



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Zoologia

Dissertação de Mestrado

CRESCIMENTO E ASPECTOS REPRODUTIVOS
DO *Pimelodus maculatus* TRIPLOIDES

Rafaela Manchin Bertolini

Bióloga

Botucatu-SP
2018

CRESCIMENTO E ASPECTOS REPRODUTIVOS DO *Pimelodus maculatus* TRIPLOIDES

RAFAELA MANCHIN BERTOLINI

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini

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

Botucatu-SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Bertolini, Rafaela Manchin.

Crescimento e aspectos reprodutivos do *Pimelodus maculatus*
Triploides / Rafaela Manchin Bertolini. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: George Shigueki Yasui
Coorientador: José Augusto Senhorini
Capes: 20400004

1. Esterilização. 2. Manejo de peixe. 3. *Pimelodus maculatus*.
4. Cromossomos. 5. Animais - População.

Palavras-chave: Esterilização; Mandi amarelo; Manipulação
cromossômica; Triploidização.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades colocadas em meu caminho, e a força para me dedicar a cada uma delas.

A toda minha família, em especial meus pais Rozi e Nilson e minha irmã Gabriela por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo, carinho, amor, e dedicação. Vocês são essenciais em minha vida.

Ao meu orientador, George Shigueki Yasui e coorientador José Augusto Senhorini, pelos anos de aprendizado, pela oportunidade, companheirismo, amizade e pela confiança no desenvolvimento do trabalho. É uma honra ter vocês como meus professores!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Peixes: Dilberto Riberto Arashiro, Paulo Sérgio Monzani, Matheus Pereira dos Santos, Lucas Henrique Piva, Mariana Machado Evangelista, Leonardo Luiz Calado, Natália Greice Matheus, Gustavo Sheguimoto Fonseca, Hatus Siqueira, Geovanna Coelho, Nathalia Alcântara, Bruna Machado, Talita Lázaro, Lauriene Munhoz, Leonardo Bortoletto, Daniela Oliveira.

Em especial, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Diógenes Henrique de Siqueira Silva, Nycolas Levy Pereira, Lucia Suarez, Lopez por todo conhecimento, paciência e amizade. Sou muito grata a vocês!

Ao CEPTA/ICMBio, pela infraestrutura e fornecimento de matéria biológico. Agradeço também aos funcionários Ricardo Torres, Lino, Tim, Dalton, Gordo, pela disponibilidade e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À AES TIETÊ/ANEEL 4600000174 pelo apoio financeiro, fornecimento de equipamentos, material utilizado nesse estudo.

Ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP/ Botucatu.

Ao Guilherme Pedroso, por todo carinho, amor e compreensão. Obrigada por sempre estar do meu lado apoiando, se preocupando e incentivando.

Por fim, a todos que estiveram ao meu lado apoiando e sendo amigos, em especial, Larissa Pardin, Larissa Sartilho, Mariana Braglin, Matheus Tonetti, Paulo André.

Obrigada a todos!

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS	4
Resumo Geral.....	5
General Abstract.....	6
1-INTRODUÇÃO GERAL.....	7
1.1 Mandi (<i>Pimelodus maculatus</i>) como espécie modelo	8
1.2 Produção de peixes triploides	9
OBJETIVOS	11
CAPÍTULO I: PROTOCOLO DE TRIPLOIDIZAÇÃO DO <i>Pimelodus maculatus</i> .	12
1-MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1.1 Origem dos peixes parentais, indução hormonal e fertilização <i>in vitro</i>	12
1.2 Indução a triploidia através de choque térmico	13
1.3 Desenvolvimento e sobrevivência dos embriões submetidos aos choques de temperatura	13
1.4 Confirmação da ploidia.....	14
1.5 Análise estatística	16
2-RESULTADOS	16
2.1 Sobrevivência e determinação da ploidia	16
CAPITULO II: CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO GONADAL DE <i>Pimelodus maculatus</i> DIPLOIDES E TRIPLOIDES.....	22
1-MATERIAL E METODOS.....	22
1.2 Sistema de aquários e distribuição	24
1.3 Biometrias, coletas e análise histológica	27
1.4 Análise estatística	28
2-RESULTADOS.....	29
2.1 Crescimento e Peso.....	29

2.2 Índice Gonadosomático (IGS).....	32
2.3 Rendimento de Carcaça	33
2.4 Análise Histológica.....	36
<i>DISCUSSÃO GERAL</i>	40
<i>CONCLUSÕES</i>	44
<i>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Larvas de mandi, *Pimelodus maculatus*, com morfologia normal (A) e anormal (B).....19

Figura 2. Histograma de citometria de fluxo de uma larva recém-eclodida diploide (A) e triploide (B) de mandi (*Pimelodus maculatus*).....20

Figura 3. Esfregaço sanguíneo e citogenética de indivíduos diploides (esquerda) e triploides (direita) do Mandi amarelo, *Pimelodus maculatus*.....21

Capítulo II

Figura 1. Coleta de amostra (nadadeira) para confirmação da ploidia através de citometria de fluxo e identificação individual dos exemplares de *Pimelodus maculatus*. A. Anestesia. B. Coleta de nadadeira para análise de citometria de fluxo. C. Incisão com auxílio de bisturi. D. Inserção do microtransponder.....23

Figura 2. Ilustração do sistema de aquários utilizado no experimento de crescimento de *Pimelodus maculatus* diploides e triploides. Setas indicando a instalação de lâmpadas para fotoperíodo, encanamento para circulação de água, termostato e bomba de circulação presente em todos os aquários. Fonte: Hur Siqueira Filho, Programa: SketchUp Pro.....25

Figura 3. Ilustração do sistema de aquários utilizado no experimento de crescimento de *Pimelodus maculatus* diploides e triploides, vista lateral. Setas indicando filtro UV e aeração. Fonte: Hur Siqueira Filho, Programa: SketchUp Pro.....26

Figura 4. Biometria de *Pimelodus maculatus*. A. Comprimento padrão (mm) com auxílio de paquímetro digital. B. Peso total (g) utilizando balança semi analítica.....27

Figura 5. Comprimento padrão (mm) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).....29

Figura 6. Peso (g) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).....30

Figura 7. Comprimento padrão (mm) de machos 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).....31

Figura 8. Peso (g) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).....31

Figura 9. Índice gonadossomático (IGS, %) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Asteriscos indicam diferença estatística entre diploides e triploides ($t < 0,05$).....32

Figura 10. Índice gonadossomático (IGS, %) de machos 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).....33

Figura 11. Rendimento de carcaça (%) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença significativa entre as ploidias ($t > 0,05$).....34

Figura 12. Rendimento de carcaça (%) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença significativa entre as ploidias ($t > 0,05$).....34

Figura 13. Morfologia externa de peixes e gônadas de *Pimelodus maculatus*. Fêmeas 2n (A) e 3n (B) e machos 2n (C) e 3n (D). Amostras do Mês 18. Escala: 5 cm.....35

Figura 14. Histologia ovariana de fêmeas diploides e triploides de *Pimelodus maculatus*. Amostras do Mês 2 (A, C) e 18 (B, D). Fêmeas 2n em fase de maturação, oócitos em crescimento primário (A, B). Ovários imaturos de fêmeas 3n (C, D). Setas indicando oogônias (Og) e oócitos (Oc). Barra de escala, A e D: 50 μm ; B e C: 100 μm39

Figura 15. Histologia testicular de machos diploides e triploides de *Pimelodus maculatus*. Amostras do Mês 2 (A, D), 6 (B, E) e 18 (C, F). Gônadas em maturação inicial (A, D, E, F). Gônadas maduras (B, C). Setas indicando: SG, espermatogônias; SC, espermatócitos; ST, espermátides; SZ, espermatozoide; RS, espermatozoide residual; I, interstício. Linha tracejada indicando o ducto testicular principal. Barra de escala, A, B, D e E: 50 μm ; C e F: 100 μm39

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Desenvolvimento e ploidia do Mandi, <i>Pimelodus maculatus</i> , após tratamentos com choque térmico para indução a triploidia ¹	18
---	----

Capítulo II

Tabela 1. Fases de ovogênese identificadas em indivíduos diploides e triploides de <i>Pimelodus maculatus</i> durante os meses de coleta.....	37
--	----

Tabela 2. Fases da espermatogênese identificadas em indivíduos diploides e triploides de <i>Pimelodus maculatus</i> durante os meses de coleta.....	38
--	----

RESUMO GERAL

A triploidização é uma ferramenta interessante para produzir peixes estéreis. No Mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* isso pode ser aplicada como uma ferramenta de reconstituição de espécies ameaçadas através de transplante de células germinativas-tronco. No capítulo I, objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente para a triploidização da espécie *P. maculatus* empregando choques de térmicos. As temperaturas testadas foram de 37°C, 38°C e 39°C, 2 minutos pós-fertilização durante 2 minutos. Os embriões intactos serviram como grupo controle diplóide. A ploidia foi confirmada por citometria de fluxo, diâmetro nuclear dos eritrócitos e citogenética. Taxas de fertilização e sobrevivência foram verificadas nos principais estágios de desenvolvimento embrionário (clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão), assim como a porcentagem de larvas normais e anormais, e eficiência da triploidização. O choque térmico reduziu significativamente a sobrevivência no estágio de gástrula ($P = 0,0178$), somito ($P = 0,0469$) e incrementou o percentual de larvas anormais ($P = 0,0261$). A menor sobrevivência foi observada para o tratamento a 39°C. Todos os tratamentos apresentaram altas porcentagens de indivíduos triploides, sendo o maior valor observado para o choque a 38°C (96,7%). Com base nos resultados acima, foi obtido um eficiente protocolo de triploidização em *P. maculatus* utilizado choque quente (38°C, 2 mpf e duração de 2 minutos). No capítulo II, foram avaliados aspectos relacionados ao desempenho reprodutivo e crescimento de indivíduos diploides (2n) e triploides (3n) da espécie *P. maculatus*. O objetivo foi avaliar crescimento entre as duas diferentes ploidias através do peso, comprimento, rendimento de carcaça, índice gonodassomatico e a possível esterilidade em peixes triploides por meio de análise histológica. Fêmeas 2n apresentaram valores de IGS significativamente maiores ($P = 0,0157$). A análise histológica mostrou fêmeas 2n em fase de maturação. Por outro lado, gônadas de fêmeas 3n apresentaram somente oogônias, células apoptóticas e poucos oócitos primários isolados. Machos 2n apresentaram gametogênese normal, ao passo que em machos 3n não foram observados espermatozoides formados. Portanto, não foram observados gametas em fêmeas e machos 3n de *P. maculatus*, sendo considerados estéreis. Essas características são aplicáveis tanto nas ciências básicas, como modelo experimental, bem como nas ciências aplicadas, para a produção em larga escala.

Palavras chave: Mandi amarelo; triploidização; manipulação cromossômica; esterilização.

GENERAL ABSTRACT

Triploidization is an interesting tool to produce sterile fish. In the spotted catfish *Pimelodus maculatus*, this may be used as a tool for reconstitution of endangered species based on stem germ cell transplantation. In Chapter I, the study aimed to establish an efficient protocol for triploidization in the spotted catfish *P. maculatus* using temperature shock. The temperatures tested were 37°C, 38°C e 39°C, 2 min postfertilization during 2 minutes. Intact embryos served as diploid control. Ploidy status was confirmed by flow cytometry, nuclear diameter of erythrocytes and karyotyping. Fertilization and hatching rates were verified at the main embryo stages (cleavage, blastula, gastrula, somite stage and hatching), the percentage of normal and abnormal larvae and also the efficacy of triploidization. Heat shock decrease the survival at blastula stage ($P = 0,0178$), somite ($P = 0,0469$) and increased the percentage of abnormal larvae ($P = 0,0261$). The lowest survival was observed at 39 °C. All treatments presented high percentages of triploid individuals, and the highest values were observed for heat shock at 38°C (96,7%). Based on results above, it was obtained an efficient protocol for triploidization in *P. maculatus* using heat shock (38°C, 2 min postfertilization during 2 minutes). In Chapter II, aspects related to the growth and reproductive performance of diploid (2n) and triploid (3n) of *P. maculatus* were evaluated. The objective was to evaluate growth according with the ploidy status, through length, weight, carcass yield, gonadassometric index and possible sterility in triploid fish by means of histological analysis. Diploid females presented significantly higher IGS values ($P = 0.0157$). Histological analysis showed 2n females in maturation stage. On the other hand, gonads of 3n-females presented only oogonia, apoptotic cells and few isolated primary oocytes. Diploid males presented normal gametogenesis, although in 3n-males spermatozoa were not observed. However, gametes were not observed in females and males 3n of *P. maculatus*, considered then as sterile sterile.

Keywords: spotted catfish; triploidization; chromosome manipulation; sterilization.

1- INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente a ictiofauna Neotropical é composta por aproximadamente 4.900 espécies de água doce (REIS et al., 2016). Ações antrópicas como pesca extrativista, introdução de espécies exóticas, contaminação do meio aquático e alterações nos cursos naturais dos rios causam impactos significativos e colocam diversas espécies nativas em risco de extinção. De acordo com o “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção”, existem 312 espécies em algum nível de ameaça (ICMBIO, 2016). Diante desse panorama, estratégias de preservação, empregando biotecnologias avançadas têm sido desenvolvidas para a recuperação de espécies ameaçadas (YASUI et al., 2011).

A técnica do quimerismo é uma biotécnica promissora para reconstituição de espécies através de transplante de células germinativas-tronco (PGCs, espermatogônias ou oogônias) de um indivíduo doador para um receptor estéril, onde as células poderão colonizar e diferenciar-se em gametas com características genéticas do doador, produzindo assim uma quimera germinativa (OKUTSU et al., 2007; NÓBREGA et al., 2010; YOSHIZAKI, GORO et al., 2010; YOSHIKAWA et al., 2017). Empregando-se essa tecnologia, uma espécie ameaçada de extinção poderá ser propagada através de uma espécie em que o manejo reprodutivo esteja bem consolidado. Para que essa técnica seja efetiva, devem ser utilizados receptores estéreis, que assim vão garantir que haja produção de gametas apenas do doador. Como receptor de células germinativas, podem-se utilizar peixes triploides (OKUTSU et al., 2007), os quais geralmente são estéreis ou inférteis (TAKEUCHI et al., 2016). Ao receber células germinativas exógenas produzirão gametas apenas do doador. Portanto, a produção de receptores estéreis é um ponto chave para o sucesso do quimerismo.

Embora existam potencialidades da aplicação dessas biotecnologias para a recuperação de espécies ameaçadas de extinção, estrategicamente, é importante adotar grupos de peixes com grande número de espécies, já que uma vez consolidada uma estratégia de preservação, as tecnologias podem ser facilmente empregadas em espécies filogeneticamente próximas. Nesse contexto, para o desenvolvimento deste trabalho foi escolhida a espécie *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) como modelo experimental, pois peixes triploides desta espécie, caso sejam estéreis, poderão ser futuramente empregados como receptores de células germinativas de espécies ameaçadas de extinção da ordem Siluriformes. Vale ainda citar como exemplo de aplicação dessa tecnologia a espécie *Pseudopimelodus mangurus* (Pseudopimelodidae, Siluriforme) recentemente incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção no estado de São Paulo (BRESSAN; KIERULFF e SUGIEDA, 2009), portanto o mandi poderia ser uma ferramenta para melhorar o estado de conservação de um siluriforme ameaçado de extinção.

1.1 Mandi (*Pimelodus maculatus*) como espécie modelo

Entre as maiores ordens de peixes e o segundo grupo mais ameaçado, com 96 espécies listadas no Brasil (ICMBIO, 2016), temos os Siluriformes, constituída basicamente por bagres e cascudos e que conta com mais de 2.400 espécies, distribuídas em 34 famílias e 412 gêneros (NELSON, 2006; HELFMAN et al., 2009). A espécie *P. maculatus*, descrita pela primeira vez em 1803 por Lacépède (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003), pertence à ordem dos Siluriformes, à família Pimelodidae, que inclui cerca de 50-60 gêneros e 300 espécies (MEES, 1974) e ao gênero *Pimelodus*, o

mais rico da família, que apresenta 26 espécies (RIBEIRO; LUCENA e LUCINDA, 2008). Esta espécie tem ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo encontrada nas bacias do rio Paraná e São Francisco (REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003). Espécie caracterizada onívora, porém generalista, com hábitos alimentares diversos, incluindo matéria vegetal, invertebrados e peixes (BAIZ; CABRERA e CANDIA, 1968; BASILE et al., 1975; DE RESENDE, 2000; LOBON-CERVIA e BENNEMANN, 2000; SILVA; FUGI e SEGATTI HAHN, 2007; HAHN e FUGI, 2009), capaz de explorar mais de um nível trófico (LOBON-CERVIA e BENNEMANN, 2000; CALLISTO et al., 2002; SILVA; FUGI e SEGATTI HAHN, 2007). Esse hábito alimentar oportunista é bastante valorizado na aquicultura pela habilidade em ingerir dietas artificiais inclusive em tanques redes (RAMOS, 2009), o que facilita a criação em cativeiro. Também possui características vantajosas como fácil reprodução em cativeiro e sob condições laboratoriais, o que possibilita o controle da fertilização artificial, vital para estudos de manipulação cromossômica, como é o caso da indução de peixes triploides. Diante dessas características e potencialidades, pode-se considerar o mandi *Pimelodus maculatus* como uma espécie de dupla aptidão, ou seja, uma espécie de laboratório e de aquicultura, servindo portanto para as ciências básicas e aplicadas. Porém, os estudos prévios supracitados concentram-se no campo das ciências aplicadas (aquicultura), embora haja potencial para estudos avançados como a manipulação cromossômica e quimerismo, alvo do presente estudo.

1.2 Produção de peixes triploides

Peixes triploides ($3n$) são indivíduos cujas células possuem três conjuntos de cromossomos, contendo dois de origem materna e um de origem paterna (ADAMOV et

al., 2016). Essa alteração pode ocorrer de forma natural (THORGAARD e GALL, 1979; PURDOM, 1984), ou ser induzida por meios artificiais através da manipulação cromossômica.

Durante a reprodução de peixes diploides (“normais”), ocorre a liberação do segundo corpúsculo polar (vesícula contendo material genético) momentos após a inseminação, etapa reducional importante para a manutenção da ploidia das espécies.

Em peixes, sua inibição pode ser realizada por meio de um choque de temperatura, químico ou pressão (PIFERRER et al., 2009), dando origem a um zigoto 3n. Devido ao conjunto de cromossomos adicional, a triploidização compromete a gametogênese (BENFEY e TRIPPEL., 2011), podendo causar esterilidade (TAKEUCHI et al., 2016), devido à divisão meiótica irregular.

Peixes estéreis podem apresentar maior rendimento de carcaça (DO NASCIMENTO et al., 2017), por não apresentar oócitos vitelogênicos, além de apresentar maior crescimento somático, já que desvia menos energia para a maturação das gônadas (ARAI, 2001) sendo portanto uma característica vantajosa para aquicultura. Outra vantagem importante de se cultivar peixes estéreis está relacionado aos constantes escapes do cativeiro para os recursos naturais como rios e lagoas, já que esses peixes podem dominar o ambiente e portanto competir com as espécies endêmicas. Esse fato é particularmente importante pois a introdução de espécies exóticas é a segunda maior causa da extinção de espécies nativas, que sofrem com a competição pelos recursos naturais, predação e a introgressão (PIFERRER et al., 2009).

No entanto, essas características vantajosas referentes à esterilidade podem ser espécie-específicas, pois em alguns casos o crescimento dos triploides pode ser semelhante (SACOBIE et al., 2012) ou inferior (FRIARS et al., 2001) ao observado em diploides.

Contudo, embora estratégico, até onde se sabe, não existe na literatura indexada um protocolo para indução de mandis *P. maculatus* triploides, o que justifica o desenvolvimento do presente trabalho.

OBJETIVOS

Geral:

- Produção de mandis *Pimelodus maculatus* triploides estéreis para atuarem como receptores de células germinativas de espécies ameaçadas de extinção.

Específicos:

- Obter um protocolo de indução de mandis estéreis em larga escala.
- Avaliar a possível esterilidade dos triplóides resultantes.
- Verificar o desempenho zootécnico para potencial aplicação na aquicultura.

CAPÍTULO I: PROTOCOLO DE TRIPLOIDIZAÇÃO DO *Pimelodus maculatus*

O objeto inicial do trabalho foi definir um protocolo eficaz para triploidização da espécie *P. maculatus* através de choques térmicos.

O experimento foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA/ICMBio) em Pirassununga, São Paulo (21°55'58" S, 47°22'31" O), com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #10/2015) e SISBIO 55725-1.

1- MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Origem dos peixes parentais, indução hormonal e fertilização *in vitro*

Foram utilizados casais da espécie *Pimelodus maculatus* (mandi) capturados no Rio Mogi Guaçu no município de Pirassununga-SP (21°55'45" S, 47°22'21" O), entre os meses de outubro e dezembro de 2015, utilizando-se tarrafas de nylon de malha de 5 cm entre nós. Os peixes foram mantidos em caixas de fibra de vidro de 200 L, circulares, com renovação constante da água na taxa de 5 x por hora, temperatura entre 25°C e 29°C, até os procedimentos de fertilização artificial.

Nas fêmeas, a indução hormonal foi feita em duas doses com hipófise de carpa, sendo a primeira dosagem de 0,5 mg kg⁻¹ e a segunda, aplicada seis horas depois, de 5 mg kg⁻¹. Nos machos, foi aplicado apenas uma dose de 5 mg kg⁻¹, juntamente com a segunda indução das fêmeas.

Seis horas depois da última dose, as fêmeas foram selecionadas, anestesiadas com mentol (~100 mg L⁻¹, Êxodo Científica, Brasil) e os oócitos extrusados em bacias

de vidro secas, para não hidratar os mesmos. Os machos foram anestesiados e sacrificados para retirada das gônadas, as quais foram maceradas em solução de MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma #M8316) para imobilização dos espermatozoides. Posteriormente, o sêmen diluído em solução de MEM foi adicionado à massa de ovos e os gametas ativados pela adição de água, mexendo-se vigorosamente com movimentos circulares.

1.2 Indução a triploidia através de choque térmico

Os embriões foram submetidos a triploidização através de choque térmico. As desovas utilizadas ($n = 3$), foram divididas em quatro grupos. O primeiro incubado a 26°C, permanecendo intacto (grupo controle diplóide). Os outros três grupos foram submetidos a tratamentos de choques de temperatura para indução à triploidia (37°C, 38°C, 39°C). Os tratamentos foram iniciados dois minutos pós-fertilização (mpf) com duração de dois minutos e posteriormente incubados a 26°C. Os embriões foram colocados em incubadoras flutuantes e alocados em aquários de 480 litros com aeração constante, um aquário por repetição, e mantidos nas mesmas condições até a eclosão.

1.3 Desenvolvimento e sobrevivência dos embriões

Com auxílio de uma pipeta Pasteur, uma pequena quantidade de embriões foi coletada e mantida em placas de Petri de diâmetro de 100 mm e mantida em incubadora tipo B.O.D. com temperatura ajustada a 26°C, durante todo desenvolvimento embrionário até a eclosão. Os tratamentos foram monitorados através de um estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japan) nos estágios de 2-células (40

mpf), blástula, 2 horas pós-fertilização (hpf), gástrula (4 hpf), somito (8 hpf), e eclosão (18 hpf), sendo os embriões mortos retirados a cada estágio para não prejudicar a qualidade da água. Imagens digitais foram capturadas com uma câmera CCD (Ds-F1, Nikon, Tóquio, Japão) acoplada em estereomicroscópio e capturadas através do software (Nis-Ar Elements, Nikon, Tokyo, Japão).

Após a eclosão, foi contabilizado o número de larvas normais e anormais.

1.4 Confirmação da ploidia

Foram utilizados três diferentes métodos para confirmação da ploidia. A análise de citometria de fluxo foi aplicada em larvas recém-eclodidas, para avaliar a melhor temperatura para triploidização e sobrevivência entre os três tratamentos testados. Foram selecionadas vinte larvas de cada tratamento, capturadas aleatoriamente e submetidos à análise de citometria de fluxo baseado no protocolo desenvolvido por XAVIER et al. (2017). Para isso, cada amostra foi colocada em solução de lise celular (9,53 mM MgSO₄·7 H₂O; 47,67 mM KCl; 15 mM Tris; pH 8,0, com adição de sacarose e com detergente Triton-X a 0,6%) por 10 minutos e, logo após, para coloração dos núcleos, foi adicionado 800 µL de solução de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride - DAPI (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (Sigma #D5773, St. Louis, USA). As amostras foram filtradas em telas de nylon de 30 µm (Celltrics, Partec, GMBh, Germany) e analisadas em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer, Partec, GMBh, Germany).

Para se verificar a validação da técnica de citometria de fluxo, algumas larvas foram mantidas até a idade adulta e verificada a ploidia por citometria de fluxo,

diâmetro nuclear dos eritrócitos e citogenética. Para a realização da técnica do esfregaço sanguíneo, foram utilizados 14 mandis, 7 diploides e 7 triploides, com 14 meses de idade. Os peixes foram anestesiados em solução de Eugenol (0.1 g L^{-1}) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) e o sangue foi colhido através de punção do vaso caudal com a ajuda de uma seringa contendo uma gota de heparina sódica (5000 U.I). Uma alíquota de $4,5 \mu\text{L}$ de sangue foi pipetada em uma lâmina e realizado esfregaços, os quais foram mantidos a temperatura ambiente por 6 horas, para fixação, e então corado utilizando o kit rápido panótico (LABORCLIN, Pinhais, Brasil). As imagens foram capturadas através de uma câmera CCD (Ds-F1, Nikon, Tóquio, Japão) acoplada em microscópio óptico (Nikon Ni, Tokyo, Japão). Imagens digitais foram obtidas através do software (Nis-Ar Elements, Nikon, Tokyo, Japão) e mensurados a área, o diâmetro maior e o diâmetro menor dos núcleos dos eritrócitos.

Para a análise da ploidia por citogenética foram utilizados 14 mandis, 7 diploides e 7 triploides, com 15 meses de idade. Os peixes foram injetados com fermento biológico e após dez horas, o rim cranial foi retirado para processamento de rotina em citogenética através da coloração com Giemsa (5%) (FORESTI; OLIVEIRA e DE ALMEIDA-TOLEDO, 1993). As lâminas foram visualizadas em microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japan) por meio do software Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão), sendo as imagens geradas utilizadas para contagem dos cromossomos.

1.5 Análise estatística

Os dados são mostrados como média $\pm$ EP. Os experimentos foram realizados em três repetições, cada uma com diferentes fontes de gametas. Os dados foram verificados quanto à normalidade com o teste Liliefors e em seguida comparados entre si por teste ANOVA, seguido de teste Tukey ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 10 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

2- RESULTADOS

2.1 Sobrevivência e determinação da ploidia

Os dados dos diferentes estágios de desenvolvimento dos grupos tratados (37°C, 38°C e 39°C) e controle estão explícitos na Tabela 1. Não foi observado diferença significativa entre os tratamentos para porcentagem de oócitos não fertilizados ($P=0,1834$), em estágio de 2-células ($P = 0,2348$), blástula ($P = 0,2972$), eclosão ($P = 0,0668$) e para larvas anormais ($P = 0,6177$; Fig. 1B). A temperatura afetou significativamente o estágio de gástrula ($P = 0,0178$), somito ($P = 0,0469$) e porcentagem de larvas normais ($P = 0,0261$; Fig. 1A), sendo observada maior e menor sobrevivência para o grupo controle e o tratamento a 39°C, respectivamente.

Os dados obtidos através da análise de citometria realizada nas larvas recém-eclodidas estão expressos na Tabela 1. No tratamento controle 100% dos exemplares eram diploides, como esperado (Fig. 2A). Todos os tratamentos apresentaram altas porcentagens de indivíduos triploides (Fig. 2B), sendo o maior valor observado para o choque a 38°C (96,7%).

A análise do diâmetro nuclear dos eritrócitos mostrou que peixes triploides (Fig. 3B) apresentam maiores valores para área nuclear ($92,15 \pm 1,50 \mu\text{m}^2$; $P < 0,0001$), eixo maior ($12,47 \pm 0,11 \mu\text{m}$; $P < 0,0001$) e eixo menor ($9,42 \pm 0,14 \mu\text{m}$; $P < 0,0001$) do que os peixes diploides ($65,52 \pm 5,82 \mu\text{m}^2$, $10,16 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $8,22 \pm 0,04 \mu\text{m}$; respectivamente) (Fig. 3A). Já os resultados da citogenética mostraram que peixes diploides (Fig. 3C) apresentaram 56 cromossomos. Por outro lado, no grupo submetido a choque de temperatura, foram observados 84 cromossomos, confirmando que os mesmos são triploides (Fig. 3D).

Tabela 1 - Desenvolvimento e ploidia do Mandi, *Pimelodus maculatus*, após tratamentos com choque térmico para indução a triploidia¹.

Tratamentos	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blastula (%)	Gastrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Ploidia			Eficiência da Triploidização	Triploides (%)
									2n	3n	Ovos		
Controle	1,5 ± 1,0 ^a	97,9 ± 0,7 ^a	97,3 ± 1,3 ^a	94,1 ± 1,3 ^a	90,5 ± 4,0 ^a	84,0 ± 6,0 ^a	72,9 ± 4,5 ^a	11,4 ± 3,0 ^a	60	0	342	0,0 ± 0,0	0,0
37°C	4,1 ± 1,5 ^a	95,9 ± 1,5 ^a	95,3 ± 2,1 ^a	86,1 ± 3,0 ^{ab}	76,1 ± 7,7 ^{ab}	72,8 ± 16,1 ^a	60,0 ± 9,3 ^{ab}	12,8 ± 4,3 ^a	9	51	307	39,1 ± 12,8	85,0
38°C	10,1 ± 6,7 ^a	89,9 ± 6,7 ^a	88,0 ± 7,9 ^a	71,1 ± 11,4 ^{ab}	59,5 ± 15,4 ^{ab}	55,3 ± 17,4 ^a	47,1 ± 17,1 ^{ab}	8,3 ± 0,5 ^a	2	58	357	30,4 ± 19,6	96,7
29°C	14,9 ± 4,3 ^a	85,1 ± 4,3 ^a	83,7 ± 4,9 ^a	61,0 ± 4,4 ^b	48,9 ± 1,0 ^b	30,8 ± 11,1 ^a	16,2 ± 6,5 ^b	14,6 ± 4,8 ^a	5	47	422	6,3 ± 3,0	90,4

¹ Ovócitos recém-fertilizados submetidos a choques térmicos 2 mpf a 37°C, 38°C e 39°C por 2 min. Após o tratamento, os ovos foram incubados a 26°C. O grupo de controle indica ovos intactos mantidos a 26°C (sem tratamento). As porcentagens e o número de ovos resultam de três repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$).

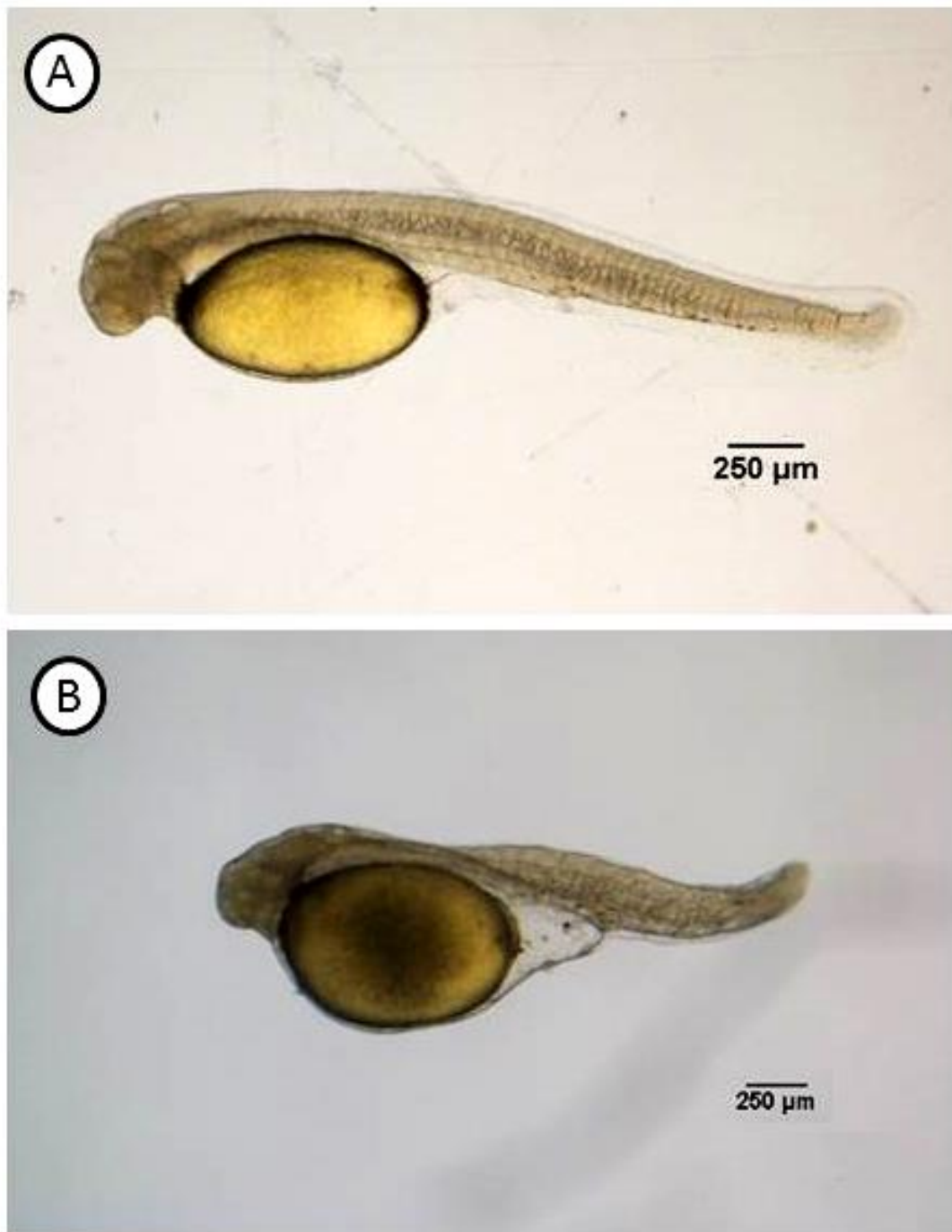


Figura 1. Larvas de mandi, *Pimelodus maculatus*, com morfologia normal (A) e anormal (B).

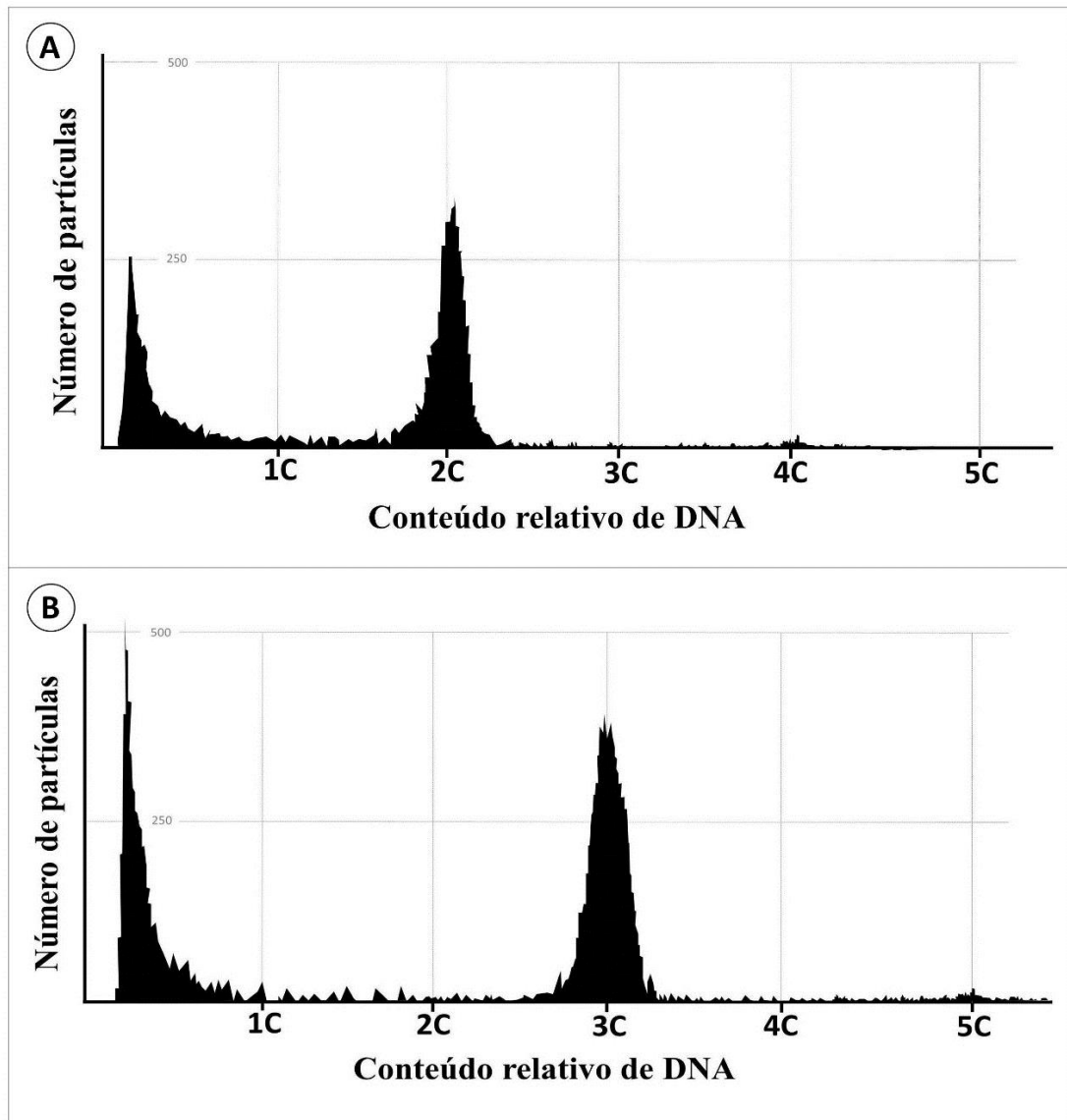


Figura 2. Histograma de citometria de fluxo de uma larva recém-eclodida diploide (A) e triploide (B) de mandi (*Pimelodus maculatus*).

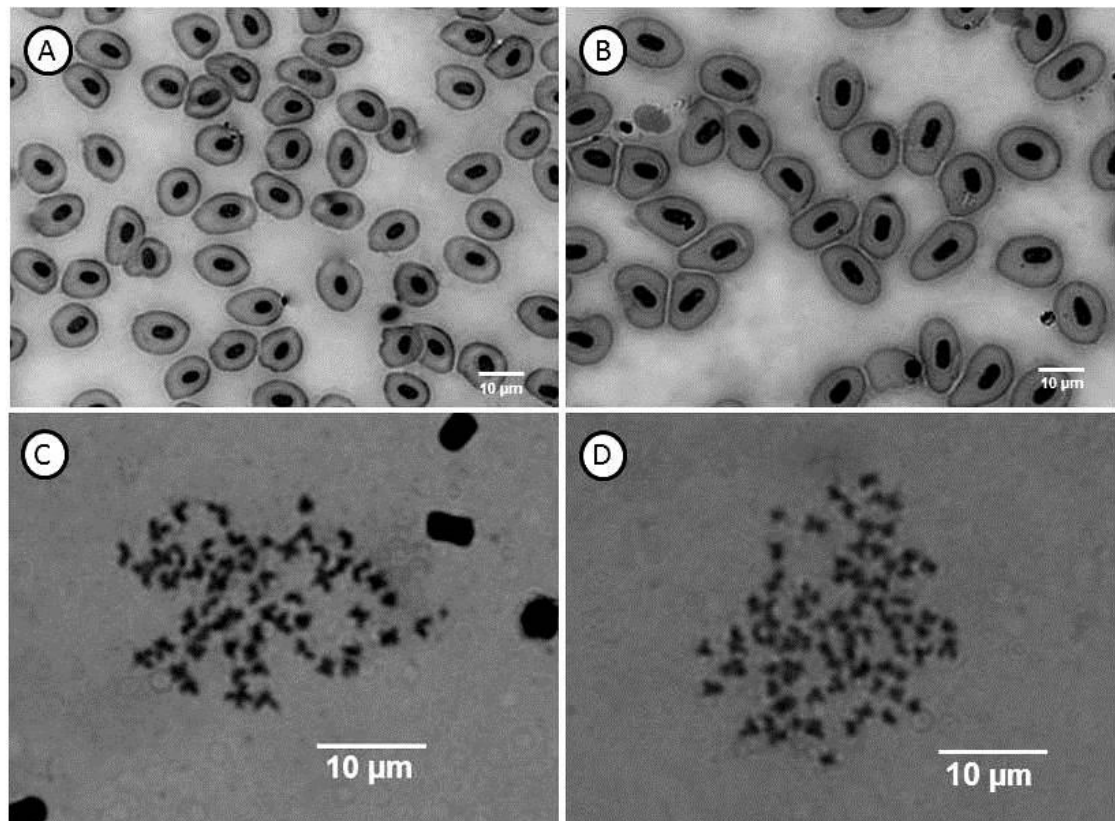


Figura 3. Esfregaço sanguíneo e citogenética de indivíduos diploides (esquerda) e triploides (direita) do Mandi amarelo, *Pimelodus maculatus*.

CAPITULO II: CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO GONADAL DE *Pimelodus maculatus* DIPLOIDES E TRIPLOIDES

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se avaliar o desempenho zootécnico acompanhando-se o crescimento de indivíduos diploides e triploides, mantidos em cativeiro sob condições laboratoriais, através de biometrias mensais, além do desenvolvimento gonadal e a possível esterilidade dos indivíduos triploides, verificado através de análises histológicas.

O experimento e as análises foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental em Pirassununga, São Paulo, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #10/2015).

1- MATERIAL E METODOS

1.1 Origem, confirmação da ploidia e microchipagem

Foram utilizados dois casais da espécie *P. maculatus* capturados no Rio Mogi Guaçu na cidade de Pirassununga-SP, no mês de dezembro de 2015. A captura, manejo, indução hormonal e indução de triploides utilizando choque térmico foram realizadas da forma descrita no Capítulo I.

Após a eclosão, os dois grupos (controle diploide e grupo submetido ao choque de temperatura de 38°C para indução de triploides) das duas desovas realizadas (4 grupos) foram mantidos em aquários de 60 L com temperatura controlada (26°C), aeração constante e troca parcial da água três vezes por semana. A alimentação das

larvas foi iniciada com Artêmia Salina (Artêmia Salina do RN, Natal, Brasil) fornecida duas vezes ao dia até completarem 30 dias de vida, posteriormente substituída por ração comercial contendo 45% de proteína.

Completando 120 dias de vida, os alevinos foram individualmente anestesiados com Eugenol (1 ml L^{-1}) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) e uma pequena amostra de nadadeira coletada para confirmação da ploidia através de citometria de fluxo, seguindo o protocolo desenvolvido por XAVIER et al. (2017) e posteriormente identificados com microtransponders 12 x 2 mm (Animall TAG ISSO FDX-B São Carlos, Brasil) a fim de ser acompanhado o crescimento e peso individual dos animais avaliados. Para a inserção dos microtransponders na cavidade peritoneal, foi feita uma pequena incisão ventral com auxílio de um bisturi, para ser implantação dos transponders na região ventral de cada animal (Fig. 1).



Figura 1. Coleta de amostra (nadadeira) para confirmação da ploidia através de citometria de fluxo e identificação individual dos exemplares de *Pimelodus maculatus*. A. Anestesia. B. Coleta de nadadeira para análise de citometria de fluxo. C. Incisão com auxílio de bisturi. D. Inserção do microtransponder.

1.2 Sistema de aquários e distribuição

Com a finalidade de eliminar possíveis variáveis ambientais prejudiciais ao experimento, foi construído um sistema de aquários interligados. Na parte superior composto por seis aquários de 480 litros, todos com termostatos, bombas de circulação, mangueiras de aeração e fotoperíodo programado para 12 horas de luz por dia. Na parte inferior, dois compartimento para decantação e um terceiro com filtro biológico, além de resistência para aquecimento, controlador de temperatura a 26°C e filtro UV (Fig. 2 e 3).

Com os peixes devidamente identificados, foi iniciado então o experimento de avaliação do crescimento e desenvolvimento gonadal dos dois grupos (diploides e triploides). Foram realizadas cinco repetições e cada uma delas iniciados com 20 peixes diploides e 20 peixes triploides, totalizando 40 animais por aquário, sendo as repetições 1 e 2 e 3, 4 e 5 de fontes de gametas diferentes.

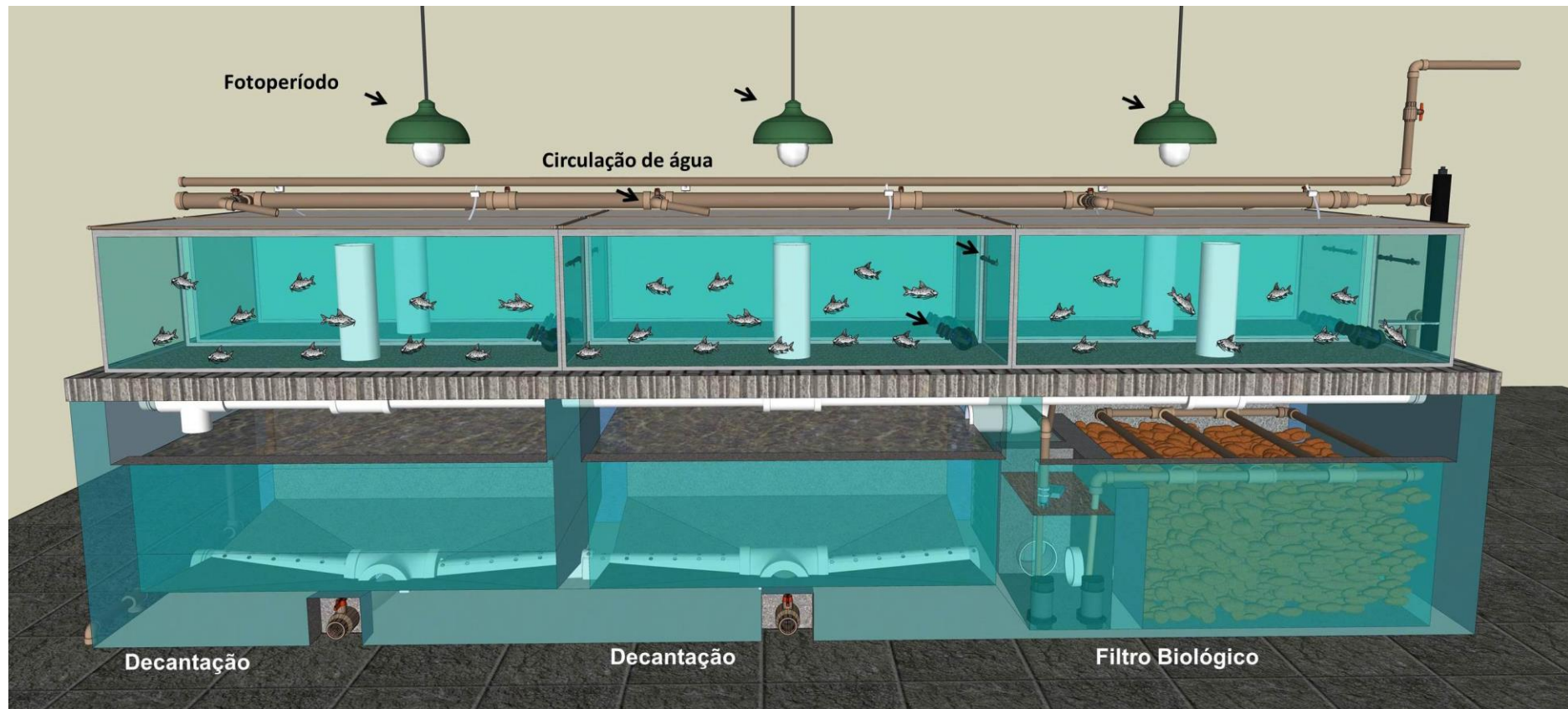


Figura 2. Ilustração do sistema de aquários utilizado no experimento de crescimento de *Pimelodus maculatus* diploides e triploides. Setas indicando a instalação de lâmpadas para fotoperíodo, encanamento para circulação de água, termostato e bomba de circulação presente em todos os aquários. Fonte: Hur Siqueira Filho, Programa: SketchUp Pro.

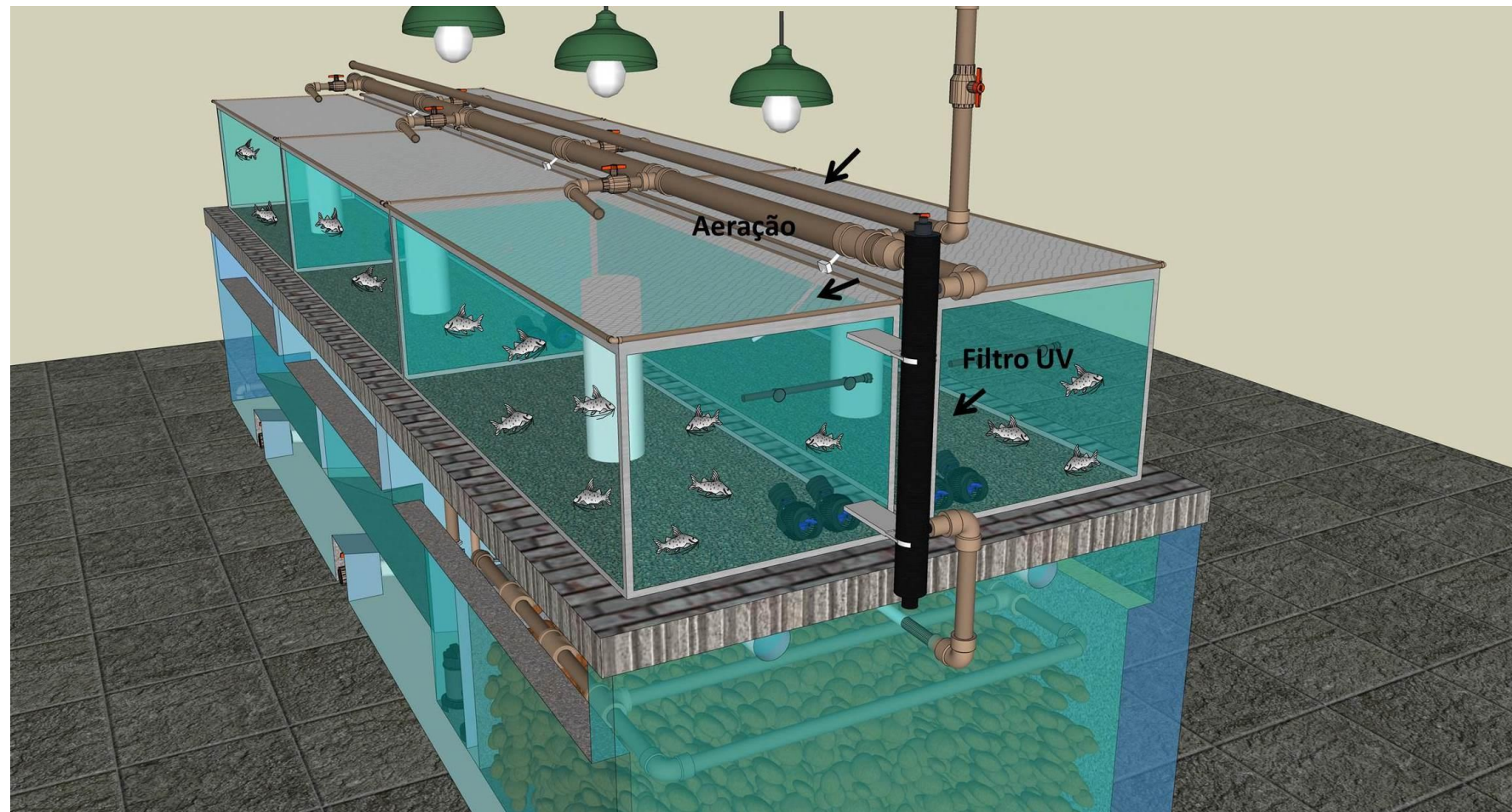


Figura 3. Ilustração do sistema de aquários utilizado no experimento de crescimento de *Pimelodus maculatus* diploides e triploides, vista lateral. Setas indicando filtro UV e aeração. Fonte: Hur Siqueira Filho, Programa: SketchUp Pro.

1.3 Biometrias, coletas e análise histológica

Foram realizadas 19 biometrias, iniciadas com 150 dias de vida (mês 0) e as demais a cada 30 dias até os peixes completarem 690 dias (mês 18). As amostragens mensais foram realizadas todas da mesma forma, sendo mensurado o comprimento padrão (Fig. 4.A) e o peso total (Fig.4.B).

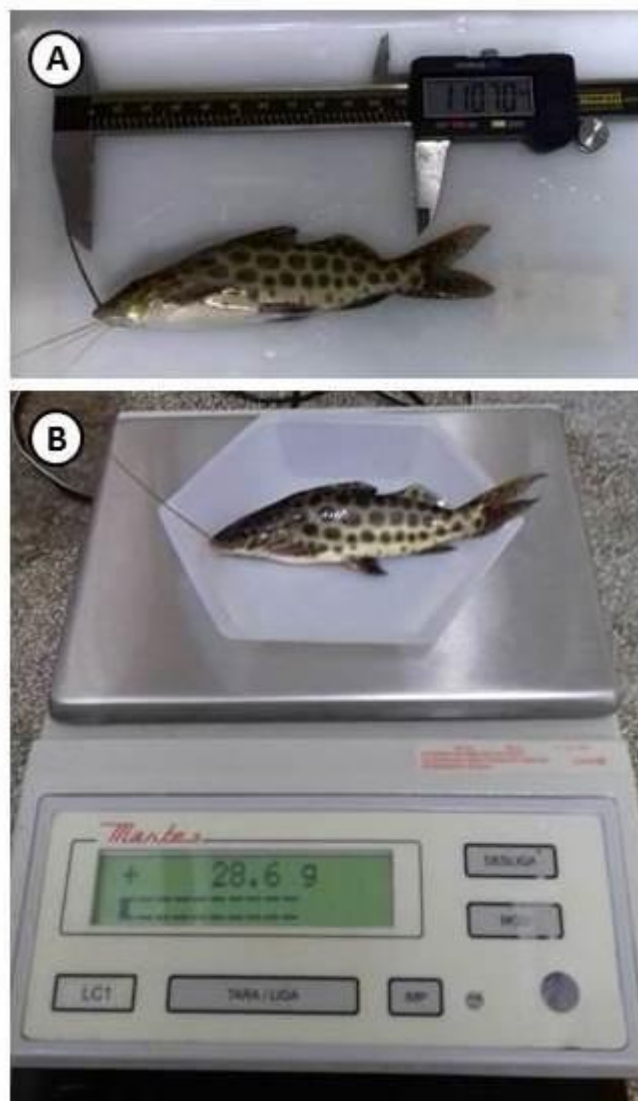


Figura 4. Biometria de *Pimelodus maculatus*. A. Comprimento padrão (mm) com auxílio de paquímetro digital. B. Peso total (g) utilizando balança semi analítica.

As coletas de gônadas foram iniciadas junto com a terceira biometria (mês 2) e as demais a cada 60 dias. Para isso, a cada coleta, quatro peixes por repetição (dois diploides e dois triploides), foram capturados aleatoriamente (independente do sexo), eutanasiados, sendo as gônadas retiradas e pesadas para o cálculo do índice gonadossomático (IGS). A carcaça também foi pesada para mensuração do rendimento de carcaça.

As amostragens coletadas foram fixadas em Bouin (solução Líquido de Bouin, Cinética, Londrina, Brasil), desidratadas em concentrações crescentes de Etanol (70%, 80%, 95% e 100%), clareadas com Xilol (Êxodo científica, Hortolândia, Brasil) e incluídas em Paraplast (Paraplast®, Sigma, St. Louis, EUA), os corte em secções de 5 a 7 μ m de espessura e a coloração com Hematoxilina e Eosina.

1.4 Análise estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ EP. Os experimentos foram realizados em cinco repetições, com duas diferentes fontes de gametas. Os dados foram verificados quanto à normalidade com o teste Liliefor's e em seguida comparados entre si por teste ANOVA, seguido de teste T ($P = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 10 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

2- RESULTADOS

2.1 Crescimento e Peso

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) no crescimento e peso de fêmeas de diferentes ploidias (2n e 3n) durante o período experimental (Fig 5 e 6). No entanto, foram observadas com comprimento padrão e peso semelhantes no início nas primeiras amostragens e ao atingir o mês 8, fêmeas triploides (3n) passaram a apresentar maior comprimento padrão em relação às fêmeas diploides (2n) (Fig. 5). O mesmo dado foi observado para o peso, onde fêmeas 3n apresentaram médias mais elevadas a partir do mês 4 (Fig. 6).

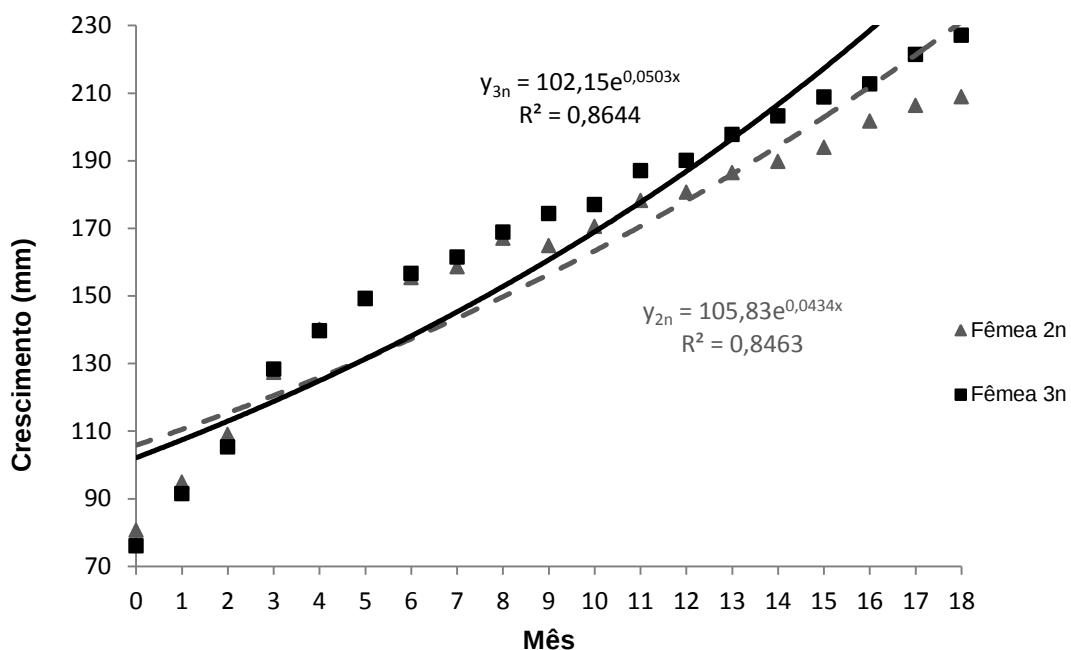


Figura 5. Comprimento padrão (mm) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).

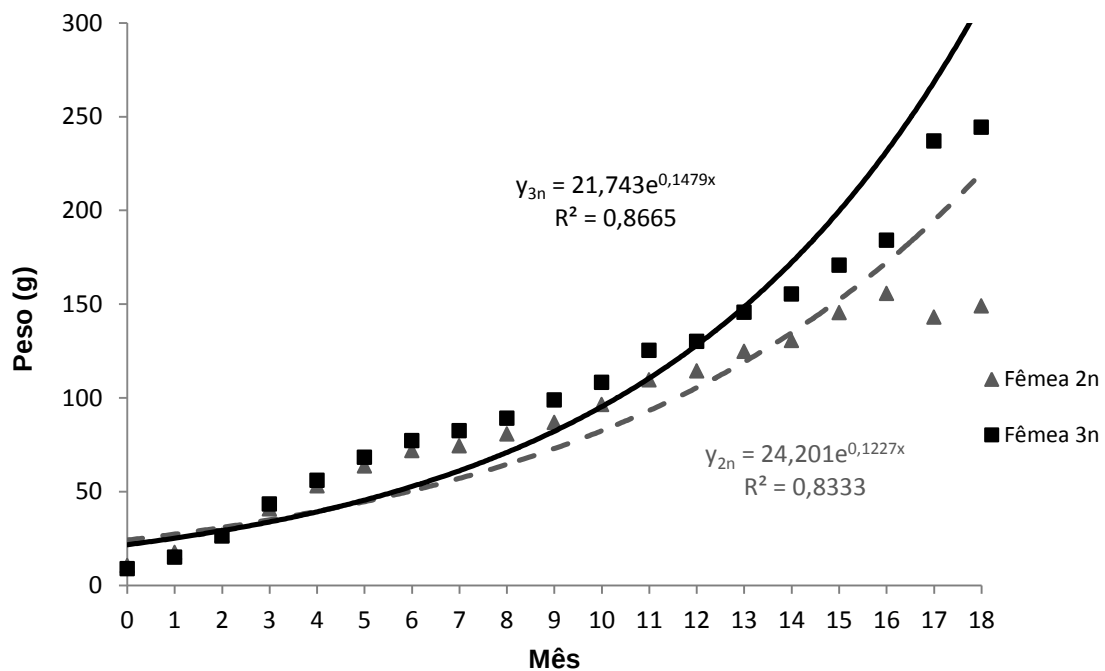


Figura 6. Peso (g) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).

Nos machos, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) comparando crescimento e peso de diploides e triploides. No entanto, machos das duas ploidias iniciaram com dados similares e ao atingir o mês 11, diploides (2n) apresentaram maior comprimento padrão e peso em relação aos machos triploides (3n) (Fig. 7 e 8).

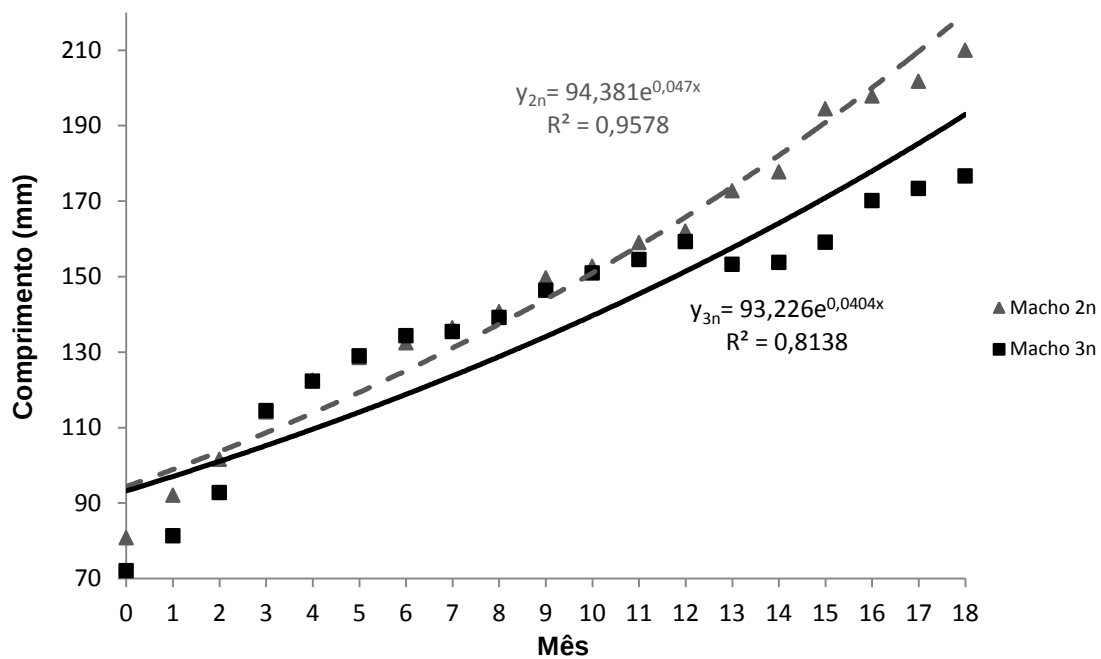


Figura 7. Comprimento padrão (mm) de machos 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).

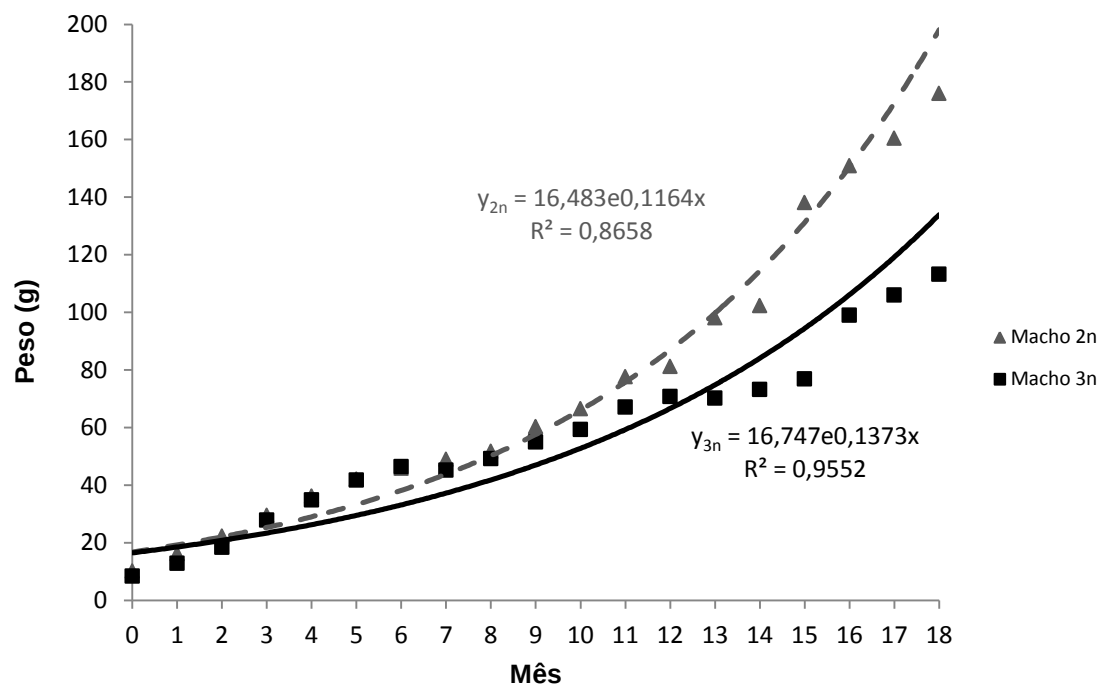


Figura 8. Peso (g) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).

2.2 Índice Gonadossomático (IGS)

Fêmeas 2n apresentaram valores de IGS superiores durante todo período experimental. Diferença significativa entre as duas ploidias foi observada em exemplares dos meses 6, 8, 12, 14, 16 e 18 ($P = 0,0157$) (Fig.9).

Para os machos, foram observados valores superiores para os 2n (Fig. 10), não apresentando diferença estatística. Contudo, este resultado foi baseado apenas nos meses que foram coletadas amostragens das duas ploidias. Vale ressaltar que as coletas de exemplares foram aleatórias, independente do sexo.

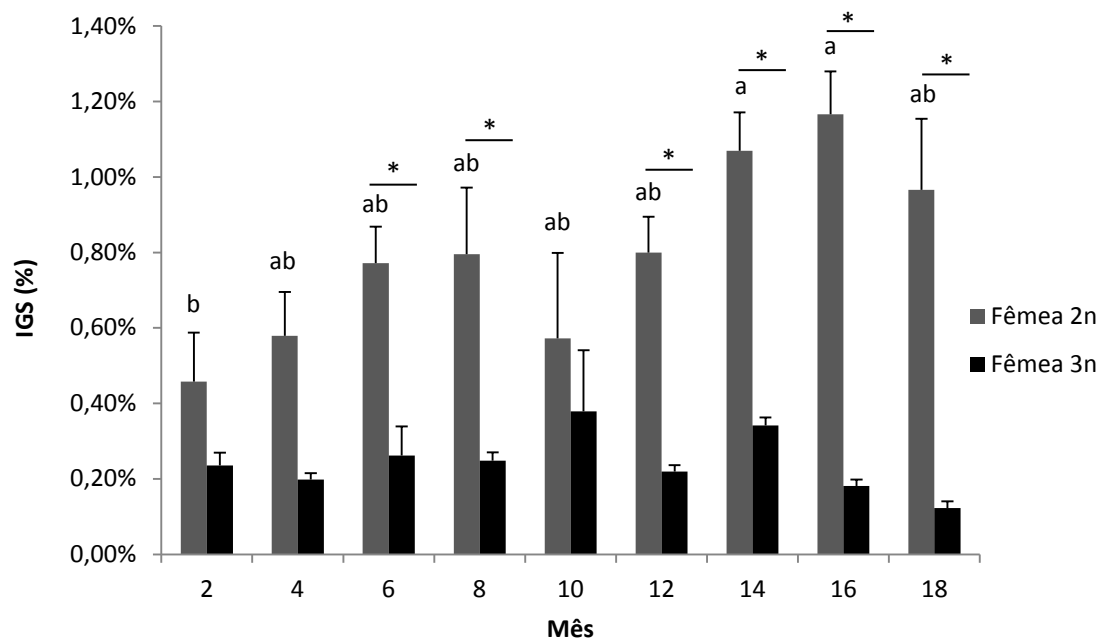


Figura 9. Índice gonadossomático (IGS, %) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Asteriscos indicam diferença estatística entre diploides e triploides ($t < 0,05$).

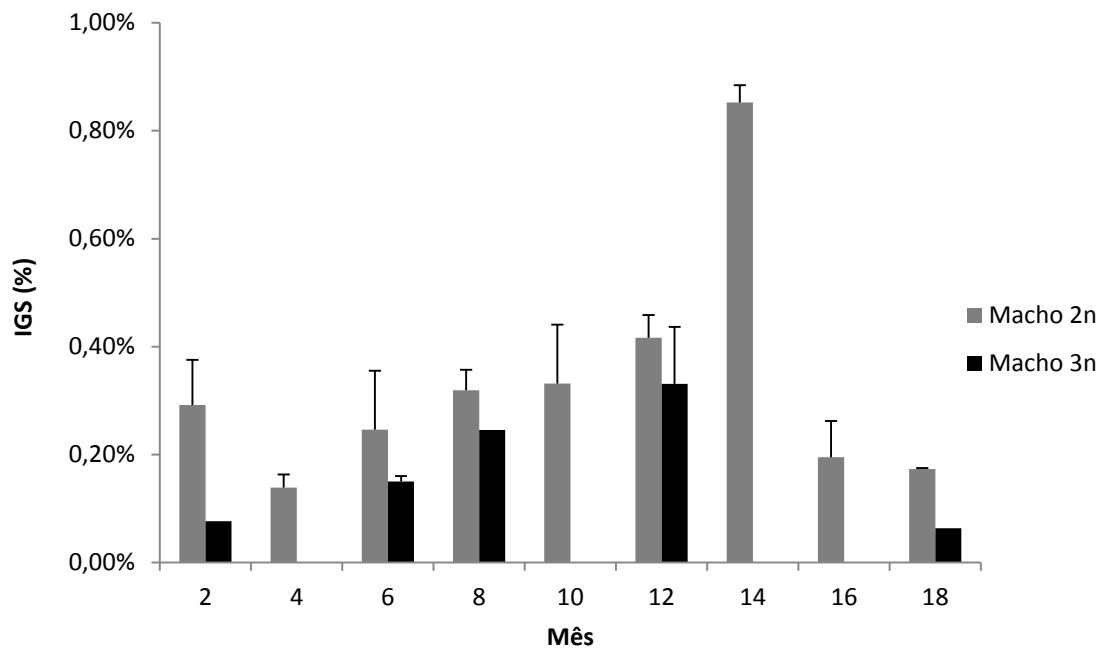


Figura 10. Índice gonadosomático (IGS, %) de machos 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença estatística entre diploides e triploides ($t > 0,05$).

2.3 Rendimento de Carcaça

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para o rendimento de carcaça entre fêmeas 2n e 3n (Fig. 11) e machos 2n e 3n (Fig. 12). Fêmeas de diferentes ploidias apresentaram valores semelhantes durante todo período experimental. Para os machos, este resultado foi baseado apenas nos meses que foram coletadas amostragens das duas ploidias.

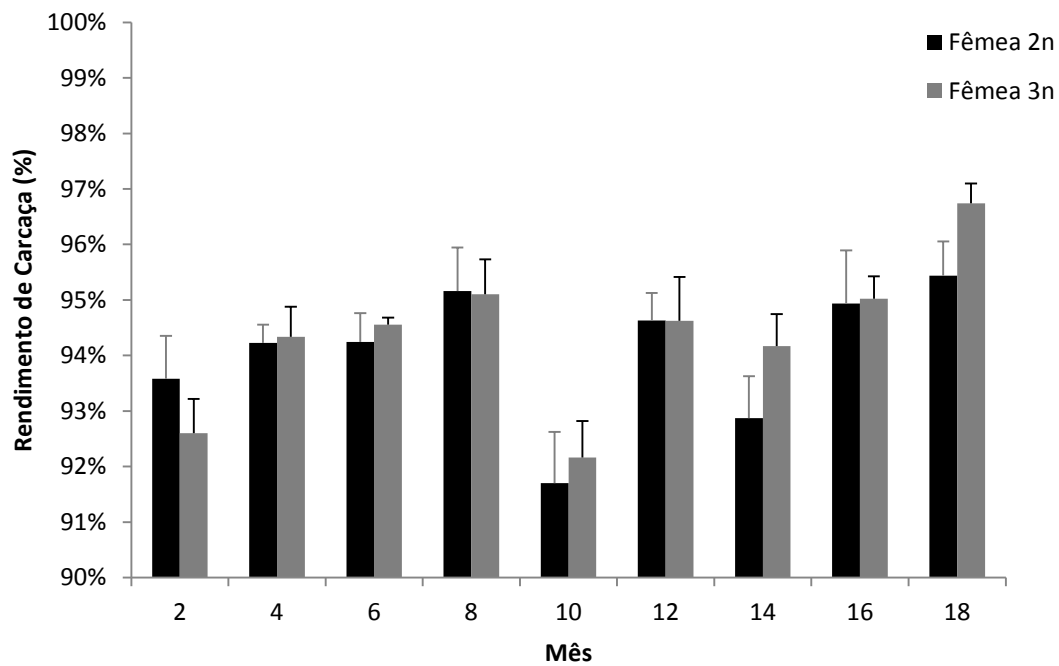


Figura 11. Rendimento de carcaça (%) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença significativa entre as ploidias ($t > 0,05$).

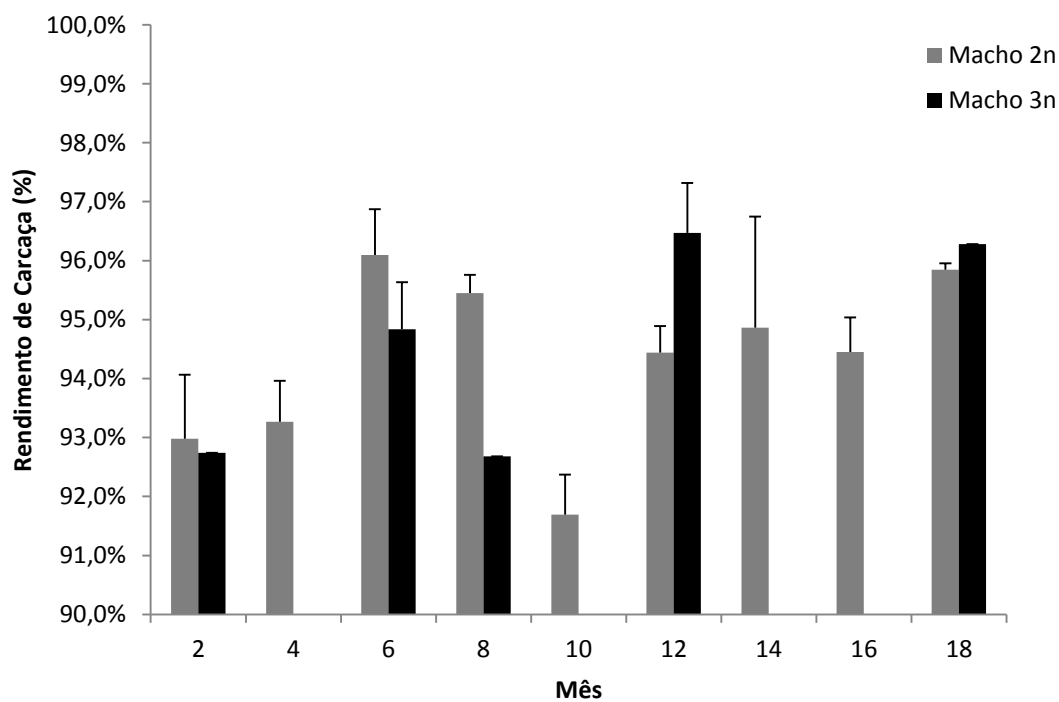


Figura 12. Rendimento de carcaça (%) de fêmeas 2n e 3n de *Pimelodus maculatus* durante 18 meses de coleta. Não foi observada diferença significativa entre as ploidias ($t > 0,05$).

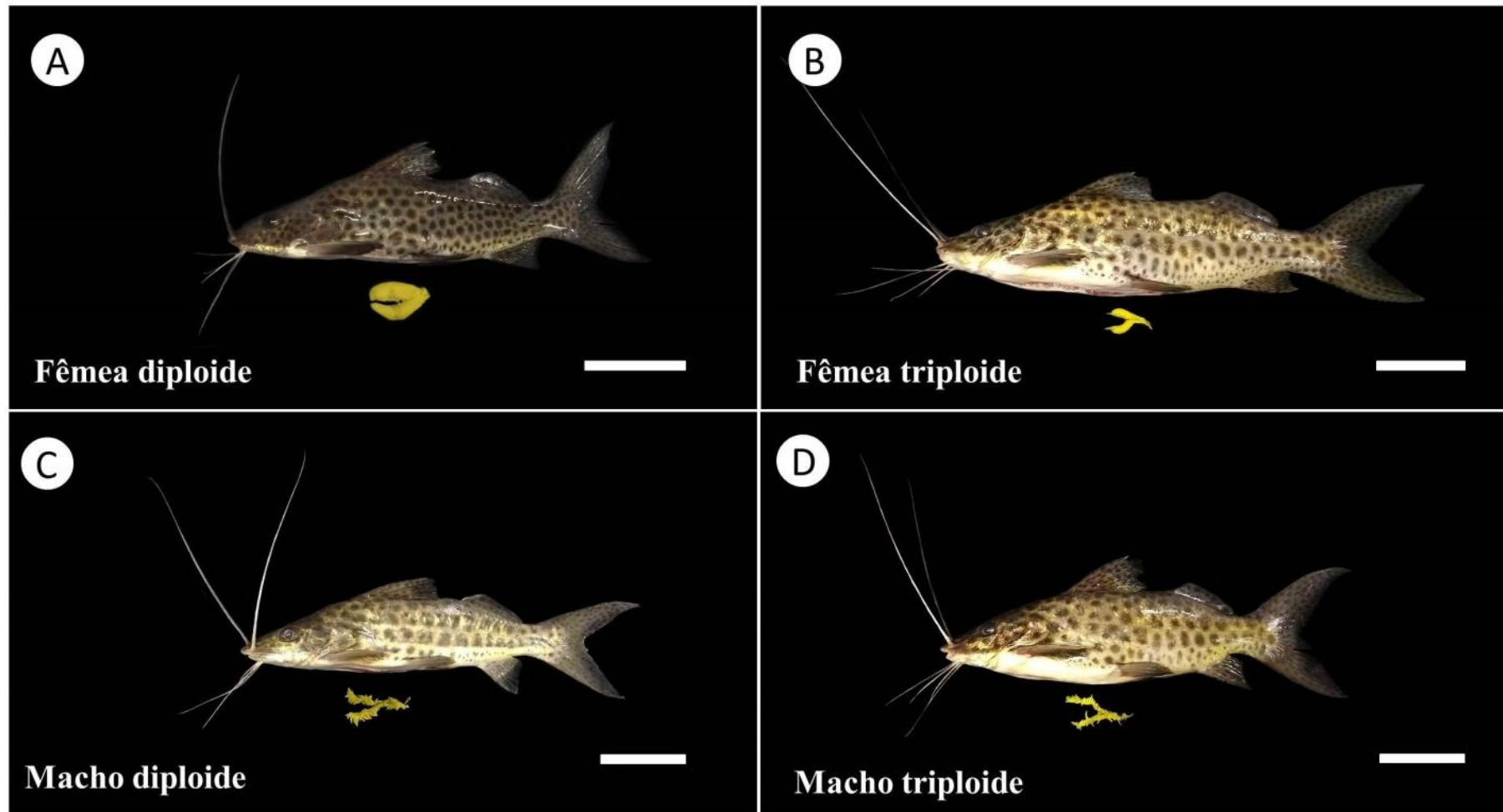


Figura 13. Morfologia externa de peixes e gônadas de *Pimelodus maculatus*. Fêmeas 2n (A) e 3n (B) e machos 2n (C) e 3n (D). Amostras do Mês 18. Escala: 5 cm.

2.4 Análise Histológica

De acordo com a classificação proposta por (BROWN-PETERSON et al., 2011), todas as fêmeas diploides ($2n$) de *P. maculatus* analisadas durante os meses de coletas se encontravam em fase de maturação, estando seus ovários repletos de oócitos em crescimento primário (fig. A; B). Por outro lado, gônadas de fêmeas triploides ($3n$) coletadas durante todo período experimental continham somente oogônias e algumas células apoptóticas (Tab. 1). Gônadas repletas de oogônias e poucos oócitos primários dispersos foram encontradas apenas a partir do mês 8, (Tab. 1) (Fig.1).

Machos $2n$ de *P. maculatus* apresentaram gametogênese normal, sendo identificadas todas as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides) (Fig. 2). Foram encontrados espécimes maduros a partir do mês 4 (Tab. 2), apresentando gônadas repletas de espermatozóides. Em machos $3n$, gônadas referente aos meses 2 e 4, continham somente espermatogônias. A partir do mês 6, foram encontradas gônadas pouco desenvolvidas e células germinativas chegando somente ao estágio de espermatídes. Não foram identificados espermatozoides formados.

Tabela 1. Fases de ovogênese identificadas em indivíduos diploides e triploides de *Pimelodus maculatus* durante os meses de coleta.

Mês de coleta	Ploidia	Fases de ovogênese de <i>P. maculatus</i>		N
		Estéril	Em desenvolvimento	
0	2n	-	5	5
	3n	2	-	2
2	2n	-	6	6
	3n	7	-	7
4	2n	-	6	6
	3n	10	-	10
6	2n	-	5	5
	3n	7	-	7
8	2n	-	4	4
	3n	8	-	8
10	2n	-	4	4
	3n	10	-	10
12	2n	-	3	3
	3n	7	-	7
14	2n	-	3	3
	3n	4	-	4
16	2n	-	2	2
	3n	4	-	4
18	2n	-	2	2
	3n	3	-	3

N= número de exemplares analisados

Tabela 2. Fases da espermatogênese identificadas em indivíduos diploides e triploides de *Pimelodus maculatus* durante os meses de coleta.

Mês de coleta	Ploidia	Fases de espermatogênese de <i>P. maculatus</i>				N
		Estéril	Em maturação	Maduro	Regredido	
0	2n	-	2	-	-	2
	3n	3	-	-	-	3
2	2n	-	2	-	-	2
	3n	1	-	-	-	1
4	2n	-	1	1	-	2
	3n	-	-	-	-	-
6	2n	-	1	1	-	2
	3n	3	-	-	-	3
8	2n	-	-	2	1	3
	3n	2	-	-	-	2
10	2n	-	-	2	1	3
	3n	-	-	-	-	-
12	2n	-	-	6	-	6
	3n	1	-	-	-	1
14	2n	-	-	2	-	2
	3n	-	-	-	-	-
16	2n	-	-	2	-	2
	3n	-	-	-	-	-
18	2n	-	-	2	-	2
	3n	1	-	-	-	1

N= número de exemplares analisados

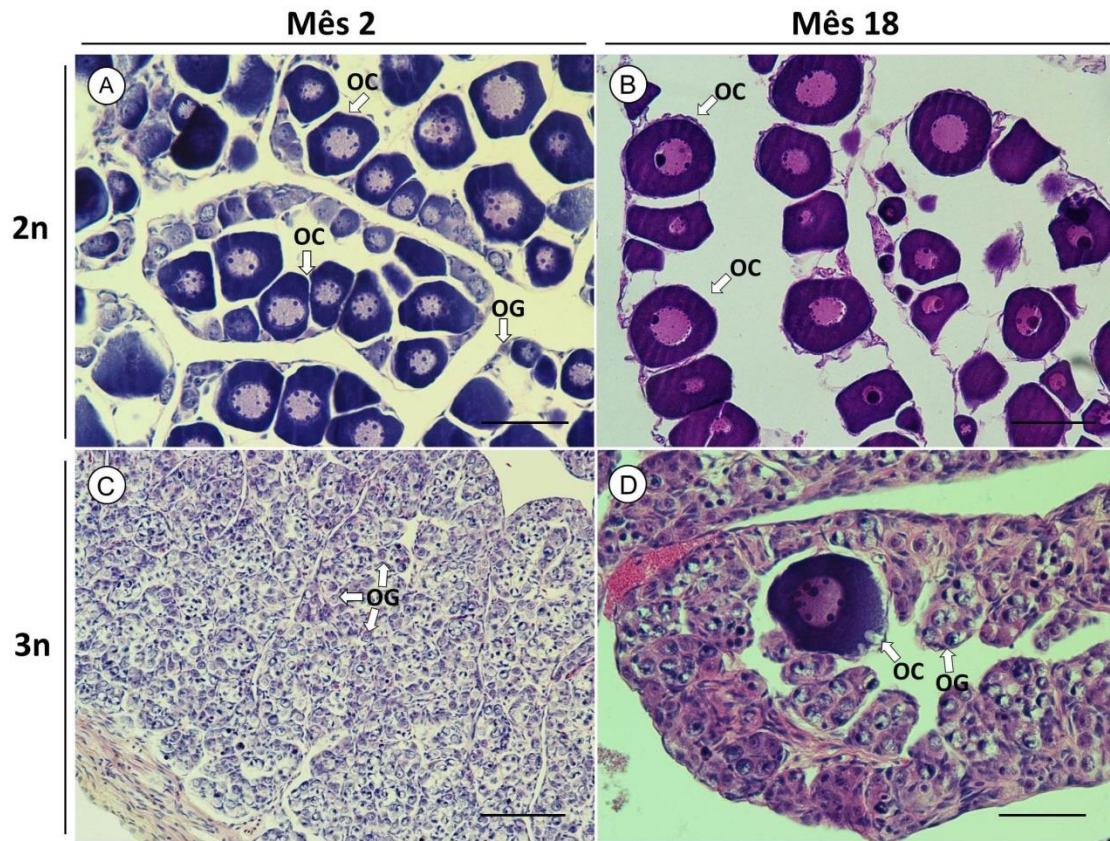


Figura 14. Histologia ovariana de fêmeas diploides e triploides de *Pimelodus maculatus*. Amostras do Mês 2 (A, C) e 18 (B, D). Fêmeas 2n em fase de maturação, oócitos em crescimento primário (A, B). Ovários imaturos de fêmeas 3n (C, D). Setas indicando oogônias (Og) e oócitos (Oc). Barra de escala, A e D: 50 µm; B e C: 100 µm.

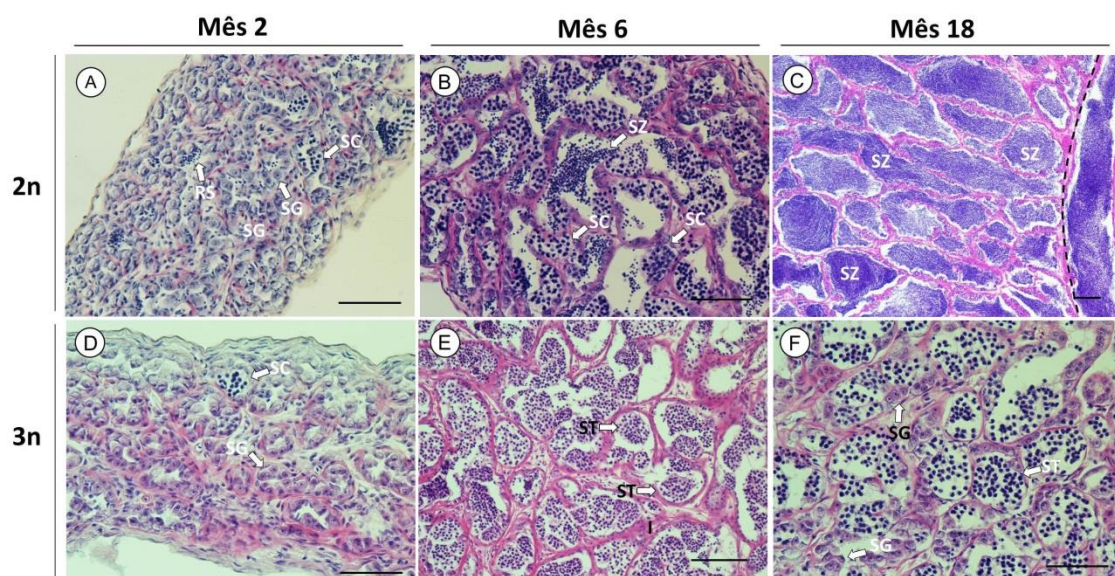


Figura 15. Histologia testicular de machos diploides e triploides de *Pimelodus maculatus*. Amostras do Mês 2 (A, D), 6 (B, E) e 18 (C, F). Gônadas em maturação inicial (A, D, E, F). Gônadas maduras (B, C). Setas indicando: SG, espermatogônias; SC, espermatócitos; ST, espermatídeos; SZ, espermatozoide; RS, espermatozoide residual; I, interstício. Linha tracejada indicando o ducto testicular principal. Barra de escala, A, B, D e E: 50 µm; C e F: 100 µm.

DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo foi obtido um eficiente protocolo para obtenção em larga escala de *P. maculatus* triploides. Em espécies nativas, poucos protocolos de triploidização foram descritos, como para *Astyanax altiparanae* (ADAMOV et al., 2016), *Rhamdia quelen* (HUERGO e ZANIBONI-FILHO, 2006) e *Piaractus mesopotamicus* (FORESTI; OLIVEIRA e CARVALHO, 1994). A utilização de peixes triploides é interessante para conservação e aquicultura, pois estes podem ser estéreis (PIFERRER et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2017). No tocante à produção, peixes estéreis são atrativos, pois a energia que seria utilizada para o desenvolvimento gonadal é empregada para o crescimento somático, levando também a um maior rendimento de carcaça (DO NASCIMENTO et al., 2017).

Referente à conservação, os peixes triploides estéreis podem ser empregados de duas formas. A primeira, na produção sustentável, ou seja, a aquicultura empregando-se peixes estéreis, pois, caso ocorra escapes para o meio ambiente, os impactos são reduzidos (DUNHAM, 2004). Adicionalmente, peixes triploides podem ser utilizados em estudos de quimerismo (OKUTSU et al., 2007). Nesta técnica, células germinativas de uma espécie (doadora) são transplantadas para outra (receptora), sendo que esta última poderá produzir gametas da espécie doadora (YOSHIKAWA et al., 2017). Esta ferramenta é muito importante para conservação, pois espécies ameaçadas de extinção podem ser geradas através da propagação mediada. No entanto, para que se obtenha sucesso na técnica, seria necessário que a espécie receptora seja estéril, garantindo que os gametas produzidos sejam provenientes unicamente da espécie doadora. Assim, caso seja estéril, o mandi (*P. maculatus*) triploide poderá ser futuramente empregado como

receptor de células germinativas em espécies ameaçadas extinção da ordem dos Siluriformes.

Em *A. altiparanae*, uma espécie nativa, já foi observado a possibilidade de esterilização utilizando a triploidização (DO NASCIMENTO et al., 2017). Apesar da existência de outros métodos para produção de peixes estéreis, tais como a utilização de Busulfan e altas temperaturas (DE SIQUEIRA-SILVA et al., 2015), a técnica de triploidização pode garantir a produção em massa de tais animais. Deste modo, estudos focados na avaliação da esterilidade na espécie estão em andamento.

No entanto, apesar da eficiência do protocolo, não foi possível obter 100% de peixes triploides. Resultados semelhantes também foram observados por ADAMOV et al. (2016) em *A. altiparanae*. Como os choques aplicados na indução de peixes triploides têm como objetivo inibir a liberação do segundo corpúsculo polar, estudos focados na determinação do exato momento que o mesmo é expulso poderão ser utilizados para otimização do protocolo, conforme descrito em *Astyanax altiparanae* (DOS SANTOS et al, 2016). Além disso, alternativa interessante é utilizar peixes tetraploides, os quais tem o potencial de gerar gametas diploides, garantindo assim a produção em massa de apenas peixes triploides após um simples cruzamento.

Em suma, a produção de peixes triploides foi otimizada empregando as seguintes condições: choque térmico de 38°C, 2 mpf e duração de 2 minutos. Utilizando-se esse procedimento, o percentual de peixes triploides foi de 96,7%, estes confirmados por citometria de fluxo, diâmetros nuclear dos eritrócitos e citogenética.

Em relação ao desempenho zootécnico são esperadas fêmeas 3n que apresentem maior crescimento e peso do comparados com fêmeas 2n, resultado comumente encontrado na literatura (PIFERRER et al., 2009), sendo relatado em triploides de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (TABATA; RIGOLINO e TSUKAMOTO, 1999),

bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL, 2010) e truta marrom (*Salmo trutta fario*) (KIZAK et al., 2013). No entanto, no presente trabalho, peixes diploides e triploides da espécie *P. maculatus* mantidos em condições laboratoriais, não atingiram o estágio de maturação, evento que requer grande dispêndio de energia, onde fêmeas 3n passam a apresentar vantagens no crescimento e superam as 2n (KOEDPRANG e NA-NAKORN, 2000; DUNHAM, 2004), sendo observada diferença no crescimento e peso, porém não significativa estatisticamente.

Quanto aos resultados do IGS, fêmeas 2n apresentaram valores mais altos, comparado com peixes 3n mesmo não atingindo o estágio de maturação, dados que evidenciam a gametogênese comprometida pela divisão meiótica irregular em triploides, não desenvolvendo como de peixes normais diplóides. No que se refere ao rendimento de carcaça, fêmeas de diferentes ploidias apresentaram valores semelhantes durante todo período experimental, valores que podem ser alterados após o estágio de maturação da espécie *P. maculatus*, onde em peixes estéreis, a energia que seria destinada para os processos reprodutivos seria convertida para o crescimento somático.

Para os machos, peixes 3n não apresentam vantagens na produção aquícola. Estes frequentemente exibem crescimento semelhante aos peixes 2n (DUNHAM, 2004; PERUZZI et al., 2009; FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL, 2010; KIZAK et al., 2013). Neste estudo não foi diferente, machos de ambas as ploidias iniciaram com dados de crescimento e peso crescentes e similares, porém os 2n finalizaram com valores maiores. O mesmo resultado foi observado em triploides de *Astyanax altiparanae* (DO NASCIMENTO et al., 2017). O resultado do IGS foi semelhante para ambas ploidias, fato também encontrado no Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e na Truta Marrom (*Salmo trutta fario*) (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL, 2010; KIZAK et al., 2013). Quanto ao rendimento de carcaça, os resultados também foram semelhantes para ambas

ploidias, sugerindo que em machos $3n$, não houve energia extra destinada ao crescimento somático, como observado por KIZAK et al. (2013). No entanto, machos $3n$ da espécie *P. maculatus* foram encontrados em menor quantidade e os resultados foram analisados somente nos meses com coletadas de ambas ploidias.

No que se refere ao aspecto reprodutivo da espécie *P. maculatus*, no presente estudo, em análises histológicas de fêmeas $2n$ foram observados ovários repletos de oócitos em crescimento primário classificados em fase de maturação, durante todo período experimental. Por outro lado, gônadas de fêmeas $3n$ continham somente oogônias, células apoptóticas, e poucos oócitos primários dispersos, podendo ser consideradas estéreis devido à pequena quantidade de oócitos primários quando comparadas com fêmeas $2n$.

Geralmente, fêmeas triploides apresentam esterilidade e os machos produzem gametas (PIFERRER et al., 2009). No entanto, neste estudo, machos $2n$ de *P. maculatus* apresentaram gametogênese normal, sendo identificadas todas as células da linhagem germinativa (espermátogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides), e os machos $3n$, apresentaram espermatogênese aparentemente normal, sendo identificadas espermatogônias e células germinativas chegando somente ao estágio de espermátides, mas nenhum espermatozóide formado foi observado (sem gametas), sendo considerados portanto machos estéreis.

Na literatura são encontradas explicações para tais resultados. De acordo com HULAK et al. (2010), nos machos a mitose de espermátogônias e formação de cistos de divisão de células são eventos pre-meioticos, o que explicaria o desenvolvimento gonadal mais comum em machos triploides. Krisfalusi e Coud (2011), afirma que nos machos este evento ocorre no final, explicando o desenvolvimento gonadal semelhante em machos $2n$ e $3n$. Enquanto nas fêmeas, a triploidização afeta o pareamento dos

cromossomos logo na fase inicial da meiose, motivo pelo qual os ovários não se desenvolvem, sendo sempre observados em desenvolvimento inicial.

Portanto, os resultados deste estudo mostram que fêmeas e machos $3n$ exibem gônadas em estágio imaturo. Deste modo, peixes $3n$ de *P. maculatus* podem ser considerados estéreis, pois foram incapazes de gerar gametas viáveis durante o período estudado.

CONCLUSÕES

- Foi obtido um eficiente protocolo de triploidização em *P. maculatus* utilizado choque quente (38°C , 2 mpf e duração de 2 minutos), o qual poderá ser aplicado em futuros estudos básicos e aplicados.
- Este trabalho mostrou que a triploidização pode ser utilizada para esterilização em larga escala da espécie *P. maculatus*, podendo ser utilizada como receptora de células germinativas-troco na técnica do quimerismo, ferramenta promissora para conservação espécies ameaçadas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMOV, N. S. D. M.; NASCIMENTO, N. F. D.; MACIEL, E. C. S.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L. L.; EVANGELISTA, M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. H. M.; FUJIMOTO, T. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2016. ISSN 1749-7345.

ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 205-228, 2001. ISSN 0044-8486.

BAIZ, M.; CABRERA, E. e CANDIA, C. Alimentación natural del bagre amarillo (*Pimelodus clarias*) de la zona de Punta Lara (Río de La Plata). **FAO CARPAS, Rio Janeiro**, p. 7, 1968.

BASILE, M.; GODINHO, H.; FENERICH, N.; BRANLEY, J. Influencia de factores abióticos sobre a maturacao dos ovarios de *Pimelodus maculatus* Lac. 1803. **Bol. Inst. Pesca (Sao Paulo)**, v. 4, n. 1, p. 1-28, 1975.

BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M. e SUGIEDA, A. M. Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo. **São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente**, 2009.

BROWN-PETERSON, N. J., WYANSKI, D. M., SABORIDO-REY, F., MACEWICZ, B. J., & LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, 3(1), 52-70. 2011

CAL, R.; VIDAL, S.; GÓMEZ, C.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; MARTÍNEZ, P.; PIFERRER, F. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v. 251, n. 1, p. 99-108, 2006. ISSN 0044-8486.

CALLISTO, M.; VONO, V.; BARBOSA, F. A.; SANTEIRO, S. M. Chironomidae as a food resource for *Leporinus amblyrhynchus* (Teleostei: Characiformes) and *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Siluriformes) in a Brazilian reservoir. **Lundiana**, v. 3, n. 1, p. 67-73, 2002.

DE RESENDE, E. Trophic structure of fish assemblages in the lower Miranda river, Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista brasileira de Biologia**, v. 60, n. 3, p. 389-403, 2000. ISSN 0034-7108.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DOS SANTOS SILVA, A. P.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033-1042, 2015. ISSN 0093-691X.

DO NASCIMENTO, N. F.; DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. **Zygote**, v. 25, n. 4, p. 537-544, 2017. ISSN 0967-1994.

DOS SANTOS, M. P., YASUI, G. S., XAVIER, P. L. P., DE MACEDO ADAMOV, N. S., DO NASCIMENTO, N. F., FUJIMOTO, T., ... & NAKAGHI, L. S. O. Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote**, 24(6), 795-807. 2016.

DUNHAM, R. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: genetic approaches**. CABI. ISBN 0-85199-596-9. 2004

FEINDEL, N. J.; BENFEY, T. J. e TRIPPEL, E. A. Competitive spawning success and fertility of triploid male Atlantic cod *Gadus morhua*. **Aquaculture Environment Interactions**, v. 1, n. 1, p. 47-55, 2010. ISSN 1869-215X.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. e CARVALHO, E. Ploidy evaluation in the pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes): techniques and comments. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, p. 31-37, 1994.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. e DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 810-813, 1993. ISSN 0014-4754.

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

GOUDIE, C. A.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B.; LIU, Q. Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. **Aquaculture**, v. 133, n. 3-4, p. 185-198, 1995. ISSN 0044-8486.

HAHN, N. S. e FUGI, R. Alimentação de peixes em reservatórios brasileiros: alterações e conseqüências nos estágios iniciais do repesamento. **Oecologia Australis**, v. 11, n. 4, p. 469-480, 2009. ISSN 2177-6199.

HELFMAN, G.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E.; BOWEN, B. W. **The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology**. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 1444311905.

HUERGO, G. M. e ZANIBONI-FILHO, E. Triploidy induction in Jundiá, *Rhamdia quelen*, through hydrostatic pressure shock. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 18, n. 4, p. 45-57, 2006. ISSN 1045-4438.

HULAK, M.; KASPAR, V.; PSENICKA, M.; GELA, D.; LI, P.; LINHART, O. Does triploidization produce functional sterility of triploid males of tench *Tinca tinca* (L.)? **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 20, n. 3, p. 307-315, 2010. ISSN 0960-3166.

ICMBIO. **Sumário executivo do Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** ." Sumário executivo do Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. "ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoesdiversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_da_fauna_brasileira_ameacada_de_extincao_2016.pdf p. 2016.

KIZAK, V.; GÜNER, Y.; TÜREL, M.; KAYIM, M. Comparison of growth performance, gonadal structure and erythrocyte size in triploid and diploid brown trout (*Salmo trutta fario* L, 1758). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 13, n. 4, 2013. ISSN 1303-2712.

KOEDPRANG, W. e NA-NAKORN, U. Preliminary study on performance of triploid Thai silver barb, *Puntius gonionotus*. **Aquaculture**, v. 190, n. 3-4, p. 211-221, 2000. ISSN 0044-8486.

KRISFALUSI, M., & CLOUD, J. G. Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, 284(4), 466-472. 1999.

LOBON-CERVIA, J. e BENNEMANN, S. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in Rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil). **Archiv für Hydrobiologie**, v. 149, n. 2, p. 285-306, 2000. ISSN 0003-9136.

MEES, G. F. **The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi)**. Brill, 1974.

NELSON, J. Fishes of the World. 2006. **Hoboken: John Wiley & Sons**, 2006.

NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; DE FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PloS one**, v. 5, n. 9, p. e12808, 2010. ISSN 1932-6203.

OKUTSU, T.; SHIKINA, S.; KANNO, M.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIZAKI, G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1517-1517, 2007. ISSN 0036-8075.

PERUZZI, S.; RUDOLFSSEN, G.; PRIMICERIO, R.; FRANTZEN, M.; KAURIĆ, G. Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 10, p. 1160-1169, 2009. ISSN 1365-2109.

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J.-C.; FLAJŠHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, n. 3, p. 125-156, 2009. ISSN 0044-8486.

PURDOM, C. Atypical modes of reproduction in fish. **Oxford reviews of reproductive biology**, v. 6, p. 303, 1984. ISSN 0260-0854.

RAMOS, I. P. Aspectos da biologia populacional de *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Siluiformes), sob a influência de sistemas de piscicultura em tanques-rede. 2009.

REIS, R.; ALBERT, J.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.; PETRY, P.; ROCHA, L. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016. ISSN 1095-8649.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. e FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003. ISBN 8574303615.

RIBEIRO, F. R.; LUCENA, C. A. e LUCINDA, P. H. Three new Pimelodus species (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio Tocantins drainage, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 3, p. 455-464, 2008. ISSN 1679-6225.

SACOBIE, C. F.; GLEBE, B. D.; BARBEAU, M. A.; LALL, S. P.; BENFEY, T. J. Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. **Aquaculture**, v. 334, p. 58-64, 2012. ISSN 0044-8486.

SILVA, E. L. D.; FUGI, R. e SEGATTI HAHN, N. Variações temporais e ontogenéticas na dieta de um peixe onívoro em ambiente impactado (reservatório) e em ambiente natural (baía) da bacia do rio Cuiabá. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 4, 2007. ISSN 1679-9283.

TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. e TSUKAMOTO, R. Y. Produção de lotes monosexos femininos triplóides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (PISCES, SALMONIDAE). III–Crescimento até idade de primeira maturação sexual. **Bol Inst Pesca**, v. 25, p. 67-76, 1999.

TAKEUCHI, Y.; YATABE, T.; YOSHIKAWA, H.; INO, Y.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. **Aquaculture**, 2016. ISSN 0044-8486.

THORGAARD, G. H. e GALL, G. A. Adult triploids in a rainbow trout family. **Genetics**, v. 93, n. 4, p. 961-973, 1979. ISSN 0016-6731.

XAVIER, P. L. P.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A.; SENHORINI, J. A.; SANTOS, S. A.; YASUI, G. S. A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 131, 2017. ISSN 1664-8021.

YASUI, G.; FUJIMOTO, T.; SAKAO, S.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Production of loach () 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. ISSN 1525-3163.

YOSHIKAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; INO, Y.; WANG, J.; IWATA, G.; KABEYA, N.; YAZAWA, R.; YOSHIZAKI, G. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). **Aquaculture**, v. 478, p. 35-47, 2017. ISSN 0044-8486.

YOSHIZAKI, G.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; IWASAKI, Y.; MIWA, M.; SHIKINA, S.; OKUTSU, T. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. **Development**, v. 137, n. 8, p. 1227-1230, 2010. ISSN 0950-1991.

YOSHIZAKI, G.; OKUTSU, T.; ICHIKAWA, M.; HAYASHI, M.; TAKEUCHI, Y. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. **Anim Reprod**, v. 7, n. 3, p. 187-96, 2010.