

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**INDUÇÃO Á TETRAPLOIDIA EM TILÁPIA NILÓTICA,
Oreochromis niloticus UTILIZANDO-SE
CHOQUE TÉRMICO**

Mauricio Carrillo Ávila

Biólogo Marinho

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
Junho de 2004

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**INDUÇÃO Á TETRAPLOIDIA EM TILÁPIA NILÓTICA,
Oreochromis niloticus UTILIZANDO-SE
CHOQUE TÉRMICO**

Aluno: Mauricio Carrillo Ávila

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Romagosa

Dissertação apresentada ao Centro de
Aquicultura da UNESP – Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Aquicultura – Área de Concentração em
Aquicultura em Águas Continentais

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
Junho de 2004

C317i Carrillo, Mauricio

Indução à tetraploidia em tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*, utilizando-se choque térmico/ Mauricio Carrillo Ávila.—Jaboticabal, 2004.

V, 59 f.; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2004.

Orientadora: Dra. Elizabeth Romagosa.

Banca Examinadora: Dr. Pedro Manoel Galetti, Dra. Teresa Cristina R, Dias Koberstein.

Bibliografia

1. Choque térmico, 2. Manipulação, 3. Tetraploidia, 4. Tilápia

CDU 639.31

DEDICATORIA

A mis mujeres Olga del Pilar y Sara Juliana, que abandonaron todo en Colombia por acompañarme en este camino que esta llegando al fin y que para muchos era una locura.

Para toda mi grande y querida familia su apoyo y solidaridad incondicional en esta etapa de nuestras vidas. A Doña Amada, mi madre y pilar de sostenimiento de todos nosotros. A Orlando, Mireya y Manolo, Núbia y Hermes, Patrícia y Jaime, Sonia y German y Fernando, mis hermanos y cuñados.

A Doña Blanca, mi suegra, Sandra y Sergio y Rocio mis cuñados.

Para todos ustedes

AGRADECIMENTOS

Ao CAUNESP, com a Direção da Profa. Dra. Elisabeth Urbinati, pela oportunidade de fazer parte do curso de mestrado.

À Profa. Dra. Elisabeth Romagosa pela orientação, a paciência e a força para a realização deste projeto, assim como dos projetos que estão por vir.

À Dra. Teresa Cristina R. Dias Koberstein por facilitar os animais e a infraestrutura do setor das tilápias utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes por ceder seu espaço no setor de reprodução de peixes para a realização dos testes e para a aplicação dos respectivos tratamentos, assim como para a manutenção dos reprodutores e das larvas durante o período de engorda.

Ao Prof. Dr. Dalton Carneiro e ao Laboratório de patologia por nos facilitar seus tanques para manter os animais quando espaço ficou pequeno.

Aos Profs. Dr. Fausto Foresti, Dra. Laura Sakito Okada Nakaghi, Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. e Dra. Teresa Cristina R. Dias Koberstein, pelos seus valiosos aportes como parte das bancas examinadoras.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga, pela valiosa assessoria nas análises estatísticas.

Ao senhor Márcio Alves dos Santos, quem foi um grande apoio durante todo o tempo de realização do projeto, sempre aportando soluções para todos os inconvenientes apresentados, os quais não foram poucos.

Aos senhores Valdecir e Roberto, funcionários do Setor de carcinicultura pelo apoio oportuno com o empréstimo de diferentes insumos que sempre foram precisados nos momentos mais inoportunos.

A Veralice e Thais pela colaboração sempre oportuna nos momentos mais necessitados.

Ao laboratório de citogenética de peixes da Universidade Federal de São Carlos, especialmente à mestrande Caroline García pelos teste de FISH realizados.

Como tudo não podia ser ciência, agradeço especialmente aos amigos Fabiana, Daniela, Luciane, Leo e Ana Baccarin, Karina e Twin, Mariana e Paraca, Flavião, Ana Paula e Fabiano, Roquinho, Fabio, Sr. Antônio (Acre) e à colônia colombiana, Camilo, Miguel e Ana Isabel, Adriana, Francisco, Anita e Silvia, Javier e Diana pelos bons churrascos e peixadas que sempre estiveram acompanhados de muita música, cerveja e boas batidas.

ÍNDICE

	Páginas
Considerações Iniciais.....	01
1. Espécie Estudada.....	01
2. Reprodução	01
3. Produção de Monossexo	02
3.1. Sexagem Manual	02
3.2. Reversão Sexual	03
3.3. Hibridação Interespecífica	03
3.4. Número de Cromossomos	04
4. Indução de Poliplóides	05
4.1. Métodos Físicos	05
Choque Térmico	05
Choques de Pressão	06
4.2. Métodos Químicos	07
5. Indução de Triplóides	07
6. Indução de Tetraplóides	09
7. Indução de Ginogenéticos	11
8. Indução de Androgenéticos	13
9. Referências	15

Capítulo Indução à Tetraploidia em Tilápia Nilótica, *Oreochromis niloticus* Utilizando-se Choque Térmico

Resumo	22
Abstract	23
Introdução.....	24
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	34
Conclusões	51
Referências Bibliográficas	52

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Espécie Estudada

A tilápia, *Oreochromis niloticus*, espécie de peixe pertencente à família Ciclidae, é nativa da África, do Vale Jordan e da costa do rio Palestina (PHILIPPART & RUWET, 1982 em HERBST, 2002). São peixes que se encontram em águas cálidas subtropicais, distribuindo-se em águas que variam de temperatura de 25,0 a 30,0 °C; entretanto, são sensíveis a baixas temperaturas, com limites letais entre 9,0 a 13,0 °C, dependendo da espécie. A maioria das tilápias é eurihalina e pode viver em águas salobras e marinhas (BARDACH et al., 1986; ESPEJO & TORRES, 2001). Quanto à forma do corpo, pode ser oval, com 23 a 31 espinhas ou raios na nadadeira dorsal, 19 a 22 rastros branqueais no arco inferior do 1º arco branquial, 31 a 33 escamas na série longitudinal e 3 a 4 fileiras de dentes (HEPHER & PRUGININ, 1989). A coloração geralmente é cinza escura, com nadadeiras caudais apresentando listas pretas delgadas e verticais. Os machos, durante o período reprodutivo, apresentam a superfície ventral do corpo e as nadadeiras anais, dorsais e pélvicas pretas, a cabeça e o corpo com manchas vermelhas.

2. Reprodução

A tilápia inicia o processo de 1ª maturação gonadal com 2 ou 3 meses de idade, atingindo médias de comprimento 6,0 a 10,0 cm. Os machos procuram ocupar um território particular, constroem os ninhos que atingem 35,0 cm diâmetro X 6,0 cm profundidade e o vigiam constantemente. A fêmea libera os ovócitos em parcelas (75 a 250) então, o macho libera o sêmen sob estes e, em seguida, ela recolhe todos os ovos fertilizados na boca, incubando-os durante o período de 3 a 5 dias. As larvas eclodem e permanecem na boca da mãe até que o saco vitelínico seja totalmente reabsorvido, o que geralmente ocorre no período entre o 10º e 15º dia de vida. Neste período, se as larvas sentem-se ameaçadas, entram

rapidamente na boca da mãe (BARDACH et al., 1986). Devido ao grande número de desovas das fêmeas durante um ciclo de produção, ocorre uma rápida superpopulação dos viveiros, nos quais as larvas e alevinos competirão por espaço e alimento afetando negativamente o rendimento do lote (TORRES, 1993; EL GAMAL et al., 1999; BYAMUNGU et al., 2001; SHELTON, 2002; MYERS, 2003).

A tilápia nilótica criada em cativeiro tem demonstrado ser um peixe de fácil manejo, atingindo o valor de conversão alimentar aparente recomendado, alta produtividade, e excelente desempenho reprodutivo (GUERRERO, 1982). No entanto, o processo de maturação final requer um consumo de energia elevado para o desenvolvimento dos gametas, principalmente por parte das fêmeas, enquanto, os machos atingem melhores taxas de crescimento (LÓPEZ & TORO, 1990; PÉREZ, 1996; FELIP et al., 1997, 1999). Conseqüentemente, o criador tem optado por criar tilápias estéreis ou populações monosexo de machos, gerando uma produção maior e com melhores rendimentos (FELIP et al., 1999).

3. Produção de Monosexo

Para produzir populações monosexo de machos têm-se utilizado técnicas de seleção por sexos, melhoramento genético e manipulação cromossômica.

Na prática pode-se obter indivíduos machos de tilápia nilótica através de:

3.1. Sexagem Manual: os animais são separados em machos e fêmeas, através da presença de caracteres sexuais primários distintos como, por exemplo, a forma da papila genital.

A desvantagem desta técnica é que, além de não ser 100 % eficaz, principalmente em criações intensivas, torna-se praticamente inviável, pois, como a sexagem é manual, torna-se bastante lenta (GUERRERO, 1982; HEPHER & PRUGININ, 1982, 1989; ESPEJO & TORRES, 2001).

3.2. Reversão Sexual: obtém-se somente populações de peixes monosexo. É preconizado que no início da embriogênese, o embrião ainda não tem desenvolvido as gônadas e possui um tecido pré-gonadal, com células germinativas indiferenciadas ou “totipotentes”, que poderão resultar em um animal do sexo masculino ou feminino. Após essa etapa, não é mais possível alterar o sexo (TOLEDO et al., 1996). Neste pequeno espaço de tempo, que varia de espécie para espécie, é quando o sexo fisiológico pode ser alterado. Para tal, deve-se fornecer às larvas ração acrescida de hormônio (17 alfa-metil-testosterona ou outros) ou adicionar o hormônio à água (ESPEJO & TORRES 2001). Se as larvas ingerem ou absorvem esteróides anabolizantes durante este período, o hormônio pode interferir diretamente no desenvolvimento das células totipotentes (TOLEDO et al., 1996).

A desvantagem desta metodologia é o emprego de hormônio, sem garantir a reversão de 100 % dos alevinos além, dos custos de produção (GUERRERO, 1982; PANDIAN & VARADARAJ, 1988; HEPHER & PRUGININ, 1989; TORRES, 1993; TOLEDO et al., 1996; ESPEJO & TORRES, 2001). Hoje, alguns países resistem em consumir peixes hormonotratados (GUERRERO, 1975; SCOTT et al., 1989; CARRASCO et al., 1999; BYAMUNGU, et al., 2001; SHELTON, 2002; MYERS, 2003). No entanto, WOHLFARTH & WEDEKIN (1991) afirmam que, os resíduos androgênicos que poderão permanecer no corpo dos animais são desprezíveis, sendo que os peixes são possíveis de serem consumidos.

3.3. Hibridação Interespecífica: é o cruzamento de um casal formado por espécies diferentes, obtendo-se aproximadamente 90 % ou mais de machos híbridos (GUERRERO, 1982; HEPHER & PRUGININ, 1982, 1989; CASTILLO, 1992).

No entanto, a hibridação interespecífica não é uma metodologia muito empregada, obtendo-se sucessivas gerações onde “todos os indivíduos não são machos” (WOHLFARTH & WEDEKIN, 1991; ESPEJO & TORRES, 2001). Os autores não sabem exatamente porque isto acontece, se devido à “contaminação

gênica das matrizes” ou por segregações em “loci polimórficos” presentes originalmente.

Em piscicultura se utiliza a hibridação em tilápias nilóticas com o fim de se produzir progênes com 100% de machos. Para poder cumprir esta prática é necessário se conhecer os mecanismos genéticos da determinação do sexo das espécies utilizadas.

Os dados da Tabela 1 indicam os mecanismos genéticos para a determinação do sexo de algumas espécies do gênero ***Oreochromis***.

Tabela 1. Mecanismos genéticos da determinação do sexo de algumas espécies do gênero *Oreochromis*

Espécie	Fêmeas	Machos	
<i>Oreochromis mossambicus</i>	XX	XY	Fêmeas
<i>Oreochromis niloticus</i>	XX	XY	Homogaméticas
<i>Oreochromis aureus</i>	WZ	ZZ	
<i>Oreochromis urolepis homorum</i>	WZ	ZZ	Homogaméticos

3.4. Número de Cromossomos: as técnicas para se alterar o número de cromossomos de peixes envolvem a produção de organismos poliplóides (triplóides 3N, tetraplóides 4N, etc) ou aqueles descendentes que se desenvolvem a partir de um só progenitor, ou seja, da mãe (ginogenética) ou pai (androgenético) (CHOURROUT 1982, 1984, 1986; GRAHAM, 1983; WOHLFARTH, 1983; YAMAZAKI, 1983; THORGAARD, 1986; LOZANO et al., 1987; LÓPEZ & TORO, 1990; CHAPARRO, 1994; CARRASCO et al., 1999).

4. Indução de Poliplóides

Entende-se a poliploidia como um dos tipos de variações numéricas que afetam ao conjunto dos cromossomos das células, aumentando ou diminuindo seu número (VALENTI, 1975; THORGAARD, 1986; TAVE, 1990; CELIS & MARTINEZ, 1993; HORVATH & ORBAN, 1995).

Para se obter um organismo poliplóide é necessário inibir a 2ª divisão meiótica, ou seja, manter na célula o 2º corpúsculo polar ou promover a supressão da 1ª clivagem do embrião, que se consegue inibindo a 1ª mitose. A indução da poliploidia pode-se obter por métodos físicos como os choques térmicos quentes e/ou frios e os de pressão (GERVAI, et al., 1980; PURDOM, 1983; CHOURROUT, 1984, 1986; MYERS, 1986, 2003; DUNHAM, 1990; TAVE, 1990; MARENGONI & ONOUE, 1998; BYAMUNGU et al., 2001; HULATA, 2001; SHELTON, 2002) e por métodos químicos, como a imersão em citocalasina B, colchicina, caseína e azul de toluidina, etc. (THORGAARD, 1986; PEREZ & BEAUMONT, 1990; TAVE, 1990).

4.1. Métodos Físicos

Choques térmicos

O método consiste em submergir os ovos recém-fertilizados dentro de um recipiente que contenha água com a temperatura previamente estabelecida. Uma vez cumprido o tempo do choque térmico programado, os ovos são levados rapidamente à temperatura normal de incubação (CARRILLO, 2001). Este tratamento tem sido amplamente utilizado para impedir a 2ª divisão meiótica ou a expulsão do 2º corpúsculo polar ou inibir a 1ª clivagem, ou seja, a 1ª mitose. O tempo pós-fertilização, a duração e a temperatura dos diferentes tratamentos vão depender do ciclo celular (SHELTON, 2002). Estes choques geralmente são empregados quando se trata de grandes volumes de ovos e as médias de

temperatura mais elevadas podem variar entre 25,0 – 42,0 °C e as baixas entre 0 – 11,0 ° C (PÉREZ, 1996).

A literatura pertinente descreve que os choques quentes oferecem melhores resultados para espécies de águas frias e por sua vez, os choques frios são mais indicados para espécies de águas quentes (TOLEDO et al., 1996). Segundo PÉREZ (1996), os choques térmicos são mais eficientes quando ocorre uma variação de temperatura de aproximadamente 5,0 °C do ambiente onde geralmente ocorre o desenvolvimento embrionário da espécie. Entretanto, TOLEDO et al., (1996) mencionam que a temperatura que produz os melhores resultados é espécie-específica e se situa na proximidade do seu limite letal. Na indução a poliploidia, os choques térmicos são os mais facilmente aplicáveis por seus baixos custos e eficiência (THORGAARD, 1986; PANDIAN & VARADARAJ, 1990; SHELTON, 2002).

Choques de Pressão

A pressão hidrostática tem sido utilizada para bloquear a expulsão do 2º corpúsculo polar ou a 1ª divisão mitótica. No entanto, a aplicação deste tratamento requer equipamentos mais especializados (caixas de pressão e pressão hidráulica) em relação a outros tratamentos. Este método se baseia em introduzir os ovos fecundados em um cilindro de aço cheio de água com uma temperatura constante e fechado com um pistão (LOZANO, et al., 1987; MAY et al., 1988) e a seguir, após aplicado o choque de pressão adequado, os ovos sofrem uma descompressão.

O inconveniente é que só se pode utilizar esta metodologia com um pequeno número de ovos por ciclo, entretanto, com custos bastante elevados (LOPEZ & TORO, 1990; PÉREZ, 1996).

4.2. Métodos Químicos

O tratamento químico pode ser usado para bloquear a expulsão do 2º corpúsculo polar ou a divisão mitótica em ovos, impedindo a formação dos microfilamentos das células. As substâncias utilizadas são principalmente a, colchicina, óxido nitroso, cafeína e especialmente, a citocalasina B.

Este método tem sido o menos recomendado, pois além das dificuldades no controle do tratamento, este não pode ser aplicado em grande escala.

5. Indução de Triplóides

A triploidia é um processo decorrente do impedimento da finalização da 2ª divisão meiótica, já que a meiose II não foi completada e os ovócitos secundários se encontram detidos na fase de Prófase II (PEREZ & BEAUMONT, 1990).

Em populações naturais podemos encontrar indivíduos triplóides junto aos diplóides, mostrando que a divisão reducional da meiose pode apresentar problemas ocasionais.

Isto pode ser devido a dois processos: 1) quando ovos haplóides são fertilizados por espermatozóides haplóides e o 2º corpúsculo polar não é eliminado depois da fertilização; 2) os indivíduos triplóides também podem ser gerados quando diplóides são cruzados com tetraplóides (HORVATH & ORBAN, 1995; THOGAARD, 1986).

Os indivíduos triplóides, que geralmente são estéreis, são de grande valia para aquicultura porque tem um desenvolvimento superior que os indivíduos “normais” uma vez que estes normais atinjam a maturação gonadal. A esterilidade é devida à impossibilidade de uma divisão uniforme dos três cromossomos de cada par em dois, durante a produção de gametas. A presença destes 3 cromossomos nas células germinativas dificulta o processo da meiose, afetando de alguma maneira a formação dos gametas (MYERS, 2003; TAVE, 1990; EL GAMAL et al., 2000; BYAMUNGU et al., 2001).

Existem duas formas de se obter indivíduos triplóides: 1) quando o espermatozóide penetra no ovócito, o pronúcleo masculino migra para se unir ao pronúcleo feminino e o processo se reinicia culminando com a formação do zigoto. O ovo recém-fecundado é submetido a um choque térmico, de pressão ou agente químico que vai impedir a expulsão do 2º corpúsculo polar do zigoto, o qual se funde ao núcleo diplóide já formado no momento da fertilização, dando origem a uma célula que apresenta dois pares de cromossomos provenientes da mãe e um do pai (Figura 1); 2) a produção de triplóides é mediante o cruzamento normal de organismos tetraplóides com diplóides.

Esta esterilidade genética é benéfica para a criação de espécies de peixes de interesse econômico, posto que, potencialmente pode: a) favorecer o crescimento somático dos indivíduos ao impedir a maturação sexual; b) controlar a superpopulação; 3) produzir indivíduos com maior taxa de heterozigose; 4) auxiliar em programas de repovoamento em corpos d'água naturais visto que não competem reprodutivamente com as espécies nativas.

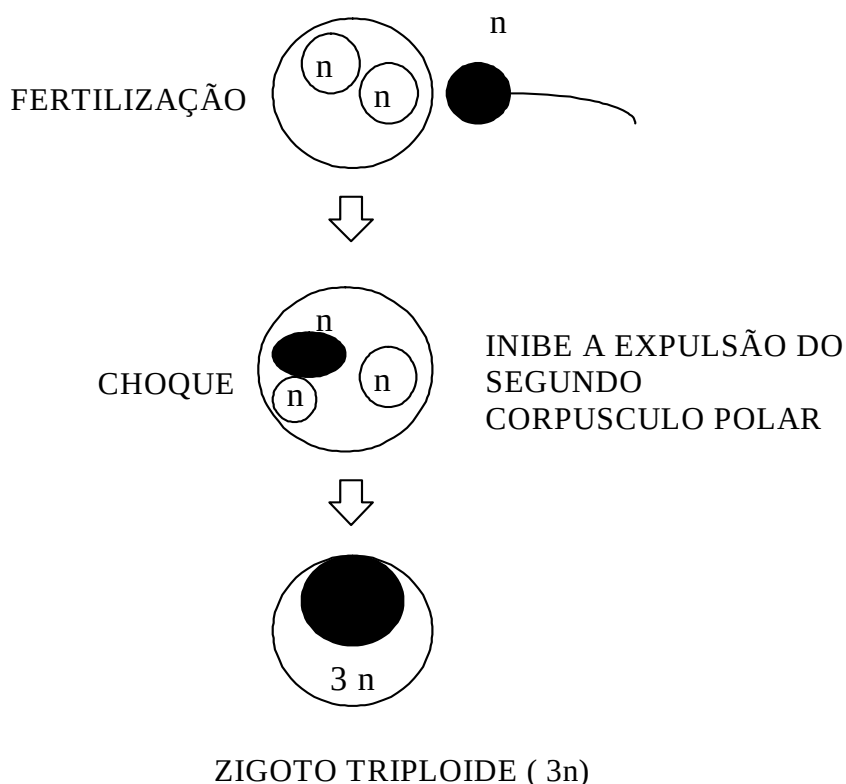


Figura 1. Processo de indução de indivíduos triploides pela indução da 2ª divisão meiótica e impedindo a expulsão do 2º corpúsculo polar (Carrillo, 2001).

6. Indução de Tetraplóides

Como foi dito anteriormente, os indivíduos triploides são estéreis, enquanto que os tetraplóides são geralmente férteis. Entretanto, não há registros na literatura de peixes tetraplóides encontrados em ambientes naturais, mas provavelmente pode ocorrer a duplicação do genoma diplóide durante a filogênese conduzindo à formação de novas espécies (HORVATH & ORBAN, 1995).

Para se obter indivíduos tetraplóides, a aplicação de choques térmicos ou de pressão (choque tardio) deve acontecer momentos antes que ocorra a 1ª divisão mitótica do zigoto, logo que cada cromossomo é replicado e que se tenham fusionado os 2 núcleos diplóides dentro da mesma célula, resultando em $4n$ (MYERS, 1986; PURDOM, 1983; TAVE, 1990; CHERFAS et al., 1993; HUSSAIN

et al., 1993;. MYERS et al.,1995; HORVATH & ORBAN, 1995; MARENGONI & ONOUE, 1998; VARADI et al., 1999) (Figura 2).

Portanto, o resultado da indução de poliplóides depende em grande parte do tempo de aplicação do tratamento utilizado no momento da fertilização (PURDOM, 1969, 1983; WOHLFARTH, 1983; CHOURROUT, 1984, 1986; MYERS, 1986, 2003; THORGAARD, 1986; TAVE, 1988, 1990; DUNHAM, 1990; WOHLFARD & WEDEKIND, 1991; MARENGONI & ONOUE, 1998; BYAMUNGU et al., 2001; SHELTON, 2002).

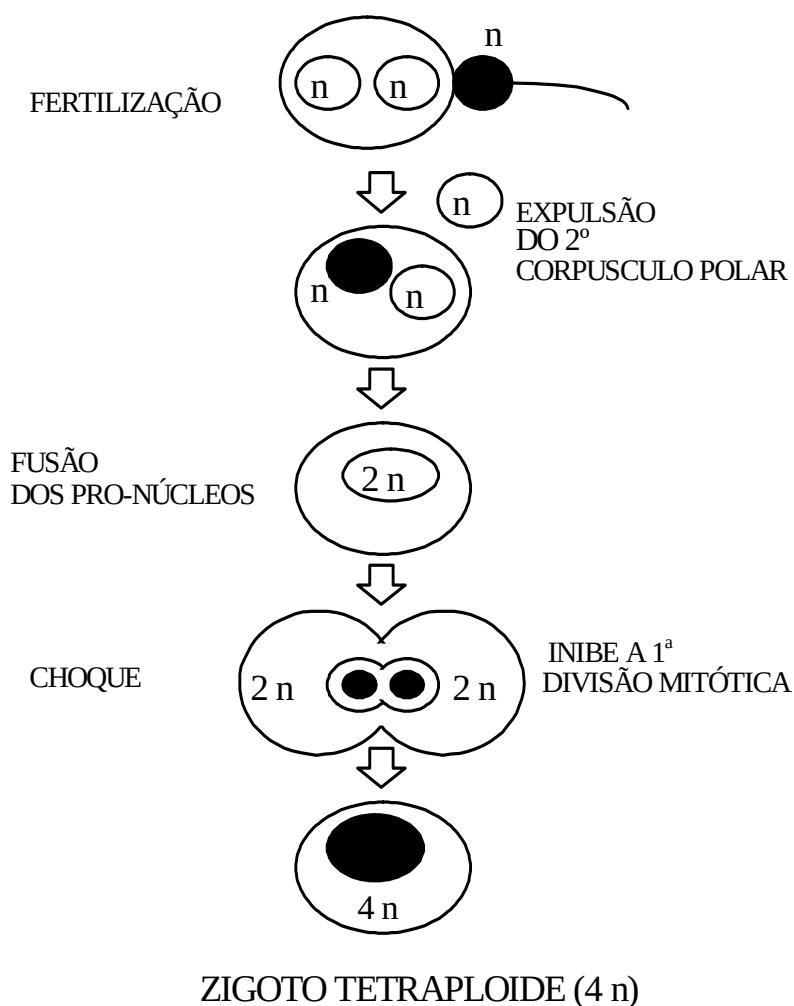


Figura 2. Processo de obtenção de indivíduos tetraplóides pela inibição da 1ª divisão mitótica (Carrillo, 2001).

7. Indução de Ginogenéticos

O principal interesse nos procedimentos de indução de ginogênese ou autofertilização tem sido o potencial para a produção de populações 100 % fêmeas. Esta pode ser induzida nos estádios iniciais da ontogenia, durante o desenvolvimento da 2ª divisão meiótica do ovócito ou na 1ª divisão mitótica do zigoto. A reprodução artificial e a fertilização “*in vitro*” são essenciais para a aplicação deste método de manipulação dos gametas em peixes.

Há relatos de algumas espécies de peixes teleósteos onde o indivíduo é hermafrodita e produz gametas masculinos e femininos, podendo se autofecundar. Também, pode ocorrer a produção acidental de 2 tipos de gametas devido a utilização de hormônios (HÓRVATH & ORBAN et al., 1995).

O indivíduo ginogenético é aquele que conta unicamente com a informação genética transmitida pela fêmea, ou seja, o material genético do espermatozóide não contribui na sua formação (PURDOM, 1969; CHOURROUT, 1986; THORGAARD, 1986; DUNHAM, 1990; TAVE, 1990; CHERFAS et al., 1993; MAIR, 1993; VARADI et al., 1999; ZANUY et al., 2001; HULATA, 2001). Para obtê-los, é necessário ativar o ovócito com um espermatozóide cuja informação genética tenha sido desativada. Os tratamentos empregados são por radiação, que incluem a radiação gama, cobalto 60 (^{60}Co) ou Césio 137 (^{137}Cs), os raios X e a luz ultravioleta.

A luz ultravioleta é mais fácil de se trabalhar e menos perigosa que as fontes de ^{60}Co o ^{137}Cs e os raios X. Entretanto, a luz ultravioleta danifica os cromossomos, principalmente por formar dímeros de timina que mudam a conformação tridimensional do DNA, evitando sua replicação (PIFERRER et al., 1995). Em geral, a prole resultante apresenta uma baixa taxa de sobrevivência. Algumas vezes, após a inativação do sêmen por irradiação, podem ficar fragmentos ativos de cromossomos que se unem com o material genético da fêmea, expressando-se no novo indivíduo formado.

Desta forma, os indivíduos produzidos são haplóides, ou seja que possuem um só cromossomo de cada par, transmitido somente pela mãe e, portanto, pouco

viáveis; assim deve-se duplicar a informação deste indivíduo resultante pelos métodos descritos, pela inibição da 2ª divisão meiótica (Figura 3 A) ou evitando-se 1ª divisão mitótica do zigoto (Figura 3 B).

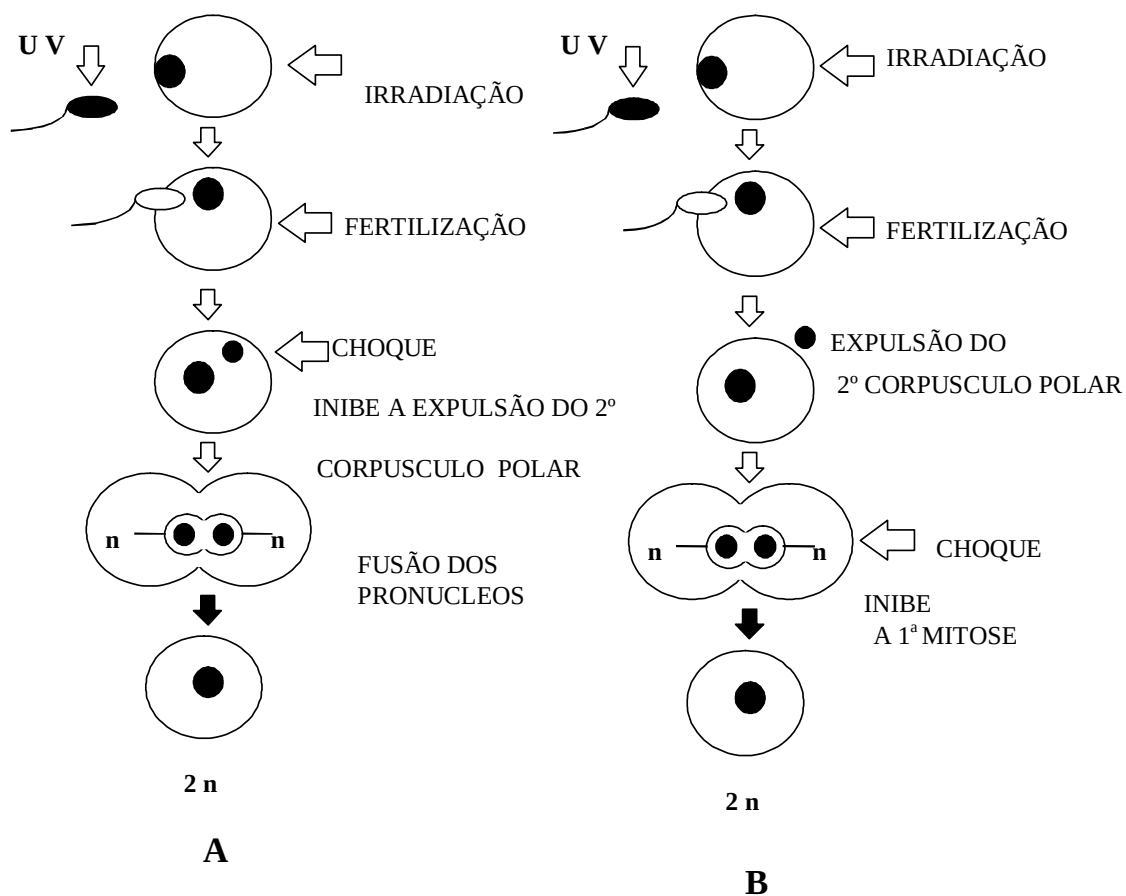


Figura 3. Processo de obtenção de indivíduos ginogenéticos diplóides inibindo a saída do segundo corpúsculo polar (A) e suprimindo a primeira mitose (B) (Carrillo, 2001).

8. Indução de Androgenéticos

É uma técnica oposta a da ginogênese, onde todos os cromossomos de um verdadeiro androgenético são de origem paterna (HORVATH & ORBAN, 1995).

O interesse neste procedimento tem sido a possibilidade de se produzir parentais machos homogaméticos (YY), conhecidos como "supermachos", os quais, ao serem cruzados com fêmeas normais (XX), terão uma descendência de indivíduos 100 % machos normais (XY) (CARRILLO & CHACON, 1995; MARENGONI & ONOUE, 1998; SHELTON, 2002). Isto se obtém mediante a alteração do genoma materno por meio de radiação e a diploidização do zigoto, impedindo a 1ª divisão mitótica.

Por conseguinte, a androgênese é utilizada em espécies de peixes nas quais prefere-se cultivar os machos por apresentarem um maior crescimento em relação às fêmeas (CARRILLO & CHACÓN, 1995). Para realizar este procedimento é necessário se levar em consideração que a espécie escolhida deve apresentar sistema de determinação de sexo onde os machos são heterogaméticos (XY) (SHELTON, 2002).

A principal preocupação em se utilizar este procedimento é o uso da radiação para inativar os cromossomos dos ovócitos porque o DNA mitocondrial, o RNA mensageiro (mRNA) e outros componentes do citoplasma desta célula também podem ser alterados como o DNA cromossômico.

Isto ocorre de tal maneira que, eliminando a expressão do genoma materno e duplicando a informação no indivíduo haplóide, mediante a aplicação de um choque térmico físico ou químico, obtém-se indivíduos androgenéticos diplóides homogaméticos (Figura 4) (CHOURROUT, 1984; MAY et al., 1988; MYERS, et al., 1995; MARENGONI & ONOUE, 1998; KARAYUCEL & KARAYUCEL, 2003).

Outra maneira de se obter indivíduos androgenéticos baseia-se na fertilização de ovócitos cujo material genético tenha sido alterado pelos métodos acima descritos, como no caso de espermatozóides de machos tetraplóides, os quais tem uma composição genética diplóide e, por conseguinte os indivíduos resultantes deste cruzamento serão diplóides normais (TOLEDO et al., 1996).

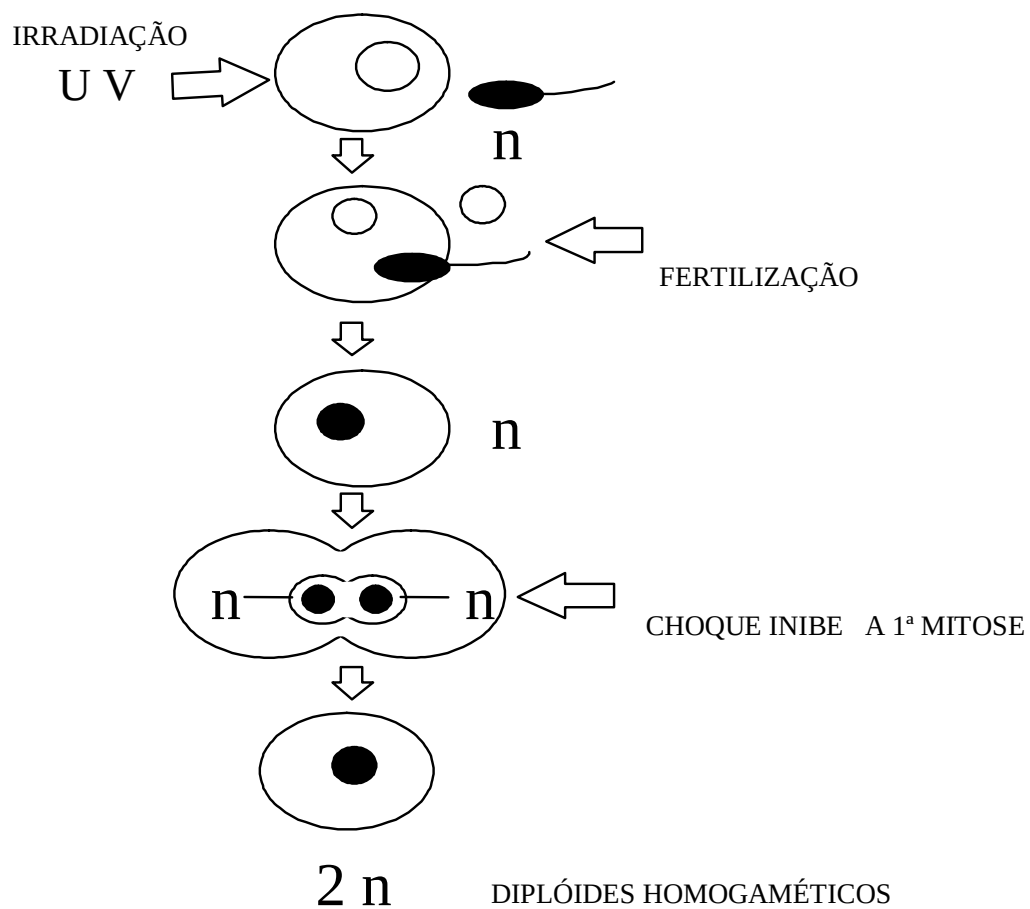


Figura 4. Processo de obtenção de Indivíduos androgenéticos diplóides homogaméticos (Carrillo, 2001).

9. REFERÊNCIAS

Bardach, J.; Ryther, J.; McLRNAey, W. **Acuicultura. Crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce.** AGT editores S.A. México. 288-315 p. 1986.

Byamungu, N.; Darras, V.M.; Kuhn, E.R. Grow of heat shock induced triploids of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in tanks and in ponds in Eastern Congo: feeding regimes and compensatory growth response of triploid females. **Aquaculture** 198: 109-122. 2001.

Carrasco I.A.; Penman, D.J.; Bromage, N. Parámetros morfométricos de interés comercial en trucha arcoiris triploide, *Oncorhynchus mykiss*. <http://155.210.53.23/N2/paramTAI.htm> (14 Oct. 1999).

Carrillo, M & Chacón, M. **Ensayo de androgénesis diploide en tilapia roja mediante manipulación cromosomal.** Tesis de grado. Facultad de biología marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, 1995.

Carrillo, M. **Manipulación cromosómica aplicada a la piscicultura.** 233- 243 p. En: Rodríguez, H., P. Victoria e M. Carrillo (Eds). **Fundamentos de Acuicultura Continental.** Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, INPA. Bogotá, Colombia. , Segunda edición, 423p. 2001.

Castillo, L F. Introducción y cultivo de la tilapia roja en Colombia. Memorias IV reunión regional de acuicultura. COLCIENCIAS y Red Regional de Acuicultura. “ Investigación y desarrollo tecnológico en acuicultura”. 45-48 p. 1992.

Celis, C. & Martinez, H. **Análisis de crecimiento y viabilidad entre monocultivos de poblaciones diploides y triploides de tilapia nilótica (O.**

niloticus). Tesis de Grado. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 152 p. 1993.

Chaparro, N. **Reproducción artificial y manipulación genética en peces**. Editorial Mejoras. Barranquilla. 208p. 1994.

Cherfas, N.B.; Hulata, G; Kozinsky, O. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in ornamental (koi) caro, *Cyprinus carpio* L. 2. Timing of heat shock during the first cleavage. **Aquaculture**, 111: 281-290. 1993.

Chourrout, D. Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm. **The Journal of Exp. Zoology**, 223 : 175-181. 1982.

Chourrout, D. Pressure-induced retention of second polar body and supression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. **Aquaculture**, 36 : 111-126. 1984.

Chourrout, D. Genetic manipulations in fish: Review of methods. **EIFAC/FAO Symposium Bourdeaux** may 27 - 30. 20 p. 1986.

Dunham, R. Production of monosex or sterile fishes in **Aquaculture**. **Aquat. Sci.**, 2: 1-17. 1990.

El Gamal, A.A.; Davis, K.B.; Jenkins, J.A.; Torrains, E.L. Induction of triploid and tetraploid in nile tilápia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of the Wold Aquaculture Society** 30: 269-275. 1999.

Espejo, C. & Torres, E. **Cultivo de las tilápias roja (*Oreochromis spp.*) y plateada (*Oreochromis niloticus*)**. 283-299 p. En: Rodríguez H.; P. Victoria y M.

Carrillo (Eds). Fundamentos de Acuicultura Continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, INPA. Bogotá, Colombia. , Segunda edición, 423p. 2001.

Felip, A.; Zanuy, S.; Carrillo, M. Piferrer, F. Producción de triploides de lubina y estudio de su crecimiento en juveniles. **VI Congreso Nacional de Acuicultura**. Cartagena, España. 1997.

Felip, A.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Piferrer, F. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first two years of age. **Aquaculture**, 173: 389-399. 1999.

Gervai, J.; Peter, S.; Nagy, A.; Horvath, L.; Csanyi, B. Induced triploid in carp *Cyprinus carpio* L.. **J. Fish. Biol.** 17 : 667-671. 1980.

Graham, A. Genetic of fish: A summary of discussion. **Aquaculture**, 33: 383-394. 1983.

Guerrero, R. Use of androgens for the production of all-male *Tilapia aurea* (Steindachner). **Transaction of the American Fisheries Society** 2: 342-348. 1975.

Guerrero, R. D. III. Control of tilapia reproduction. 309-316 p. In Pullin, R.S.V. e Mc Connell (eds). The biology and culture of tilapias. **ICLARM Conference Proceedings 7**, 432p. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 1982.

Hepher, B. & Pruginin, Y. Tilapia culture in ponds under control conditions, 185-203 p. In Pullin, R.S.V. e Mc Connell (eds). The biology and culture of tilapias. **ICLARM Conference Proceedings 7**, 432p. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 1982.

Hepher, B. & Pruginin, Y. 1989. **Tilápia. Cultivo de peces tropicales**. Ed. Limusa. México. 63-69.

Herbst, E.C. **Induction of tetraploidy in Zebrafish *Danio rerio* and Nile Tilapia *Oreochromis niloticus***. Master Thesis. B.A, University of North Carolina at Charlotte. 2002.

Horvath, L.; & Orbán, L. Genome and gene manipulation in the common carp. **Aquaculture**. Vol. 129 (1-4) 157-181. 1995.

Hulata, G. Genetic manipulations in Aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genética**. 111: 155-173. 2001.

Hussain, M.G.; Penman, D.J.; McAndrew, B.J.; Johnstone, R. Supression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. – a comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shock . **Aquaculture**, 111: 263-270. 1993.

Karayucel, I.; & Karayucel, S. Optimisation of UV treatment duration to induced haploid androgenesis en the nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Turk. **J. Vet. Anim. Sci.** 27: 401-407. 2003.

López, C. & Toro, M. **Mejora genética de peces y moluscos**. Ediciones Mundiprensa. Madrid. 107p. 1990.

Lozano, R.; Ruiz, C.; Ruiz, M. **Manipulación cromosómica en organismos acuáticos**. 215-246 p. En: . J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds.). **Genética en acuicultura**. CAYCIT. Madrid. 1987.

Mair, G.C. Chromosome-set manipulation in tilapia – techniques, problems and prospects. **Aquaculture**, 111: 227-244. 1993.

Marengoni, N.G. & Onoue, Y. Ultraviolet – Induced Androgénesis in Nile Tilápia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid nile x blue tilápia, *O.aureus* (Steindachner). **Aquaculture research**, 29, 359-366. 1998.

May, B.; Henley, K.J.; Krueger, C.C.; Gloss, S.P. Androgenesis as a menchanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, 75: 57-70. 1988.

Myers, J. Tetraploids induction in *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, 57 : 281-287. 1986.

Myers, J.M.; Penman, D.J.; Rana, K.J.; Bromage, N.; Powell, S.F.; McAndrew, B.J. Applications of induced androgenesis with tilápia. **Aquaculture** 137: 149-160. 1995.

Myers, J. Appying Chromosome Manipulatiion to Tilápia Species. <http://www.Aquaculture.stir.ac.uk/Rep&Gen/RepArt.html> (05/08/03).

Pandian, T. & Varadaraj, K. Techniques for producing all-male and all-triploid *Oreochromis mossambicus*, 243-249 p. In Pullin, R.S.V., T. Bhukaswan, K. Tonguthai and J.L. Maclean (eds). **The second International Symposium on Tilápia in Aquaculture**. Department of fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. . ICLARM Conference Proceedings 15, 263p. 1988.

Pandian, T. & Varadaraj K. Techniques to produce 100% male tilápia. N.A.G.A. **The ICLARM. Quaterly** 13 (3): 3-17. 1990.

Pérez, J.E. **Mejoramiento Genético en Acuicultura**. Universidad de Oriente. Instituto Oceanográfico de Venezuela. 1996.

Pérez, J.E. & Beaumont, A. Mejoramiento genético en acuicultura. **Red Regional de Acuicultura de América Latina**. mayo-agosto. 4 (2): 5 - 13. 1990.

Piferrer, F.; Felip, A. Blazquez, M. Control genético y fisiológico de las proporciones de sexos de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. **Aulas del mar**. Universidad de Murcia. 75-109 p. 1995.

Purdom, C. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. **Heredity**, London, 24 : 431-444. 1969.

Purdom, C . Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. **Aquaculture**, 33 : 287-300. 1983.

Scott, A. G.; Penman, D.J.; Beardmore, J.; Skibinski, D.O.F. The "YY" supermale in *Oreochromis niloticus* (L) in its potential in Aquaculture. **Aquaculture**, 78: 237-251. 1989.

Shelton, W.L. **Monosex Tilapia Production through Androgenesis**. In: K. McElwee, K. Lewis, M. Nidiffer and P. Buitrago (Editors), Nineteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp 1-9. 2002.

Tave, D. Genetics and breeding of tilapia: A review. p. 285-293. In R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai and J.L. Maclean (eds). The second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. **ICLARM Conference Proceedings 15**, 263p. Department of fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines. 1988.

Tave, D. Chromosomal manipulation. **Aquaculture magazine**, 16 (1): 62-65. 1990.

Thorgaard, G. Ploidy manipulation and performance. **Aquaculture**, 57 : 57-64. 1986.

Toledo, S.; Foresti, F.; Foresti, L. **Cuadernos de Ictiogenética. Biotecnología genética aplicada a piscicultura**. Universidad de Sao Paulo. 55 p. 1996.

Torres, E. **El cultivo de la mojarra plateada (*Oreochromis niloticus*) y la mojarra roja (*Oreochromis sp.*)**. 193-205 P. Em: Rodríguez, H., G. Polo e G. Salazar (Eds). Fundamentos de Acuicultura Continental, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, INPA. Bogotá, Colômbia. Primera edición, 286 p. 1993.

Valenti, R.. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. **J. Fish. Biol.** 7 : 519-528. 1975.

Váradi, L.; Benkó, I.; Varga, j.; Horváth, L. Induction of diploid gynogenesis using interspecific sperm and production of tetraploid in African catfish, *Clarias gariepinus*. 1999.

Wohlfarth, G. & Wedekin, H. The heredity of sex determination in tilápias. **Aquaculture**, 92: 143-156. 1991.

Wohlfarth, G. Genetics of fish: Application to warm water fishes. **Aquaculture**, 33 : 373-381. 1983.

Yamazaki, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, 33: 329-354. 1983.

Zanuy, S.; Carrillo, M.; Felip, A.; Rodríguez, L.; Blázquez, M.; Ramos, J.; Piferrer, F. Genetic hormonal and enviromental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture** 202: 187-203. 2001.

INDUÇÃO Á TETRAPLOIDIA EM TILÁPIA NILÓTICA, *Oreochromis niloticus* UTILIZANDO-SE CHOQUE TÉRMICO

RESUMO

A indução à tetraploidia em tilápia do Nilo foi realizada mediante a aplicação de choques térmicos quentes a uma temperatura de 41° C, utilizando-se três tempos pós-fertilização (P.F.). No 1º ensaio, utilizaram-se tempos de P.F. de 50, 55 e 60 minutos e duração de 2 e de 5 minutos e no 2º de 24, 27 e 30 minutos, com duração de 5 e de 8 minutos. Para a coleta dos gametas, somente as fêmeas que apresentaram características secundárias de maturação foram induzidas artificialmente, por meio de injeções intramusculares com Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG). Os machos não foram induzidos pela facilidade na liberação do sêmen. Depois da aplicação dos tratamentos os animais foram mantidos até os quatro meses de idade momento no qual, foi comprovada a eficácia dos tratamentos mediante a contagem do número de cromossomos em preparações mitóticas '*in vivo*' de células de rim e a cultura "*in vitro*" de linfócitos. Foram encontradas diferenças significativas ($P < 0.05$) nos tempos de duração do choque para os dois ensaios, em relação à estimativa das taxas de sobrevivência as quais foram inversamente dependentes da temperatura. O resultado das análises da contagem de cromossomos em todos os tratamentos, mostrou um número modal normal diplóide ($2n=44$), indicando que a não obtenção de tilápias tetraploides deva-se provavelmente à idade dos animais em que foi feita as provas.

Palavras-Chave: Choque térmico, Manipulação, Tetraploidia, , Tilápia.

INDUCTION OF THE TETRAPLOID IN NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus* THROUGH MEANS OF HOT THERMAL SHOKS

ABSTRACT

The induction of the tetraploid in Nile tilapia was carried through means of application of hot thermal shoks to a temperature of 41,0 °C, using it three times after-fertilization (A.F.). On the 1º assay A.P., times of 50, 55 and 60 minutes have been used and duration of 2 and 5 minutes and on the 2º of 24,27 and 30 minutes, with duration of 5 and 8 minutes. For the collection of gametes, the females that preented secondary characteristics of maduration had only been induced artificially, by means of intramuscular injections with Human Gonadotrophin Corionic (HCG). The males had not been induced for the easiness on the release of the milt. After the application of the treatments the animals were kept until four mounts of age moment in which, was proven the effectiness of the treatments by the counting of the number of chromosomes in mitotic preparations “in vivo” of kidney cells and culture “in vitro” of limphocytes.

Significant differences in the times of duration of the shoks for the two assays had been found, in relation to the estimate of the survival taxes which had been inversely dependents on the temperature. The result of the analysis of the counting of chromosomes in all treatments, showed a normal diploid modal number (2n: 44), indicanting that the not attainment of tetraploids tilapias must be probably due to the animals on which the tests were made.

Keywords: Manipulation, Tetraploid , Termal shoks, Tilápia.

INTRODUÇÃO

A tilápia nilótica tem demonstrado ser um animal que em condições adequadas de manejo, atinge valores apropriados de conversão alimentar aparente, alta produtividade, crescimento e reprodução em condições de cativeiro (GUERRERO, 1982).

No entanto, as fêmeas de tilápia destinam parte de sua energia ao processo de reprodução, produzindo rapidamente uma superpopulação competindo por espaço e alimento, afetando negativamente o rendimento do lote (TORRES, 1993; EL GAMAL et al., 1999; HERBST, 2002). Por isto, o criador tem preferido os cultivos com tilápia nilótica estéreis ou monosexo de machos gerando uma produção maior e melhores rendimentos (FELIP et al., 1999).

Para produzir populações monosexo de machos têm-se utilizado técnicas de seleção, de melhoramento genético ou de manipulação cromossômica. Estas últimas são utilizadas basicamente em algumas espécies de peixes (trutas, carpas e tilápias) por apresentarem fertilização externa, facilitando a manipulação e fertilização *“in vitro”* dos gametas. (HORVATH & ORBAN, 1995; TOLEDO et al., 1996; SHELTON, 1998; 1999; 2000; RUIZ, 1999; HULATA 2001, HERBST, 2002).

As técnicas para se alterar o número cromossômico em peixes envolvem a produção de organismos como os poliplóides (triplóides $3n$, tetraplóides $4n$, etc.) ou aqueles descendentes que se desenvolvem a partir de um só progenitor, ou seja, da mãe (ginogenéticos) ou pai (androgenéticos) (CHOURROUT 1982, 1984, 1986; GRAHAM, 1983; WOHLFARTH, 1983; YAMAZAKI, 1983; THORGAARD, 1986; LOZANO et al., 1987; LÓPEZ & TORO, 1990; CHAPARRO, 1994; CARRASCO et al., 1999; HERBST, 2002).

Entende-se por poliploidia um dos tipos de variações numéricas que afetam o conjunto dos cromossomos das células, aumentando ou diminuindo o complemento de cromossomos presentes em cada uma delas (VALENTI, 1975; THORGAARD, 1986; TAVE, 1990; CELIS & MARTINEZ, 1993; HORVATH & ORBAN, 1995, HERBST, 2002).

Para se obter um organismo poliplóide é necessário controlar a 2ª divisão meiótica, ou seja, impedir a eliminação do 2º corpúsculo polar ou suprimir a 1ª clivagem que se obtém inibindo a 1ª mitose. A indução a poliploidia pode se obtida através de métodos físicos, como são os choques térmicos quentes e frios e os choques de pressão (GERVAI et al., 1980; PURDOM, 1983; CHOURROUT, 1984, 1986; MYERS, 1986, 2003; DUNHAM, 1990; TAVE, 1990; MARENGONI & ONOUE, 1998; BYAMUNGU et al., 2001; HULATA, 2001; SHELTON, 2002) e por métodos químicos, como a imersão dos ovos em citocalasina B, a colchicina, caseína e o azul de toluidina, etc. (THORGAARD, 1986; PEREZ & BEAUMONT, 1990; TAVE, 1990).

Os indivíduos tetraplóides são aqueles que tem o dobro da dotação cromossômica normal ($2n$), entendendo que um animal “normal” herda um conjunto cromossômico do pai e o outro da mãe. Não se tem encontrado indivíduos tetraplóides em ambientes naturais. No entanto, a duplicação do genoma diplóide pode ter ocorrido durante a filogênese, conduzindo à formação de novas espécies (HORVATH & ORBAN, 1995). HERBST (2002) encontrou indivíduos tetraploides espontâneos em *Misgurnus anguillicaudatus* e tetraploides em carpas, resultantes de hibridização.

Para a obtenção de indivíduos tetraplóides, a indução se obtém consegue mediante a aplicação de choques térmicos ou de pressão momentos antes que ocorra a 1ª divisão mitótica no zigoto, que é denominado como choque tardio. Assim, cada cromossomo se replica e ocorre a fusão dos dois núcleos diplóides dentro da mesma célula, o que faz com que o complemento cromossômico aumente de $2n$ para $4n$ (PURDOM, 1983; MYERS, 1986; TAVE, 1990; CHERFAS et al., 1993; HUSSAIN et al., 1993; HORVATH & ORBAN, 1995; MYERS et al., 1995; MARENGONI & ONOUE, 1998; VARADI et al., 1999).

A importância dos indivíduos tetraploides na aquicultura deve ser enfatizada pelo fato poderem ser utilizados como organismos parentais, devido a sua fertilidade, em cruzamentos com diplóides (ou normais), para a obtenção de animais triplóides (conhecidos como interplóides triplóides) que são estéreis, eliminando a

necessidade de se produzir estes últimos por meio do método dos choques físicos (VALENTI, 1975; TAVE, 1990; MAIR, 1993; EL GAMAL et al., 1999, SHETON, 2002).

O presente trabalho foi desenvolvido com tilápia-do-Nilo, ***Oreochromis niloticus***, tendo-se, inicialmente como objetivo testar os diferentes tempos de pós-fertilização e duração dos choques térmicos quentes e, avaliar a produção de indivíduos tetraplóides do lote experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor da reprodução de peixes do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), campus Jaboticabal, S.P., Brasil , durante o período compreendido entre os meses de abril e dezembro de 2003.

Reprodutores

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 50 fêmeas e 30 machos adultos de tilápia nilótica (*O. niloticus*), com médias de peso variando de 150,0 a 250,0 gramas, mantidos separados por sexos em 5 caixas de cimento-amianto com capacidade de 1000 l., dispostas em um sistema de circulação aberto, com renovação contínua de água e aeração permanente, mantendo-se temperatura média acima de 27,0 °C.

A alimentação fornecida *ad libitum* foi ração balanceada com 32 % de proteína bruta, oferecida uma vez ao dia, durante seis dias por semana.

Seleção dos Reprodutores

As fêmeas examinadas e selecionadas foram aquelas que apresentavam características secundárias de maturação como abdome abaulado e abertura e/ou coloração da papila genital. De cada fêmea foram avaliadas amostras de ovócitos para se determinar o grau do desenvolvimento (HARVEY & HOAR, 1980).

As amostras dos ovócitos foram retiradas por meio de compressão abdominal e fixadas em uma solução de etanol-formol e ácido sulfúrico (60:39: 1) (CELIS & MARTINEZ, 1993) que permitiram a visualização da posição do núcleo ou vesícula germinativa (BRUZKA, 1979; CONTRERAS & CONTRERAS, 1993). Somente as fêmeas que apresentavam aproximadamente 70 % dos ovócitos com núcleo em posição excêntrica foram induzidas à reprodução artificial.

Os machos foram selecionados aleatoriamente no momento da fertilização, devido à facilidade na liberação de sêmen, obtido através de compressão abdominal.

Indução Hormonal

As fêmeas selecionadas foram induzidas artificialmente à reprodução, por meio de injeções intramusculares de Gonadotrofina Coriônica Humana, hormônio HCG - PREGNYL (ORGANON DO BRASIL - 5000 IU) (Figura 1), utilizando-se uma dose total de 5,0 UI por grama de peso de peixe, dividida em duas injeções; a primeira correspondendo a 10 % na hora zero e a segunda de 90 % aplicada 18 horas após a 1ª dose (Figura 2). Os machos foram retirados da água e envoltos em um pano para secá-los e evitar assim a ativação do sêmen pela água. Uma vez secos, realizaram-se leves massagens abdominais nos animais tomando-se o cuidado para que não ocorresse liberação de urina junto ao sêmen.

Coleta dos Gametas

Os ovócitos foram obtidos por massagem abdominal, com um suave movimento com as mãos na direção antero-posterior do corpo do animal, 24 horas após a última dose (CARRILLO & CHACÓN, 1995) sendo verificada a posição do núcleo ou vesícula germinativa onde se pôde notar que 100 % dos ovócitos apresentavam núcleos periféricos. A seguir, os ovócitos foram colocados em bacias plásticas limpas e secas (Figura 3).

O sêmen de um o mais machos foi previamente coletado momentos antes da extrusão dos ovócitos, com a finalidade de minimizar o tempo entre a extrusão dos ovócitos e a fertilização (HERBST, 2002) (Figura 4).

Fertilização Artificial

Os ovócitos de uma única fêmea foram usados para cada réplica. No momento da fertilização, 2,0 ml de sêmen, previamente retirado, foi diluído e ativado em uma solução de 2,0 ml de NaCl (0,9%) : água (1:1). Esta solução foi adicionada sob os ovócitos, quando foi registrado o tempo zero ou inicial. Os ovócitos e o sêmen foram homogeneizados durante 2 minutos (Figura 5). Logo após este tempo, realizaram-se várias lavagens com água corrente para eliminar o excesso de sêmen.

A seguir, o conjunto de ovos foi dividido ao acaso em 7 porções iguais para a formação dos grupos de tratamento (6 grupos e o grupo controle) e transferidos para o sistema de pré-incubação. A temperatura da água foi mantida constante a 28,0 °C, com aquecedor (Atman AT-100W) e verificada com um termômetro de vidro de 76 mm, -10 a 60 °C (Incoterm). Cada grupo de ovos foi colocado em uma peneira de plástico de 5,0 cm de diâmetro onde permaneceram até o tempo de aplicação do choque térmico estabelecido (Figura 6).

Indução à Poliploidia

Na Tabela 1 encontram-se os dados dos tratamentos aplicados, com informações sobre o tempo decorrido pós-fertilização dos ovos (P.F.) para a aplicação do choque térmico, a duração do choque térmico aplicado e a técnica comprobatória utilizada nos dois ensaios.

Uma vez transcorrido o tempo em cada tratamento de P.F., as peneiras que continham os grupos de ovos foram rapidamente submetidas a um banho-maria (41°C), durante os tempos estabelecidos (Tabela 1) (Figuras 7 e 8). Transcorridos os tempos estabelecidos para os tratamentos de choque térmico, os ovos foram devolvidos para o sistema de pré-incubação (28 °C).

Tabela 1. Tempos Pós-fertilização (P.F.), tempos de duração e técnica de comprovação utilizados em cada um dos ensaios realizados para obtenção de tetraploidia em Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*

ENSAIO	CHOQUE APLICADO (min P.F.)	DURAÇÃO (min)	TÉCNICA DE COMPROVAÇÃO
1º	0 (Controle)	0	Cultura de
	50- 55- 60	2 -5	linfócitos - RONS
2º	0 (Controle)	0	Cromossomos
	24 – 27 - 30	5 – 8	Mitóticos <i>in vitro</i> - RONS

Incubação dos Ovos.

Após os tratamentos indutores de poliploidia, os ovos foram retirados das respectivas peneiras (pré-incubação) e levados para incubadoras de forma cônica em sistema de circulação fechada com fluxos de água descendentes, renovação constante e temperatura da água controlada (28,0 °C) (Figuras 9 e 10).

Os ovos não eclodidos foram retirados diariamente, até o momento da eclosão, ou seja, até o 4º dia P.F. Neste momento foi estimada a porcentagem de larvas eclodidas.

Larvicultura e Pré-engorda

A partir do 5º dia de eclosão, as larvas receberam alimento finamente moído com 38 % de P. B. e *Artemia salina*, até que ocorresse a reabsorção total do saco vitelinico e que as mesmas tornassem independentes ou nadassem livremente. Quando as larvas atingiram aproximadamente 10 mm de comprimento total, foram transferidas para os tanques-rede de 81,0 l (0,6 m x 0,3 m x 0,45m), onde receberam alimento duas vezes ao dia *ad libitum*, na forma de ração moída de 32 % de P.B. (Figuras 11 e 12).

Determinação da Poliploidia

Para a comprovação da eficácia da indução de tetraploidia foi utilizada a técnica da contagem do número de cromossomos em uma amostra de no mínimo 30 % do número de animais por tratamento. Para isto foi utilizada a metodologia de cultura “*in vitro*” de linfócitos proposta por CAMACHO & BURBANO (1999) e a técnica de preparações de cromossomos mitóticos “*in vivo*” (FORESTI et al., 2003). Para corroborar os resultados foi utilizada a técnica de localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo – RONS (HOWELL & BLACK, 1980 em FORESTI, 2003).

Somente após um período de quatro meses (período pré-engorda) foi possível a aplicação de tais técnicas, pois os peixes deveriam atingir um tamanho que permitisse a retirada de amostra de sangue da veia caudal ou órgãos como, rim e fígado.

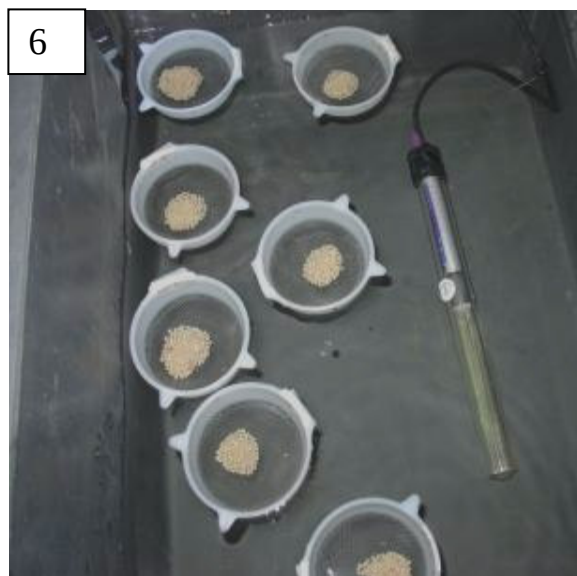
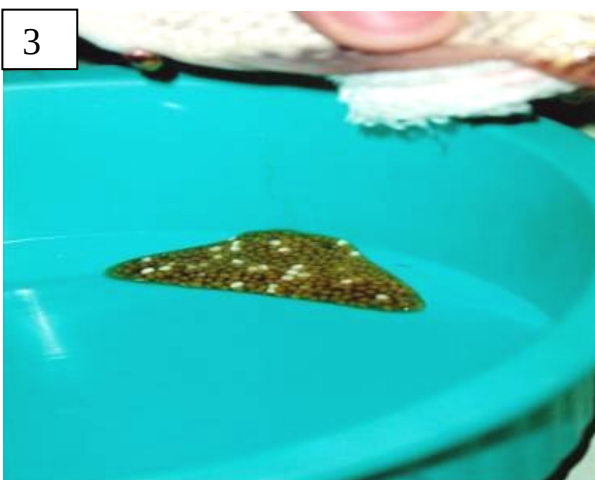
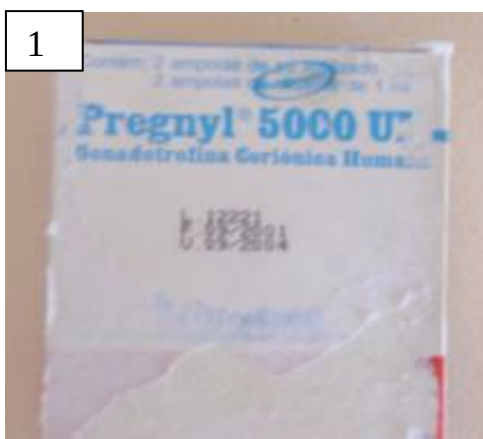
Para estabelecer o número modal de cromossomos foram analisadas no mínimo 30 metáfases por lâmina, nas quais foi possível identificar o par número um do complemento ou contar a totalidade dos cromossomos.

Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados, com 6 tratamentos no esquema fatorial 3 x 2, composto por 3 tempos P.F. e 2 tempos de choque térmico e um grupo controle.

O 1º ensaio contou com duas réplicas e o 2º com quatro. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS, versão 8.





RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização da técnica de indução artificial nas fêmeas de tilápias do Nilo com HCG foi efetiva para obter os ovócitos e para aplicar as técnicas de manipulação cromossômica. Estes resultados contrastam com os descritos por RANA (1988), BHUJEL (2000) e SHELTON (1998, 2000, 2002), que mencionaram que as tilápias não respondem positivamente à indução hormonal. Entretanto, pôde-se notar a presença de ovócitos atrésicos no momento da extrusão, comum em tilápias, afetando as taxas de fertilização e eclosão (SHELTON, 1998, 2000).

O uso das peneiras para a aplicação do choque térmico foi eficiente, facilitando o manejo dos grupos e permitindo uma rápida manipulação e transporte dos mesmos entre o sistema de pré-incubação e o banho-maria, concordando com os resultados obtidos por HERBST (2002).

O efeito do choque térmico aplicado (41,0 °C) para os diferentes tempos pós-fertilização (50, 55 e 60 minutos), com duração de 2 e 5 minutos (1º ensaio) e tempos pós-fertilização (24, 27 e 30 minutos), com duração de 5 e 8 minutos (2º ensaio) é apresentado nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Estes tempos coincidem com o início e o final da 1ª mitose (MAIR, 1993) e são similares aos utilizados por MYERS (1986), DON e AVTALION (1988), CARRILLO e CACHÓN, (1995), EL GAMAL et al., (1999) e SHELTON, (2002) para os tempos do 1º ensaio e por MAY, (1988), HUSSAIN (1993), MAIR, (1993), MYERS et al., (1995), MARENGONI e ONOUE (1998), HERBST, (2002) para o 2º ensaio. A variação dos diferentes tempos de aplicação do choque térmico para a produção de poliploidia, ginogênese e androgênese em tilápias refere-se às diferenças entre as espécies e linhagens, interrupção dos processos celulares que resultam na indução da poliploidia, da utilização de diferentes metodologias e do desenvolvimento assincrônico dos ovócitos (HERBST, 2002).

Tabela 2. Médias das porcentagens de fertilização, eclosão e sobrevivência das larvas de Tilápia do Nilo, ***Oreochromis niloticus***, a uma semana do 1º ensaio. Tempo pós-fertilização (Tpf) e Tempo de choque (Tc)

Tratamentos	Fertilização	Eclosão	Sobrevivência
Tpf-Tc	%	%	%
Controle	79,23	44,33	25,42
50-2	75,02	23,92	15,00
50-5	70,03	19,25	14,09
55-2	77,22	23,00	17,59
55-5	81,37	14,59	12,84
60-2	76,59	36,25	20,09
60-5	70,77	26,09	13,42

Tabela 3. Médias das porcentagens de fertilização, eclosão e sobrevivência das larvas de Tilápia do Nilo, ***Oreochromis niloticus***, a uma semana do 2º ensaio. Tempo pós-fertilização (Tpf) e Tempo de choque (Tc)

Tratamentos	Fertilização	Eclosão	Sobrevivência
Tpf-Tc	%	%	%
Controle	68,60	9,92	5,83
24-5	64,03	33,29	18,04
24-8	67,93	11,59	1,49
27-5	67,95	30,65	18,68
27-8	70,53	12,79	5,15
30-5	68,30	36,02	20,25
30-8	71,18	18,60	9,85

Os resultados encontrados nas diferentes fases do processo de desenvolvimento embrionário indicam que as porcentagens de fertilização obtidas nos tratamentos aplicados neste estudo foram similares aos obtidos por MYERS (1986), MARENGONI e ONOUE, (1998), EL GAMAL et al., (1999)), KARAYUCEL e KARAYUCEL, (2003). A diferença entre os tratamentos depende principalmente do estado fisiológico da cada fêmea utilizada e de uma mistura heterogênea dos ovos no momento da fertilização para os respectivos tratamentos (SHELTON, 2002).

Pôde-se observar uma grande mortalidade dos embriões no tempo transcorrido entre o momento da fertilização e a eclosão (Figuras 13 A e B.). Esta mortalidade decresceu entre o momento da eclosão até a primeira semana de vida, mantendo a mesma tendência dentro dos tratamentos. Este fato foi verificado também por HUSSAIN et al., (1993) , MARENGONI & ONOUE, (1998), e SHELTON, (1998).

Na Figura 13 B pode-se observar que o grupo controle apresentou uma porcentagem de eclosão menor que os grupos tratados e com relação ao controle do outro ensaio (Figura 13 A). Neste estudo, as falhas provavelmente se devem ao sistema de incubação utilizado, fato este refletido nas baixíssimas ou nulas taxas de eclosão apresentadas nas réplicas deste grupo.

SHELTON (2000; 2002) sugeriu que a baixa taxa de sobrevivência observada pode ser devida ao fato de que o mecanismo de manipulação da reprodução artificial das tilápias (extrusão dos gametas, fertilização *in vitro* e incubação artificial) pode afetar os índices de mortalidade, quando comparados à incubação natural. Segundo MYERS (1986), a taxa de sobrevivência pode variar até a fase de formação dos olhos. Entretanto, ARAI (2001) descreveu que as técnicas para inibir a 1ª clivagem nos embriões geralmente resultam em baixas taxas de sobrevivência.

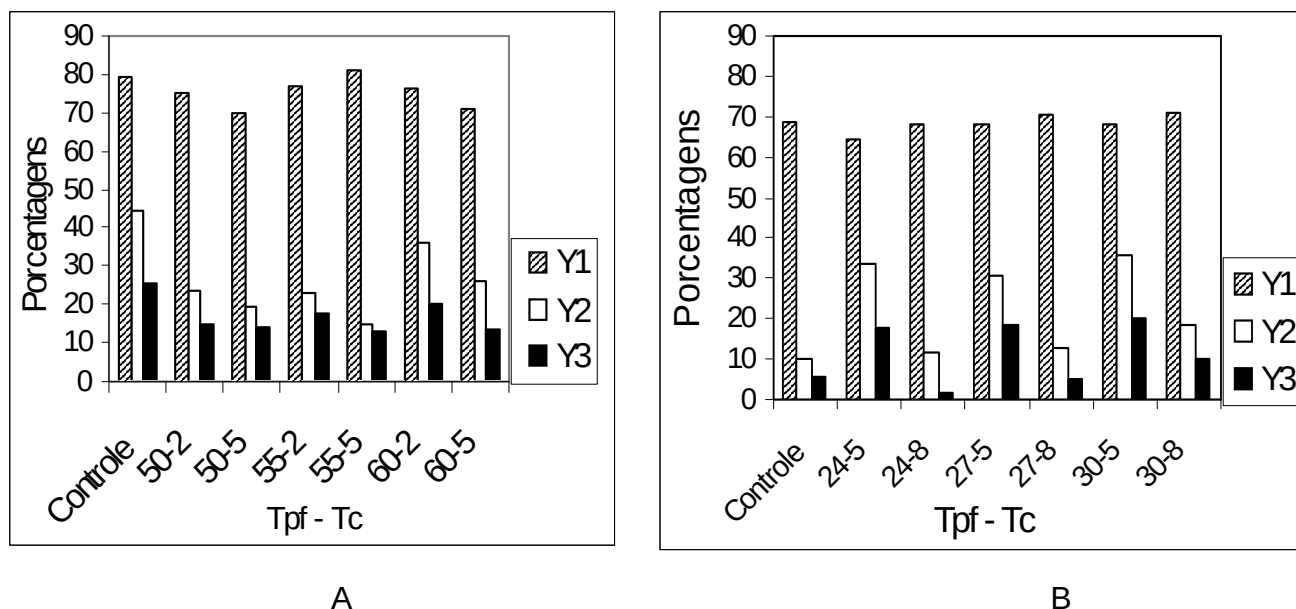


Figura 13. Médias das porcentagens de fertilização (Y1), eclosão (Y2) e sobrevivência das larvas de Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* a uma semana (Y3) do 1º ensaio A e 2º ensaio B. Tempo pós-fertilização (Tp) e Tempo de choque (Tc).

Os valores de F, coeficiente de variação (C.V.) e as médias percentuais das taxas de fertilização (Y1), eclosão (Y2) e sobrevivência das larvas até o 7º dia de vida (Y3) são apresentadas na Tabela 4 (1º ensaio) e na Tabela 5 (2º ensaio). Para o 2º ensaio, os dados das porcentagens médias das taxas de eclosão e sobrevivência das larvas de tilápia do Nilo foram transformados em arcoseno da raiz quadrada.

No 1º ensaio não foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) para os valores médios percentuais das taxas de fertilização (Y1) nos diferentes tratamentos (Tabela 4). Entretanto, no 2º ensaio foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) para esta variável entre as fêmeas utilizadas nos diferentes tratamentos (Tabela 5).

Os valores das médias percentuais das taxas de eclosão (Figura 14 A) indicam que no 1º ensaio houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os blocos, diferenças estas que podem ser atribuídas as fêmeas utilizadas ou ao sistema de

incubação empregado (MYERS, 1986; MAIR, 1993; SHELTON, 2002), ou ainda, à qualidade dos ovos, a qual pode ser um fator determinante no êxito dos ensaios (BORGERS et al, 1994).

Considerando-se as diferenças significativas obtidas entre os grupos controle e os tratamentos, o primeiro apresentou maiores taxas de eclosão e de animais (44,33 %), indicando que o choque térmico pode afetar o desenvolvimento dos ovos. Os tratamentos que foram submetidos ao choque de 2 minutos tiveram um maior número de larvas eclodidas, em comparação ao de 5 minutos. Assim, a medida que o tempo pós-fertilização aumentou, as taxas de eclosão também aumentaram. Entretanto, neste estudo, as diferenças entre o tempo de P.F. e eclosão não foram significativas. (Tabela 4).

O tratamento de 55 – 5 apresentou uma maior mortalidade dos ovos, passando de 81,0 % no momento da fertilização a 14,0 % na eclosão das larvas (Figura 14 A). Os tratamentos de 60 – 2 e 60 – 5 mostraram uma menor taxa de mortalidade neste período, em relação aos outros tratamentos.

No 2º ensaio (Figura 14 B) não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para a porcentagem de eclosão, devido principalmente ao número de réplicas e à grande mortalidade encontrada no grupo controle, o que fez com que os valores das médias deste grupo ficassem no mesmo intervalo. Entretanto, os valores da interação entre os tempos de choque térmico se apresentaram no limite da significância, indicando que o tempo de duração de 8 minutos teve um maior efeito sobre a eclosão das larvas nos diferentes tratamentos.

Em relação às médias percentuais de sobrevivência das larvas para o 1º ensaio (Figura 15 A), igualmente como as taxas de eclosão, estas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os blocos, assim como entre o grupo controle e os tratamentos. O grupo controle (Figura 15 A) manteve a mesma tendência, porém foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tempos de choque, onde o tempo de 2 minutos apresentou um número maior de animais sobreviventes que os de 5 minutos. Da mesma forma, à medida que o

tempo de pós-fertilização aumentou, também houve aumento da taxa de sobrevivência.

No 2º ensaio (Figura 15B), também foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os dois tempos de choque térmico, mostrando que o tempo de 8 minutos apresentou uma maior taxa de mortalidade do que o tempo de 5 minutos.

Estes resultados indicam que a taxa de desenvolvimento é inversamente dependente da temperatura utilizada nos tratamentos de choque térmico (SHELTON, 1998). No entanto, MYERS, (1986), menciona que as variações nas respostas das diferentes variáveis podem ser devidas às características da fêmea e aos efeitos no sistema de incubação (MAIR 1993; SHELTON, 2002), os quais provavelmente confundem a interpretação dos dados obtidos nestes ensaios.

Tabela 4. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias percentuais das taxas de fertilização, eclosão, sobrevivência, em tratamentos com choques térmicos em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Tpf: Tempo de Pós-fertilização, Tc: Tempo de choque, Pr: Probabilidade, Tpf 1: 50 min. Tpf 2: 55 min, Tpf 3: 60 min., Tc 1: 2 min., Tc 2 : 5 min.

ESTATÍSTICA	Variáveis (%)		
	Fertilização (Pr<F)	Eclosão (Pr<F)	Sobrevivência (Pr<F)
F para:			
Bloco	3,50 (0,1106)	37,55 (0,009)*	207,17(<,0001)*
Controle-vs-Fatorial	1,69 (0,2410)	17,46 (0,0058)*	31,02 (0,0014)*
Tpf	3,04(0,1223)	4,09 (0,0757)	0,95 (0,4384)
Tc	0,87 (0,3859)	4,37 (0,0815)	9,39 (0,0221)*
Int Tpf*Tc	1,79 (0,2453)	0,19 (0,8305)	1,59 (0,2793)
CV (%)	5,47	23,97	13,74
Médias para			
Controle	79,29	44,33 ^A	25,42 ^A
Tpf 1	72,55	21,58 ^B	14,54 ^B
Tpf 2	79,29	18,79 ^B	15,21 ^B
Tpf 3	73,68	31,17 ^B	16,75 ^B
Tc 1	76,29	27,72 ^B	17,56 ^{Ba}
Tc 2	74,05	19,97 ^B	13,45 ^{Bb}

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey (P<0.05)

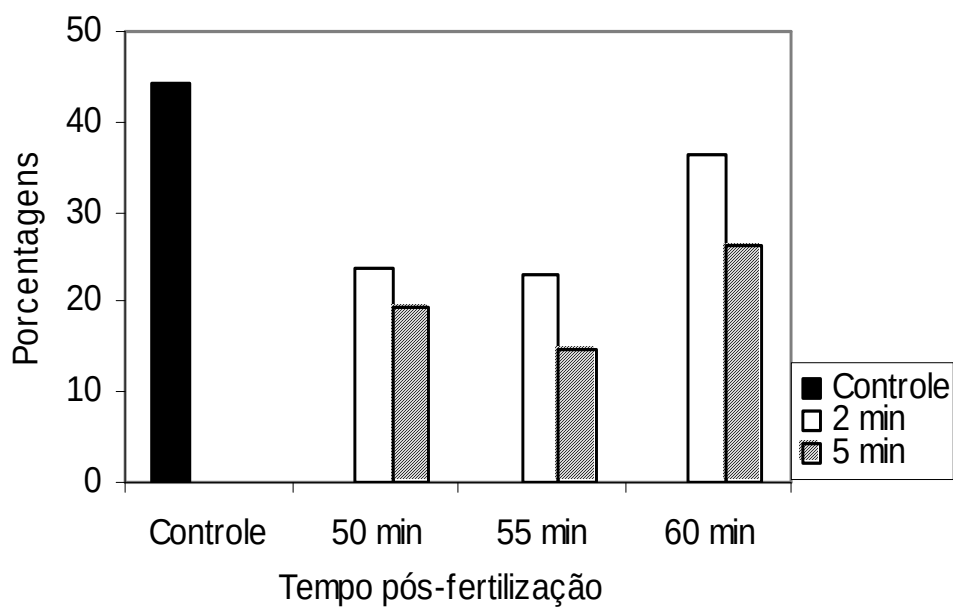
* diferença significativa (P<0.05)

Tabela 5. Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias percentuais das taxas de fertilização (Y1), eclosão (Y2), sobrevivência (Y3), em tratamentos com choques térmicos em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Tpf: Tempo de Pós-fertilização, Tc: Tempo de choque, Pr: Probabilidade, Tpf 1: 24 min. Tpf 2: 27 min, Tpf 3: 30 min., Tc 1: 5 min., Tc 2 : 8 min.

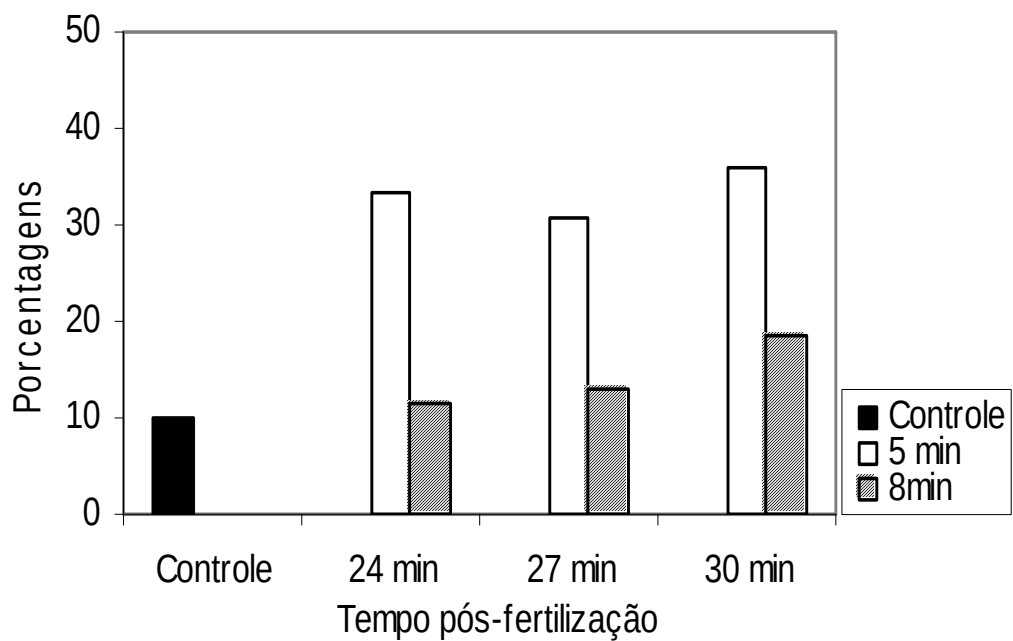
ESTATÍSTICA	Variáveis (%)		
	Fertilização (Pr<F)	Eclosão (Pr<F)	Sobrevivência (Pr<F)
F para:			
Bloco	37,02 (<,0001)*	1,20 (0,1556)	1,96(0,1556)
Controle-vs-Fatorial	0,00 (0,9473)	1,54 (0,2317)	0,83 (0,3733)
Tpf	0,55(0,5886)	1,10 (0,3550)	0,37 (0,6976)
Tc	0,95 (0,3420)	4,28 (0,0542)	6,56 (0,0197)*
Int Tpf*Tc	0,02 (0,9844)	0,53 (0,5973)	0,11 (0,8947)
CV (%)	11,44	25,96	21,10
Médias para			
Controle	68,60	0,63	0,59
Tpf 1	65,98	0,76	0,63
Tpf 2	69,24	0,68	0,65
Tpf 3	69,74	0,83	0,69
Tc 1	66,76	0,84	0,73 ^a
Tc 2	69,86	0,68	0,58 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre pelo teste de Tukey (P<0.05)

* diferença significativa (P< 0.05)

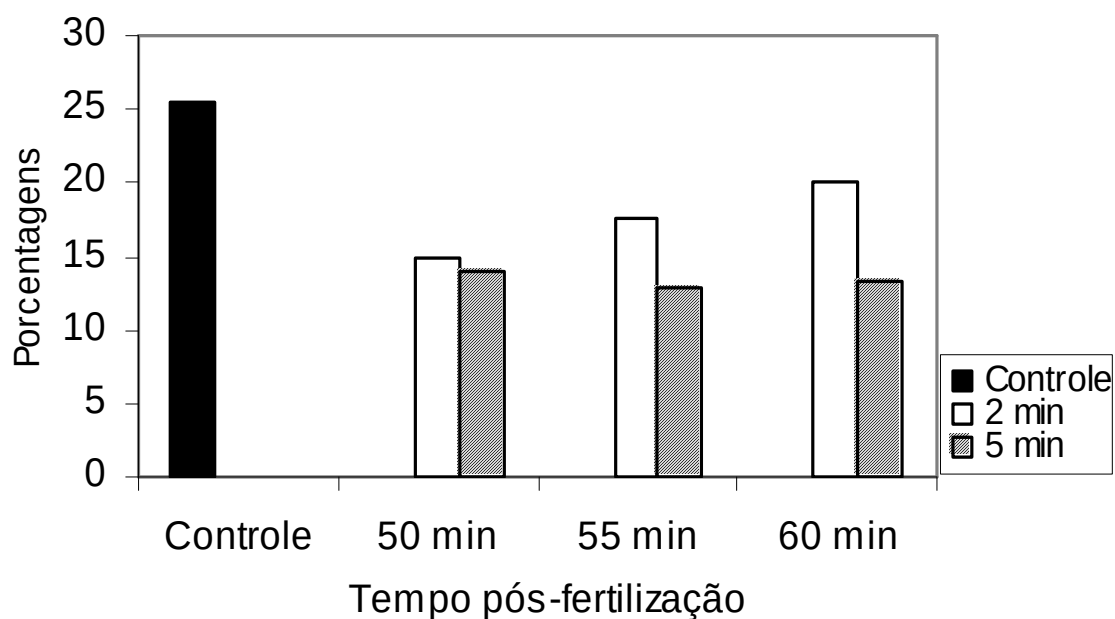


A

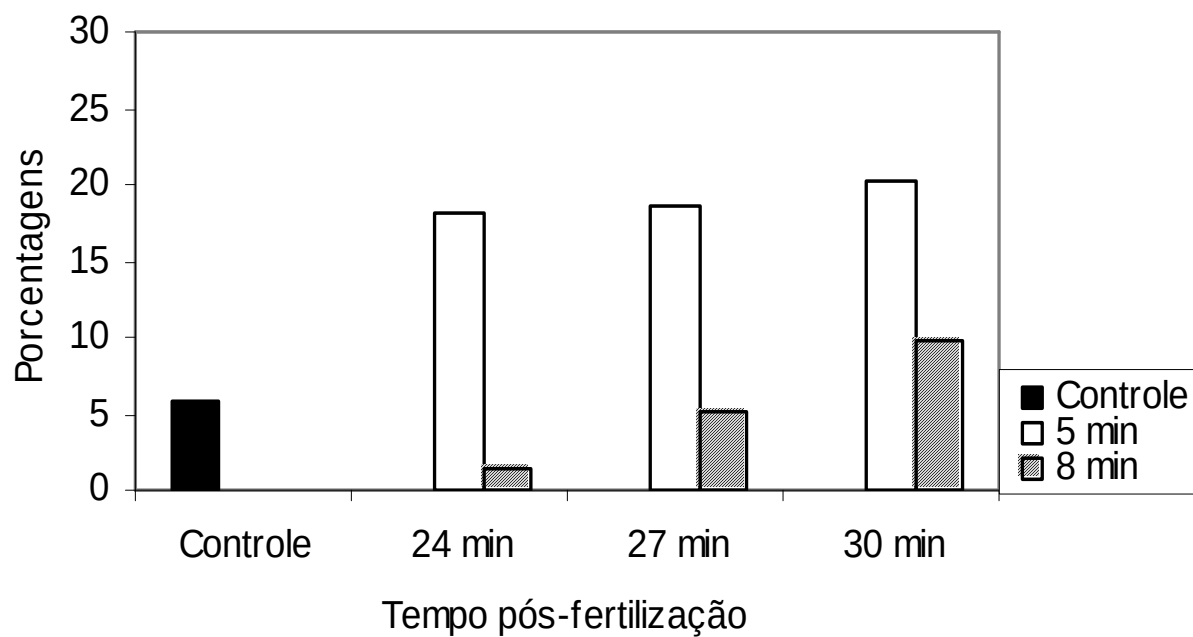


B

Figura 14. Médias percentuais das taxas de eclosão para os diferentes tempos pós-fertilização em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, nos 1º e 2º ensaios (A) e (B).



A



B

Figura 15. Médias porcentuais das taxas de sobrevivência para os diferentes tempos pós-fertilização em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, nos 1º e 2º ensaios (A) e (B).

Cabe ressaltar que algumas larvas ou juvenis de tilápia nilótica resultantes dos tratamentos aplicados apresentaram algum tipo de anomalias ou deformidades, tendo-se verificado alterações bem visíveis. Como alterações notaram-se a mandíbula proctáctil com boca reduzida (Figuras 16 a 18), presença de um único olho (Figura 19), coluna vertebral com curvatura, incompleta ou cuneiforme (Figura 20) assim como, gêmeos siameses (Figura 21). Na Tabela 6 pode-se observar que ocorreram deformidades nos diferentes tempos e nos dois ensaios.

Na literatura consultada também foram registradas ocorrências de anomalias. Entretanto, sabe-se que, estas deformações podem estar associadas a fatores físicos, químicos, nutrição, ambiente e/ou genéticos. Estudos detalhados caracterizando as malformações e suas interações com os fatores acima citados devem ser realizados para melhor entendimento das possíveis causas. PANDIAN & VARADARAJ (1988) e CELIS & MARTINEZ (1993) registraram valores de deformidades variando de 3,45 - 16, 34 % e 5,0 – 10,0 % , respectivamente. Estes autores alertam para o fato de que particular atenção deve ser dada ao “pedigree” dos estoques de reprodutores.

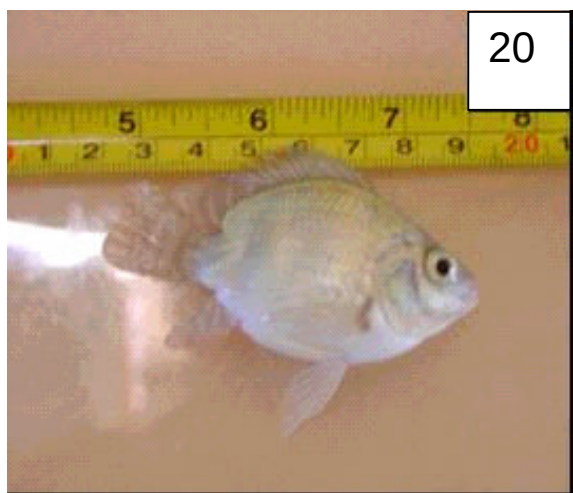
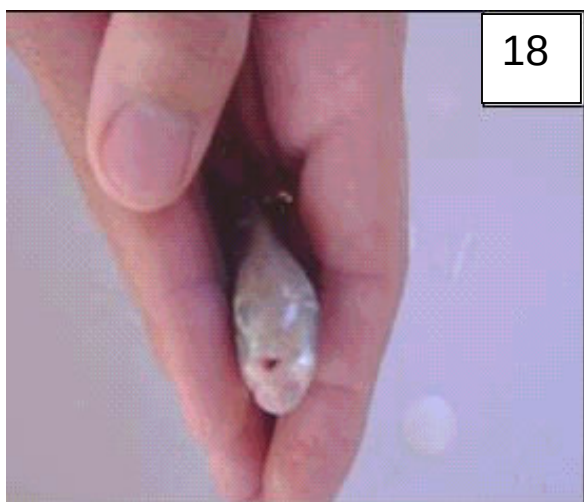
Recentemente, BROWN & NUÑEZ (2003) verificaram que nos peixes têm-se apresentado deformidades físicas como fusão dorsal incompleta ao redor da coluna vertebral (bífida) e erros de segmentação, os quais podem resultar em vértebras fundidas ou fraturas. Os autores consideram que deformidades na coluna podem ser hereditárias ou provenientes de problemas nutricionais ou ambientais agudos. Por exemplo, citam que altas temperaturas da água afetam no desenvolvimento dos sistemas de órgãos dos embriões resultando em problemas críticos na fase inicial da ontogenia e expondo os embriões a altas porcentagens de malformações.

No presente trabalho foi observada a ocorrência de deformidades na região da cabeça (mandíbula e olhos) dos indivíduos. Segundo BROWN & NUÑEZ (2003), estudando larvas de *Hippoglossus hippoglossus*, a presença destas deformidades aumentaram quando os animais foram criados em sistemas intensivos e em altos índices de luminosidade, além dos problemas nutricionais

citados anteriormente. Os autores não registraram relatos de peixes siameses provenientes de ambiente natural. Entretanto, há alguns relatos na literatura descritos em trutas arco-íris e tilápias criadas em laboratório fato este, que eles atribuem a origem genética das matrizes. Há evidências também que, no caso de trutas submetidas a tratamentos com hormônios tireoideanos, ocorreram malformações no momento da reabsorção do saco vitelínico.

Tabela 6. Porcentagens de indivíduos deformados encontrados nos diferentes tratamentos de choque térmico aplicados em embriões de Tilápia do Nilo, ***Oreochromis niloticus*** visando à obtenção de tetraplóides. Tpf: Tempo de Pós-fertilização, Tc: Tempo de choque.

Ensaio	Tratamento	Deformidade
	Tpf-Tc	(%)
Primeiro	50-2	3,26
	55-2	5,41
	55-5	3,70
	60-2	2,78
Segundo	24-5	10,00
	27-5	20,00
	27-8	12,50
	30-5	5,26



Neste estudo, para as comprovações das alterações cromossômicas, os alevinos dos tratamentos foram mantidos durante um período de quatro meses até que atingissem tamanho e peso adequado que permitisse o fácil manjo e a retirada da amostra de sangue de 0,5 mL, para desenvolver a cultura *in vitro* de linfócitos. Outra técnica utilizada também possibilita a obtenção de preparações de cromossomos mitóticos *in vivo* e tem como vantagem ser rápida e utilizar animais menores mas torna necessário sacrificar o animal para a obtenção dos órgãos. A última técnica utilizada, para localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo –RONS – foi utilizada como método de comprovação alternativo e permitiu verificar os resultados obtidos pelas técnicas anteriores. (Figuras 25, 26 e 27).

Os indivíduos submetidos às análises cromossômicas nas diferentes técnicas utilizadas evidenciaram o número modal diplóide normal da espécie, $2n = 44$ cromossomos (Figuras 22 e 23), para todos os tratamentos realizados, corroborando os resultados encontrados por MYERS (1986), DUNHAM (1990), EL GAMAL et al., (1999), SHELTON (2002) e HERBST (2002). Estes autores apesar de terem descrito a produção de animais tetraplóides utilizando diferentes metodologias de comprovação, não encontraram indivíduos poliplóides com mais de uma semana de vida.

Neste estudo pôde-se identificar somente uma única metáfase tetraplóide onde foi possível diferenciar quatro cromossomos que fazem parte do par número um do complemento (Figura 24). Esta metáfase pode ter sido conseguida pela ação da colchicina durante as preparações celulares.

Os tempos pós-fertilização de 50, 55 e 60 minutos utilizados no 1º ensaio para a indução a poliploidia foram similares aos utilizados por EL GAMAL et al., (1999), que constataram a produção de 80 % de indivíduos tetraplóides utilizando dois choques térmicos quentes sucessivos de 41,0 °C, com uma duração de 6 minutos aplicados aos 65 e 80 minutos pós-fertilização.

HERBST (2002) utilizou os mesmos tempos mas não encontrou tilápias tetraplóides e sugere que os exemplares poderiam ter sido produzidos e que morreram antes mesmo de serem avaliados. Segundo o mesmo autor, a indução de tetraploidia pode ser obtida com a aplicação de um choque quente (42,8°C) em

um intervalo de tempo pós-fertilização entre 22 a 28 minutos, resultados estes que concordam com os obtidos por MAIR (1993). Cabe salientar que nestes estudos somente larvas recém-eclodidas foram analisadas mediante a técnica de citometria de fluxo.

SHIRAK, (1996) em SHELTON, (2002) descreve que, com a aplicação de um choque aos 78 minutos pós-fertilização e DON & AVTALION (1988) com um choque frio (11°C) com uma hora de duração e 92 minutos pós-fertilização, obtiveram a produção de tetraplóides em *Oreochromis aureus*. Posteriormente, SHELTON (2002) baseou seu experimento empregando a mesma intensidade de choque frio e testou tempos de 59, 69 e 79 minutos para diploidizar androgenéticos de *Tilápia sp.*

Por outro lado, MYERS et al., (1995) e MARENGONI e ONOUE, (1998) encontraram que um tratamento com choque quente (42,5°C) durante 4 minutos entre 25,0 e 27,5 minutos pós-fertilização é ótimo para se obter a diploidização do genoma na produção de androgênese em tilápias, utilizando-se testes de progênie como método para a comprovação dos tratamentos. Assim, MULLER et al., (1995), para a indução à ginogênese em tilápia nilótica utilizou o choque quente (41,0 °C) durante 6 minutos, iniciando com 25, 30 e 35 minutos pós-fertilização, que foram tempos similares aos utilizados no segundo ensaio deste trabalho..

SHIRAK, (1998) em SHELTON (2002), sugere que o choque frio interfere na divisão celular, enquanto o mecanismo do choque quente tem sido considerado o causador do rompimento das fibras do fuso durante a cariocinese. A diferença entre os choques térmicos (quentes e frios) está no fato de que o quente pode acelerar o desenvolvimento do ovo, não só adiantando o tempo ótimo pós-fertilização, senão também reduzindo o intervalo efetivo para a aplicação dos tratamentos (HUSSAIN, 1993).

Os choques térmicos são considerados como os tratamentos mais adequados para a indução de poliploidia baseados nas porcentagens de indivíduos poliplóides viáveis produzidos e sua sobrevivência (FLAJSHANS et al., 1993; HUSSAIN et al., 1993).

Para a indução à poliploidia em tilápia do Nilo é importante ter em conta que esta espécie encontra-se no grupo de peixes que liberam os ovócitos em diversas oportunidades no transcurso da desova. Por esta razão os ovários neste grupo de peixes contem ovócitos em todos os estádios de desenvolvimento que vão maturando em parcelas, caracterizando-os como peixes assincrônicos ou de desova intermitente (CARRILLO & RODRIGUEZ, 2001).

Este assincronismo dos ovócitos na divisão celular afeta a otimização do protocolo de choque. A 28 °C o intervalo de tempo desde o início da primeira clivagem ao final da última compreende quase 20 minutos. Por isto a aplicação e duração do choque afetarão unicamente uma pequena percentagem das células num tempo ótimo de indução (SHELTON, 2002).

DON & AVTALION (1988), EL GAMAL et al., (1999) e HERBST (2002), sugerem que o assincronismo do desenvolvimento do zigoto após a fertilização parece ser um dos fatores mais importantes para a indução a poliploidia. Este assincronismo pode ser devido a um artefato da técnica de desova artificial ou os processos de choque térmico como, por exemplo, o choque não uniforme sobre os ovos ou sua inadvertida ativação na desova.

Não existem referências na literatura pertinente sobre a sobrevivência de tilápia do Nilo tetraplóides até atingirem a fase adulta (HERBST, 2002). O único relato foi descrito por DON & AVTALION (1988) para ***Oreochromis aureus*** que sobreviveram a choques térmicos frios. Embora os resultados tenham sido positivos pesquisas mais refinadas deverão ser reconduzidas (HERBST, 2002).

Outro problema que vêm sendo discutido por PURDOM (1983) em relação a tetraploidia pode ser devido à inviabilidade no rearranjo dos cromossomos durante o desenvolvimento embrionário. Evidências sugerem que a viabilidade dos peixes tetraplóides é muito baixa, entretanto, poucos casais de tetraplóides maduros férteis serão suficientes para iniciar um programa de melhoramento genético orientado a aumentar a população de uma forma planejada reduzindo o risco de endogamia.