

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/08/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU (IBB-UNESP)

Departamento de Zoologia

OCORRÊNCIA DE GAMETAS NÃO REDUZIDOS EM HÍBRIDOS DE *Astyanax*

altiparanae* E *Astyanax schubarti

Gabriel Marra Schade

Botucatu - SP

2020

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

Gabriel Marra Schade

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obrigado, de coração.

SUMÁRIO

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÃO

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

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

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

7. REFERÊNCIAS

ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, out. 2016.

ADAMOV, N. S. DE M. et al. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, 2017.

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 135–141, 2005.

ARAI, K.; MATSUBARA, K.; SUZUKI, R. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture**, v. 117, n. 3–4, p. 227–235, 1993.

ARIAS-RODRIGUEZ, L.; YASUI, G. S.; ARAI, K. Disruption of normal meiosis in artificial inter-populational hybrid females of *Misgurnus loach*. **Genetica**, v. 136, n. 1, p. 49–56, 2009.

BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 325–337, 2000.

BERTOLINI, R. M. et al. First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 68–74, 2018.

COLOMBO, L. et al. Towards an integration between chromosome set manipulation, intergeneric hybridization and gene transfer in marine fish culture. **Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species**, v. 122, n. January, p. 77–122, 1998.

COYNE, J. A.; ALLEN ORR, H. The evolutionary genetics of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 353, n. 1366, p. 287–305, 28 fev. 1998.

-
- CUELLAR, O.; UYENO, T. Triploidy in rainbow trout. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 508–515, 1972.
- DANIEL-SILVA, M. F. Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Chromosome evolution in fish: BrdU replication patterns demonstrate chromosome homeologies in two species of the genus *Astyanax*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 4, p. 497–501, 2005.
- DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. Fish sex: why so diverse? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, n. 6, p. 648–653, 2009.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471, p. 163–171, 2017.
- DO NASCIMENTO, N. F. et al. In vivo storage of oocytes leads to lower survival, increased abnormalities and may affect the ploidy status in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Zygote**, p. 1–5, 2018.
- DORSON, M.; CHEVASSUS, B.; TORHY, C. Comparative susceptibility of three species of char and of rainbow trout × char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 11, n. 3, p. 217–224, 1991.
- DOS SANTOS, M. P. et al. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.
- FUJIMOTO, T. et al. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 430–437, 2008.
- GÉRY, J. **Characoids of the World**. Neptune City, New Jersey: Tfh Pubns Inc, 1977.
- HUANG, W. et al. Formation of diploid and triploid hybrid groupers (hybridization of *Epinephelus coioides* ♂ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) and their 5S gene analysis. **BMC**

Genetics, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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