o conhecimento acumulado sobre sua biologia reprodutiva e características genéticas. O trabalho de Yasui et al., (2022) serviu como base para escolha dessas espécies que mostrou as técnicas desenvolvidas na manipulação cromossômica. Os resultados obtidos nessas pesquisas não apenas comprovam a eficiência da técnica, mas também destacam seu potencial na conservação genética, na formação de linhagens isogênicas e em programas de melhoramento na aquicultura.

1.2 LAMBARI (*ASTYANAX ALTIPARANAE*) COMO ESPÉCIE MODELO

7 REFERÊNCIAS

- Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., & Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. In *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* (Vol. 51). <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032>
- Arai, K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197(1–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00588-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00588-9)
- Arai, K., & Fujimoto, T. (2018). Chromosome Manipulation Techniques and Applications to Aquaculture. In *Sex Control in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1002/9781119127291.ch6>
- Basavaraju, Y. (2022). Monosex population in aquaculture. In *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91240-2.00012-9>
- Bertolini, R. M., Senhorini, J. A., Nascimento, N. F. do, Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Peres, W. A. M., Silva, R. C. da, & Yasui, G. S. (2018). First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. *Aquaculture Research*, 49(1). <https://doi.org/10.1111/are.13433>
- Borin, L. A., Martins-Santos, I. C., & Oliveira, C. (2002). A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): Mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. *Genetica*, 115(3). <https://doi.org/10.1023/A:1020667526552>
- Dadras, H., Dzyuba, B., Cosson, J., Golpour, A., Siddique, M. A. M., & Linhart, O. (2017). Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. In *Aquaculture Research* (Vol. 48, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/are.13049>
- de Siqueira-Silva, D. H., Saito, T., dos Santos-Silva, A. P., da Silva Costa, R., Psenicka, M., & Yasui, G. S. (2018). Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(6). <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0506-0>

- do Nascimento, N. F., Pereira-Santos, M., Piva, L. H., Manzini, B., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., Yasui, G. S., & Nakaghi, L. S. O. (2017). Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Aquaculture*, 471. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.007>
- Dos Santos, M. P. (2017). *Tese de Doutorado Androgênese em Astyanax altiparanae: Ferramenta de Reconstituição em Peixes*.
- Dos Santos, M. P., Yasui, G. S., Xavier, P. L. P., De MacEdo Adamov, N. S., Do Nascimento, N. F., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., & Nakaghi, L. S. O. (2016). Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Zygote*, 24(6). <https://doi.org/10.1017/S0967199416000101>
- Dunham, R. A. (2023). Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic approaches: Third edition. In *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches: Third Edition*. <https://doi.org/10.1079/9781789243468.0000>
- Evangelista, M. M., Sussel, F. R., & Romagosa, E. (2019). Environmental manipulation on *astyanax altiparanae* out-of-season spawning. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(2). <https://doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-9>
- Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti de Almeida-Toledo, L. (1993). A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia*, 49(9). <https://doi.org/10.1007/BF01923555>
- Garcia, Y. (n.d.). *BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE Astyanax lacustris: AVALIAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL EM CULTIVO*.
- GARUTTI, V. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei : Characidae) da bacia do alto rio Parana e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comn. Mus. Cienc. Tecnol.*, 13, 65–88. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570291224782050688.bib?lang=ja>
- Goswami, M., Trudeau, V. L., & Lakra, W. S. (2022). Biotechnology in modern aquaculture: Innovations, advancements, and challenges. In *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91240-2.00003-8>

- Hou, J., Fujimoto, T., Yamaha, E., & Arai, K. (2013). Production of androgenetic diploid loach by cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm. *Theriogenology*, 80(2). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.014>
- Hou, J., Saito, T., Fujimoto, T., Yamaha, E., & Arai, K. (2014). Androgenetic doubled haploids induced without irradiation of eggs in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture*, 420–421. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.021>
- ICMBio. (2018). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção volume vi – peixes 2018*.
- Komen, H., & Thorgaard, G. H. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. In *Aquaculture* (Vol. 269, Issues 1–4). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.009>
- Lin, F., & Dabrowski, K. (1998). Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): Evaluation using flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development*, 49(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199801\)49:1<10::AID-MRD2>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1<10::AID-MRD2>3.0.CO;2-R)
- Meng, Z., Liu, X., Liu, B., Hu, P., Jia, Y., Yang, Z., Zhang, H., Liu, X., & Lei, J. (2016). Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 451. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.010>
- Morishima, K., Fujimoto, T., Sato, M., Kawae, A., Zhao, Y., Yamaha, E., & Arai, K. (2011). Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce androgenesis in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), a teleost fish. *BMC Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-116>
- Nagoya, H., Kawamura, K., & Ohta, H. (2010). Production of androgenetic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* with dispermy fertilization. *Fisheries Science*, 76(2). <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0224-8>
- Nascimento, N. F. Do. (2015). *Desempenho zootécnico e caracterização da linhagem germinativa de peixes diploides e triploides de lambari (Astyanax altiparanae)*.
- Nascimento, N. F. do, Monzani, P. S., Pereira-Santos, M., Niedzielski, D., Senhorini, J. A., Silva, L. A., Nakaghi, L. S. O., & Yasui, G. S. (2020). The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*)

- as a model organism. *Aquaculture*, 514.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734432>
- Pan, Z. J., Zhu, C. K., Wang, H., Chang, G. L., Ding, H. Y., Qiang, X. G., & Yu, X. S. (2017). Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. *Aquaculture Research*, 48(11). <https://doi.org/10.1111/are.13388>
- PEIXE BR, P. (n.d.). *ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2024 ANUÁRIO 2024*.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. In *Aquaculture* (Vol. 293, Issues 3–4).
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.036>
- Reis, V. R., Loureiro De Almeida, F., & Piferrer, F. (2016). Produção de populações monossexo em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 40(1).
- Thorgaard, G. H., Scheerer, P. D., Hershberger, W. K., & Myers, J. M. (1990). Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. *Aquaculture*, 85(1–4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90021-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90021-E)
- Winemiller, K. O., Agostinho, A. A., & Caramaschi, É. P. (2007). Fish Ecology in Tropical Streams. In *Tropical Stream Ecology*. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50007-8>
- Yasui, G. S., Ferreira do Nascimento, N., Pereira-Santos, M., Santos Silva, A. P. dos, Coelho, G. C. Z., Visintin, J. A., Porto-Foresti, F., Okada Nakaghi, L. S., Vianna, N. C., Carvalho, G. B., Monzani, P. S., López, L. S., & Senhorini, J. A. (2022). Establishing a model fish for the Neotropical region: The case of the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* in advanced biotechnology. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.903990>
- Yasui, G. S., Fujimoto, T., & Arai, K. (2010). Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. *Aquaculture*, 308(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.041>

- Yasui, G. S., Senhorini, J. A., Shimoda, E., Pereira-Santos, M., Nakaghi, L. S. O., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., & Silva, L. A. (2015). Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 9(3), 464–470. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002511>
- Zaganini, R. L., Hashimoto, D. T., Pereira, L. H. G., Oliveira, C., Mendonça, F. F., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2014). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. *Journal of Genetics*, 93. <https://doi.org/10.1007/s12041-012-0143-9>
- Zou, Y. C., Wei, Q. W., & Pan, G. B. (2011). Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) and its confirmation using microsatellite markers. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01681.x>