



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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

Lucas Henrique Piva
Médico Veterinário

Botucatu
2016

PRODUÇÃO DE PEIXES ESTÉREIS UTILIZANDO A HIBRIDAÇÃO E
A MANIPULAÇÃO CROMOSSÔMICA

LUCAS HENRIQUE PIVA

Orientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Senhorini

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

Botucatu – SP

2016

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

Piva, Lucas Henrique.

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

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

Orientador: George Shigueki Yasui

Coorientador: José Augusto Senhorini

Capes: 20400004

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

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

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

A quem me ajudou eu agradeço de coração. ”

— Alessandro Gallagher

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

Dedico.

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES pelo auxílio financeiro de bolsa de mestrado.

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

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

Lista de Figuras

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

Lista de Tabelas

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

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

Estabelecer um método eficaz para a produção massal de peixes estéreis combinando manipulação cromossômica e hibridação.

1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a viabilidade do cruzamento de fêmeas de *Astyanax altiparanae* com machos de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pintoii*, bem como a triploidização de tais híbridos;
- Verificar a ocorrência de espículas nas nadadeiras de fêmeas e machos dos híbridos obtidos;
- Caracterizar os peixes obtidos em relação à linhagem germinativa por meio de análise histológica das gônadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado 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), durante o período de 6 de dezembro de 2014 a 17 de setembro de 2015, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA #02031.000033/2015-11) e SISBIO 48167-1.

2.1. Origem dos peixes parentais

Para realização dos cruzamentos foram utilizados machos e fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto*i (Fig. 1). Para a identificação do sexo foi utilizado como critério a presença de espículas na nadadeira anal, que são detectáveis pelo tato e evidentes nos machos (GARUTTI, 2003). Fêmeas e machos de *A. altiparanae* foram obtidos do plantel de reprodutores do CEPTA/ICMBio, os quais foram mantidos em tanques escavados de 1000 m². Machos de *A. fasciatus* e *A. schubarti* foram capturados no Rio Mogi Guaçu, na cidade de Pirassununga-SP, (21°55'45" S, 47°22'21" O) entre os meses de outubro e novembro de 2014, com tarrafa de 18 metros de abertura e malha de 15 mm, e mantidos em tanques escavados. Machos de *O. pinto*i foram coletados no reservatório de armazenamento de água do CEPTA com tarrafas semelhantes e mantidos em tanques externos. Machos de *H. anisitsi* foram adquiridos no comércio local, e mantidos em aquários de 200 L com fotoperíodo de 12 horas de luz. Os peixes receberam alimentação duas vezes ao dia, composta por ração comercial extrusada de diâmetro de 3 mm (45% de PB e 3800 kcal kg⁻¹).

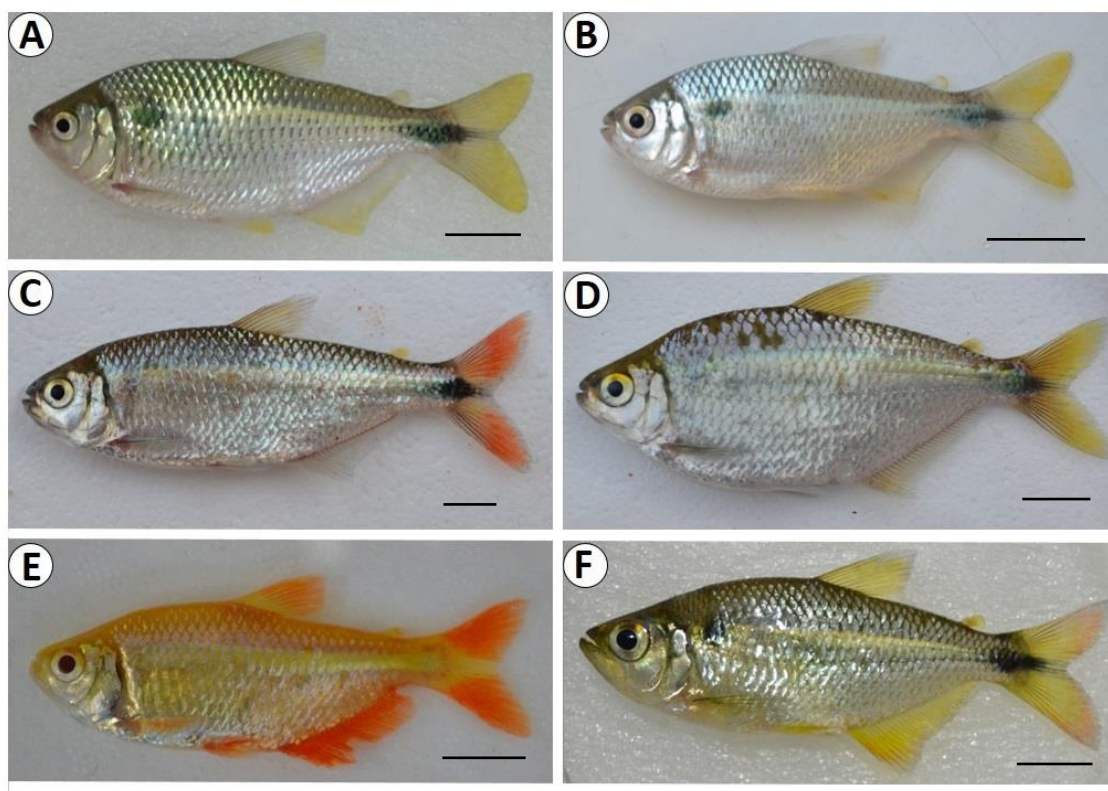


Fig. 1. Peixes parentais das espécies utilizadas nos cruzamentos. **A.** Fêmea de *Astyanax altiparanae*. **B.** Macho de *Astyanax altiparanae*. **C.** Macho de *Astyanax fasciatus*. **D.** Macho de *Astyanax schubarti*. **E.** Macho de *Hyphessobrycon anisitsi*. **F.** Macho de *Oligosarcus pintoii*. Barra 1 cm.

2.2. Obtenção de gametas, fertilização e triploidização

O experimento foi realizado em três repetições nos dias 06, 10 e 30 de dezembro de 2014. Em cada repetição foram induzidos uma fêmea e um macho de *Astyanax altiparanae*, e um macho de cada uma das demais espécies experimentais. As matrizes foram induzidas hormonalmente à reprodução com Ovopel® [(D-Ala6, Pro9-NEt) - mGnRH + metoclopramide] (3 mg kg⁻¹ para machos e fêmeas) e transferidas para aquários de 600 L, com média de temperatura da água a 28°C (YASUI et al., 2015). Após 200 horas-grau, e ao ser observado comportamento reprodutivo da fêmea (natação acelerada e movimentos ascendentes na coluna d'água), os peixes parentais foram imediatamente transferidos para solução anestésica de 2-fenoxietanol a 0,7‰ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), visando assim assegurar o bem-estar durante os procedimentos

experimentais. Primeiramente, amostras de sêmen das cinco espécies foram coletadas utilizando-se micropipeta Eppendorf de 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), e transferidas para macrotubos de 1,5 mL contendo 300 µL de solução de Ringer modificada (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl₂, 2,1 mM MgCl₂), e homogeneizado, segundo metodologia definida por YASUI *et al.* (2015). A qualidade do sêmen foi avaliada observando-se a motilidade espermática segundo os critérios de Yasui *et al.* (2008; 2009; 2012). Em seguida, os oócitos de *A. altiparanae* coletados por meio de extrusão (Fig. 2A) foram divididos em cinco alíquotas e transferidos para placas de Petri revestida com filme plástico PVC.

Posteriormente, a cada alíquota de oócitos de *A. altiparanae* foram adicionados 50 µL de sêmen diluído de cada uma das espécies descritas acima (Fig. 2B), incluindo o de *A. altiparanae* (grupo controle). Os gametas foram ativados com a adição de 3 mL de água destilada e homogeneizados vigorosamente por um minuto. Após esse período, a cada alíquota foram adicionados 50 mL de água e os ovos já fertilizados de cada cruzamento foram divididos em dois grupos, sendo um deles submetido a choque térmico de intensidade 40°C, dois minutos após a fertilização (Fig. 1C), segundo metodologia definida por ADAMOV *et al.*, (In Press).

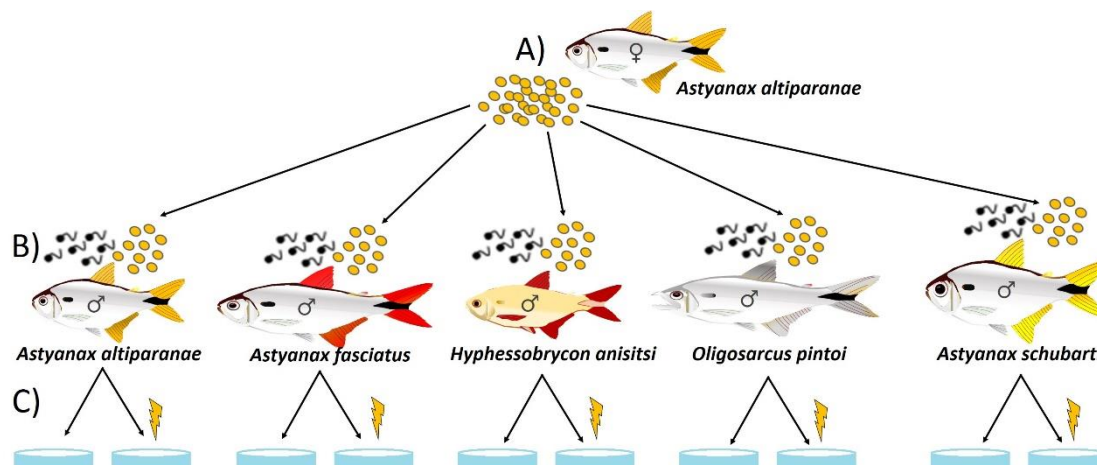


Fig. 2. Procedimentos de hibridação e manipulação cromossômica. **A.** Obtenção de oócitos de *Astyanax altiparanae*. **B.** Separação dos oócitos em cinco alíquotas e fertilização com sêmen de *Astyanax altiparanae* (controle), *Astyanax fasciatus*, *Astyanax schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pintoii*. **C.** Separação da alíquota de cada cruzamento em dois grupos, e indução de um dos grupos de cada cruzamento à triploidização, com aplicação de choque térmico dois minutos pós fertilização a 40°C e duração de dois minutos. Esse delineamento experimental foi realizado em triplicatas, utilizando-se diferentes peixes parentais em cada repetição.

2.3. Desenvolvimento embrionário e confirmação de ploidia

Cerca de 100 ovos de cada unidade experimental foi separada para o acompanhamento do desenvolvimento embrionário, em estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão), observando-se a sobrevivência nos estágios de 2 células, blástula, gástrula, segmentação e eclosão, além da porcentagem de larvas normais (Fig. 3), conforme descrito por PEREIRA-SANTOS (2014). Das larvas resultantes de cada parcela, foram utilizados 20 indivíduos para mensuração da ploidia, em citometria de fluxo.



Fig. 3. Estágios do desenvolvimento embrionário e larva normal e anormal de *Astyanax altiparanae*. A. Duas células. B. Blástula. C. Gástrula. D. Segmentação. E. Eclosão: larva normal. F. Eclosão: larva anormal (Adaptado de PEREIRA-SANTOS, com autorização do autor).

2.4. Larvicultura e manutenção das progênes até a fase adulta

As larvas resultantes de cada cruzamento foram alocadas em recipientes plásticos (1 L), os quais foram mantidos em incubadoras (tipo B.O.D.) com temperatura controlada a 27°C. A limpeza e troca total da água foi realizada diariamente. A partir do terceiro dia pós-eclosão, quando se observou a abertura da boca, foi iniciada a alimentação exógena das pós larvas com o oferecimento de náuplios de *Artemia salina* três vezes ao dia até o 15º dia após a eclosão, segundo protocolo descrito por BERTOLINI (2015).

Após esse período, os peixes passaram a receber, juntamente aos náuplios de *Artemia*, ração comercial para peixes em pó (45% PB; 3800 kcal Kg⁻¹). Com o crescimento dos juvenis, a granulometria da ração foi aumentada de modo a adequar-se ao tamanho do animal. No 30º dia os peixes foram realocados em aquários (40 L) em sistema fechado com bomba de recirculação com vazão 4000 L/h (133 L/h/aquário) e temperatura mantida a 27°C. Os aquários foram sifonados diariamente e foi fornecida ração comercial extrusada de diâmetro de 3 mm, três vezes ao dia (45% PB, 3800 kcal Kg⁻¹) por um período de nove meses.

2.5. Biometria final

Após os peixes atingirem nove meses pós-fertilização, 16 fêmeas e 16 machos provenientes de cada cruzamento foram sacrificados em solução anestésica de 2-fenoxietanol a 0,7‰ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sendo mensurados o peso total (g), comprimento padrão (mm) e peso das gônadas (g).

2.6. Confirmação da ploidia

Amostras de tecido muscular foram congeladas (-80°C), e a ploidia dos animais foi determinada por citometria de fluxo, conforme descrito por XAVIER (2013). Para tal, as amostras foram transferidas em solução de lise celular, modificado de ARUMUGANATHAN e EARLE (1991), para extração dos núcleos. Os núcleos foram corados com 1 mL de solução de Dulbecco's PBS contendo o corante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindone dihidroclorido (DAPI) 5 µg mL⁻¹. Após dez minutos, as amostras foram filtradas em malha de 30 µm (Celltrics, Partec, Alemanha) e processadas em citômetro de fluxo (Partec Cyflow Plody Analyser, Partec, Alemanha). A confirmação da ploidia de cada amostra foi baseada na comparação com o pico haploide obtido do sêmen do grupo controle (*A. altiparanae*).

2.7. Caracterização da linhagem germinativa

As gônadas de cada peixe foram removidas, seccionadas transversal e longitudinalmente e fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, incluídas em paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seccionadas (5,0 µm) em micrótomo (LEICA, RM 2235, Alemanha) equipado com lâmina de aço, e coradas em hematoxilina e eosina. O material foi então observado em microscópio (Nikon, Eclipse Ci-L, Tokyo, Japão) acoplado a uma

câmera tipo CCD (Nikon, DS-Fi1, Tokyo, Japão). As imagens digitais foram capturadas utilizando-se o software Nikon Nis-Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japão). A análise histológica permitiu identificar gônadas maduras e imaturas para machos e fêmeas.

2.8. Observação de espículas sexuais

As nadadeiras anais de 10 peixes híbridos de cada tratamento (5 machos e 5 fêmeas), foram diafanizadas utilizando-se o protocolo adaptado de POTTHOFF (1984). As amostras fixadas em solução de formol a 5% foram lavadas em água destilada (24 horas), logo após desidratadas em duas soluções crescentes de álcool (50% e 95%; 24 horas cada). Na sequência, foi realizada a coloração de cartilagens com a imersão das nadadeiras em solução de Azul de Alcian (30% de azul de alcian diluído em 60% álcool absoluto e 40% ácido acético; 24 horas). Posteriormente, as amostras foram imersas em solução saturada de Borato (5 h), solução de branqueamento (2 h, 3% H₂O₂ em KOH 2%) e solução de clareamento (7 h, 35% de solução de borato saturado e 65% de H₂O₂ em água destilada). Na última etapa da diafanização os ossos são corados com o corante Alizarina (Alizarina 2% em solução de KOH 2%) por 24 horas. As amostras já diafanizadas são então preservadas em soluções crescentes de glicerina (solução de preservação Glicerina a 30% e 60% diluídas em KOH 2%, ambas por 24 horas) e depois mantidas em Glicerina + Timol até posterior tomada de imagens (PIVA, 2014).

2.9. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão. Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Sendo atendidas tais premissas, foi

realizada análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas por meio do teste de Tukey para comparação múltipla entre as médias. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica® 8.0, sendo aplicado o nível de significância (p) de 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação do desenvolvimento embrionário e confirmação de ploidia

Os dados do desenvolvimento embrionário nos diferentes cruzamentos estão explícitos na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) nos valores das taxas de sobrevivência dos embriões provenientes dos cruzamentos realizados em nenhuma das fases de desenvolvimento, bem como, nos valores das taxas de eclosão e porcentagem de larvas normais (Tabela 1). Todos os embriões atingiram o estágio de eclosão e apresentaram desenvolvimento padrão normal conforme observado no grupo controle (diploide).

Tabela 1. Desenvolvimento de embriões diploides e triploides provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligossarcus pinto*. Os dados foram obtidos de triplicatas e estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

Espécie doadora de sêmen	Proporção 2n/3n	Clivagem	Blástula (%)	Gástrula (%)	Segmentação (%)	Eclosão (%)	Larvas normais (%)	N
<i>Astyanax altiparanae</i>	57/3	94,01 $\pm$ 0,73	86,39 $\pm$ 4,07	79,91 $\pm$ 6,10	76,44 $\pm$ 7,40	64,17 $\pm$ 9,58	77,42 $\pm$ 9,39	359
	8/52	89,15 $\pm$ 0,38	81,98 $\pm$ 1,98	81,39 $\pm$ 1,72	77,97 $\pm$ 2,87	75,54 $\pm$ 2,90	76,27 $\pm$ 10,15	413
<i>Astyanax fasciatus</i>	55/2	93,27 $\pm$ 1,98	86,05 $\pm$ 6,07	84,74 $\pm$ 5,87	83,07 $\pm$ 5,51	75,57 $\pm$ 9,00	90,91 $\pm$ 4,26	304
	1/39	94,99 $\pm$ 0,79	92,24 $\pm$ 0,78	89,30 $\pm$ 1,50	84,55 $\pm$ 2,87	67,40 $\pm$ 5,18	66,01 $\pm$ 16,35	360
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	60/0	85,39 $\pm$ 6,27	78,40 $\pm$ 10,40	76,74 $\pm$ 9,66	76,16 $\pm$ 9,47	71,95 $\pm$ 8,19	85,31 $\pm$ 10,71	339
	13/42	86,46 $\pm$ 7,31	76,87 $\pm$ 10,08	74,70 $\pm$ 10,00	71,09 $\pm$ 11,52	66,13 $\pm$ 11,93	81,90 $\pm$ 8,12	520
<i>Oligosarcus pinto</i>	28/0	83,91 $\pm$ 9,71	79,63 $\pm$ 9,73	67,90 $\pm$ 2,31	64,71 $\pm$ 0,88	61,52 $\pm$ 4,07	81,69 $\pm$ 15,03	283
	4/31	89,16 $\pm$ 10,84	77,99 $\pm$ 15,34	74,29 $\pm$ 14,05	70,44 $\pm$ 16,22	59,61 $\pm$ 5,39	79,74 $\pm$ 0,26	220
<i>Astyanax schubarti</i>	35/3	87,44 $\pm$ 5,35	81,59 $\pm$ 3,98	80,04 $\pm$ 2,43	79,01 $\pm$ 1,40	76,43 $\pm$ 1,18	92,04 $\pm$ 0,26	292
	9/31	81,62 $\pm$ 6,97	75,55 $\pm$ 9,35	70,62 $\pm$ 7,24	68,54 $\pm$ 7,97	61,76 $\pm$ 4,01	86,14 $\pm$ 6,55	452

3.2. Larvicultura e desenvolvimento inicial

O cultivo de todos os descendentes em sistema laboratorial desde a eclosão até a fase adulta apresentou viabilidade satisfatória $\geq 60\%$. Na Fig. 4 estão representados os quatro híbridos em fase adulta obtidos por meio dos cruzamentos e na Tabela 2 são expressas as características biométricas e somáticas dos peixes resultantes dos diferentes cruzamentos.

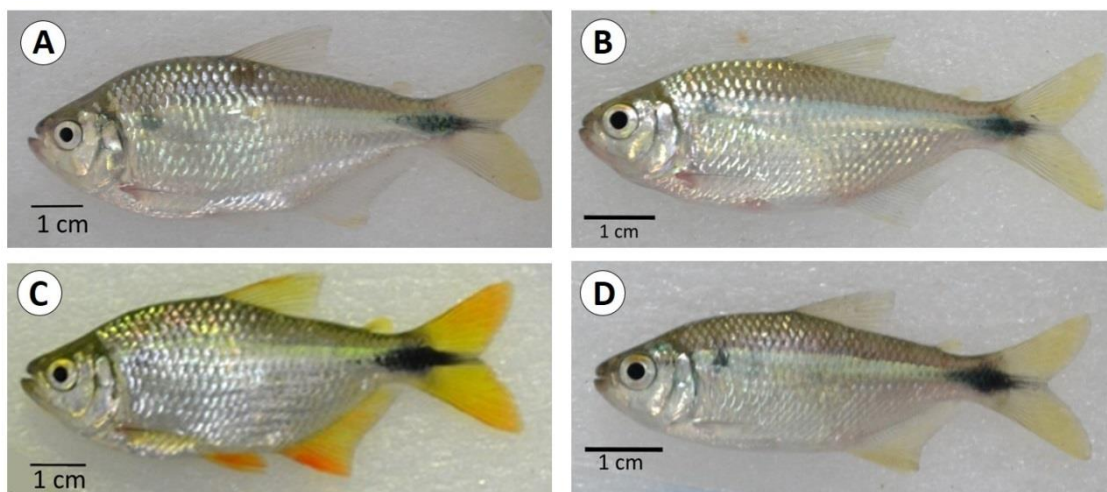


Fig. 4. Híbridos resultantes dos cruzamentos realizados entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de **A.** *A. fasciatus*. **B.** *A. schubarti*. **C.** *Hyphessobrycon anisitsi*. **D.** *Oligosarcus pintoii*.

Tabela 2. Características biométricas e somáticas, e número de peixes provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae* (controle), *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto*.

Espécie doadora de sêmen	Ploidia	Sexo	Comprimento padrão (mm)	Altura (mm)	Peso total (g)	Peso carcaça (g)	IGS	N
<i>Astyanax altiparanae</i>	2n	Fêmea	63,12 ± 4,07	26,37 ± 3,54	8,30 ± 0,80	6,60 ± 0,69	0,18 ± 0,01	12
		Macho	53,32 ± 2,84	21,12 ± 0,44	4,82 ± 0,32	4,24 ± 0,27	0,04 ± <0,01	7
	3n	Fêmea	58,77 ± 2,11	21,53 ± 0,77	7,07 ± 0,49	5,49 ± 0,42	0,03 ± 0,02	16
		Macho	51,70 ± 3,24	20,53 ± 2,92	3,51 ± 0,30	3,19 ± 0,22	0,04 ± <0,01	12
<i>Astyanax fasciatus</i>	2n	Fêmea	45,86	18,99	4,5	8,78	<0,01	1
		Macho	49,32 ± 1,72	18,07 ± 1,70	4,65 ± 0,52	4,11 ± 0,42	0,02 ± 0,02	5
	3n	Fêmea	50,45 ± 2,91	17,89 ± 0,94	5,48 ± 0,80	4,90 ± 0,76	<0,01	4
		Macho	58,47 ± 2,04	19,97 ± 0,79	7,05 ± 0,75	6,24 ± 0,62	0,01 ± <0,01	14
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	2n	Fêmea	56,60 ± 1,85	21,82 ± 1,04	6,13 ± 0,44	5,46 ± 0,41	0,02 ± 0,01	13
		Macho	46,93 ± 1,97	18,31 ± 0,80	4,27 ± 0,28	3,52 ± 0,25	0,03 ± 0,01	9
		Indiferenciado	49,88	19,45	4,79	4,43	<0,01	1
		Fêmea	54,78	20,66	5,13	4,94	0,01	1
	3n	Macho	45,51 ± 2,92	17,64 ± 0,91	3,66 ± 0,33	3,33 ± 0,21	0,03 ± <0,01	6
		Indiferenciado	50,04 ± 4,45	18,15 ± 2,46	4,80 ± 1,59	4,26 ± 1,19	<0,01	2
<i>Oligosarcus pinto</i>	2n	Fêmea	48,12 ± 1,48	18,62 ± 1,74	3,65 ± 0,31	3,22 ± 0,15	0,05 ± 0,05	4
		Macho	46,94 ± 2,23	18,23 ± 0,93	3,23 ± 0,37	2,88 ± 0,29	0,02 ± <0,01	8
		Indiferenciado	52,28 ± 3,68	16,70 ± 0,52	4,64 ± 1,30	4,01 ± 1,05	<0,01	3
	3n	Fêmea	44,70	17,55	3,14	2,97	<0,01	1
		Macho	48,80 ± 1,31	18,80 ± 0,56	3,81 ± 0,27	3,39 ± 0,24	0,02 ± <0,01	11
<i>Astyanax schubarti</i>	2n	Fêmea	47,70 ± 2,68	19,40 ± 1,42	4,11 ± 0,43	3,75 ± 0,45	<0,01	6
		Macho	45,26 ± 1,90	17,11 ± 1,22	3,15 ± 0,25	2,77 ± 0,21	0,01 ± <0,01	8
	3n	Macho	46,26 ± 1,83	17,30 ± 0,86	3,43 ± 0,39	2,91 ± 0,31	0,02 ± <0,01	11

3.3. Análise histológica

De uma forma geral, fêmeas híbridas diploides e triploides apresentaram maior quantidade de peixes estéreis em relação aos machos (Tabela 3). As observações histológicas dos ovários dos diferentes cruzamentos estão ilustradas na Fig. 5. Conforme esperado, fêmeas diploides de *Astyanax altiparanae* apresentaram gametogênese normal, observando-se células germinativas em diversos estádios de maturação, inclusive oócitos vitelogênicos (Fig. 5A). Da mesma forma, fêmeas híbridas diploides de *A. schubarti* também apresentaram, em sua maioria, gametogênese normal (Fig. 5D). Por outro lado, fêmeas triploides de *A. altiparanae*, fêmeas híbridas diploides e triploides de *A. fasciatus*, fêmeas diploides híbridas de *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto* foram, predominantemente, estéreis (Tabela 3). A análise histológica dos ovários revelou que, com exceção de híbridos de *H. anisitsi*, onde foram encontrados oócitos em crescimento primário, foram observadas apenas oogônias.

As análises histológicas dos machos obtidos nos diferentes cruzamentos estão expressas na Tabela 3 e ilustrados na Fig. 6. Em relação aos machos, os diploides de *A. altiparanae* (Fig. 6A), os híbridos diploides e triploides de *H. anisitsi* (Fig. 6E) e *O. pinto* (Fig. 6F) e os híbridos triploides de *A. schubarti* (Fig. 6D) apresentaram, em sua maioria, gametogênese normal (Tabela 3), tendo-se observado em todos os casos, espermatozoides. Por outro lado, todos os machos triploides de *A. altiparanae* (Fig. 6B) e híbridos triploides de *A. fasciatus* foram estéreis (Tabela 3) sendo que nos últimos foram observadas apenas células da linhagem somática nos testículos (Fig. 6C).

Tabela 3. Gametogênese de indivíduos diploides e triploides provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. altiparanae*, *A. fasciatus*, *A. schubarti*, *Hyphessobrycon anisitsi* e *Oligosarcus pinto*.

Espécie doadora de sêmen	Ploidia	Sexo	Gametogênese		N
			Normal	Estéril	
<i>Astyanax altiparanae</i>	2n	Fêmea	12	0	12
		Macho	7	0	7
	3n	Fêmea	2	14	16
		Macho	0	12	12
<i>Astyanax fasciatus</i>	2n	Fêmea	0	1	1
		Macho	2	3	5
	3n	Fêmea	0	4	4
		Macho	0	14	14
<i>Astyanax schubarti</i>	2n	Fêmea	4	2	6
		Macho	3	5	8
	3n	Macho	6	5	11
<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>	2n	Fêmea	0	13	13
		Macho	9	0	9
		Indiferenciado	0	1	1
	3n	Fêmea	1	0	1
		Macho	6	0	6
		Indiferenciado	0	2	2
<i>Oligosarcus pinto</i>	2n	Fêmea	1	3	4
		Macho	7	0	7
		Indiferenciado	0	3	3
	3n	Fêmea	0	1	1
		Macho	10	0	10

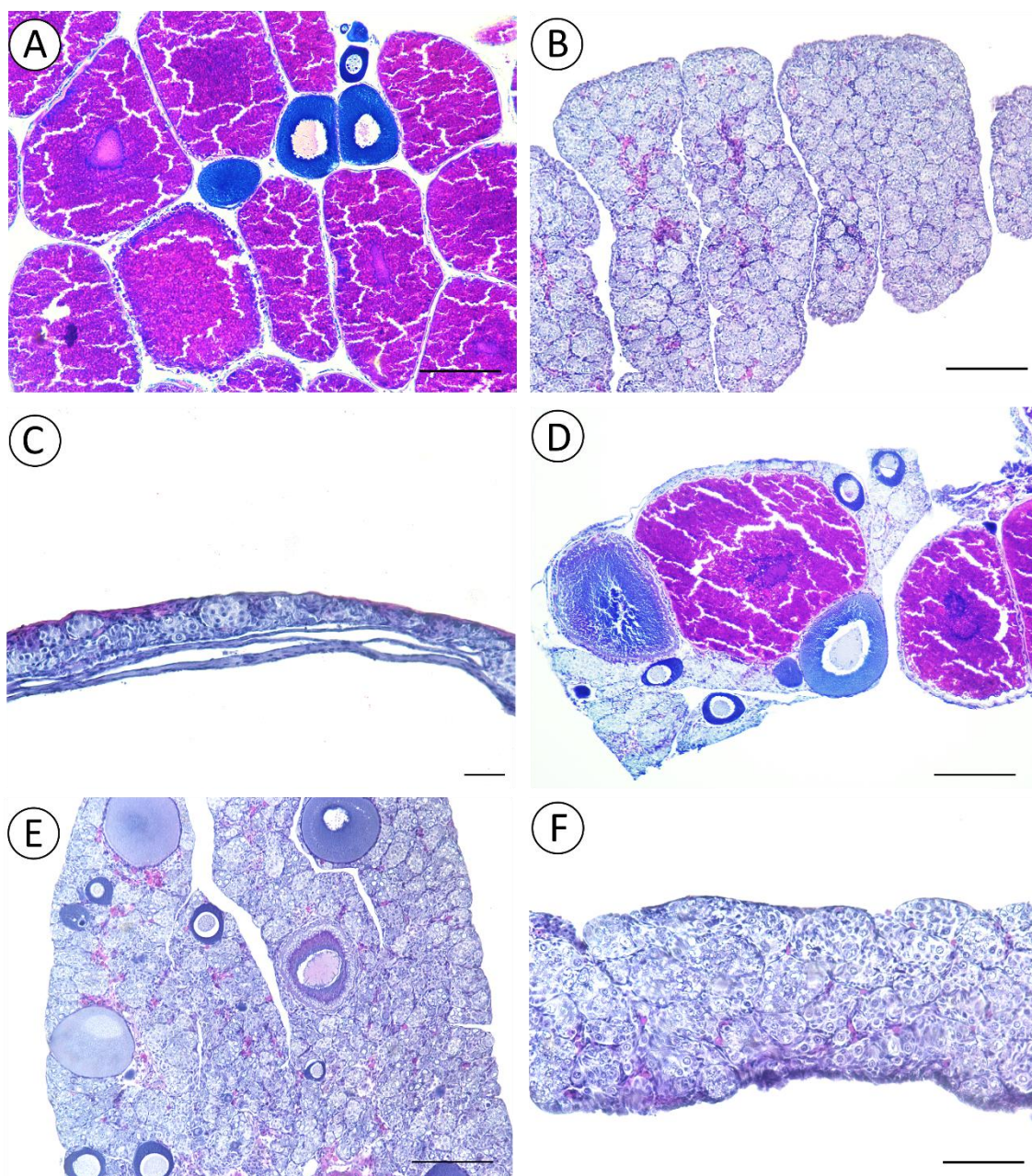


Fig. 5. Caracterização da linhagem germinativa de fêmeas provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. A. altiparanae* (prole 2n), B. *A. altiparanae* (prole 3n), C. *A. fasciatus* (prole 3n), D. *A. schubarti* (prole 2n), E. *Hyphessobrycon anisitsi* (prole 3n), F. *Oligosarcus pintoii* (prole 3n). Barra: 200 μ m.

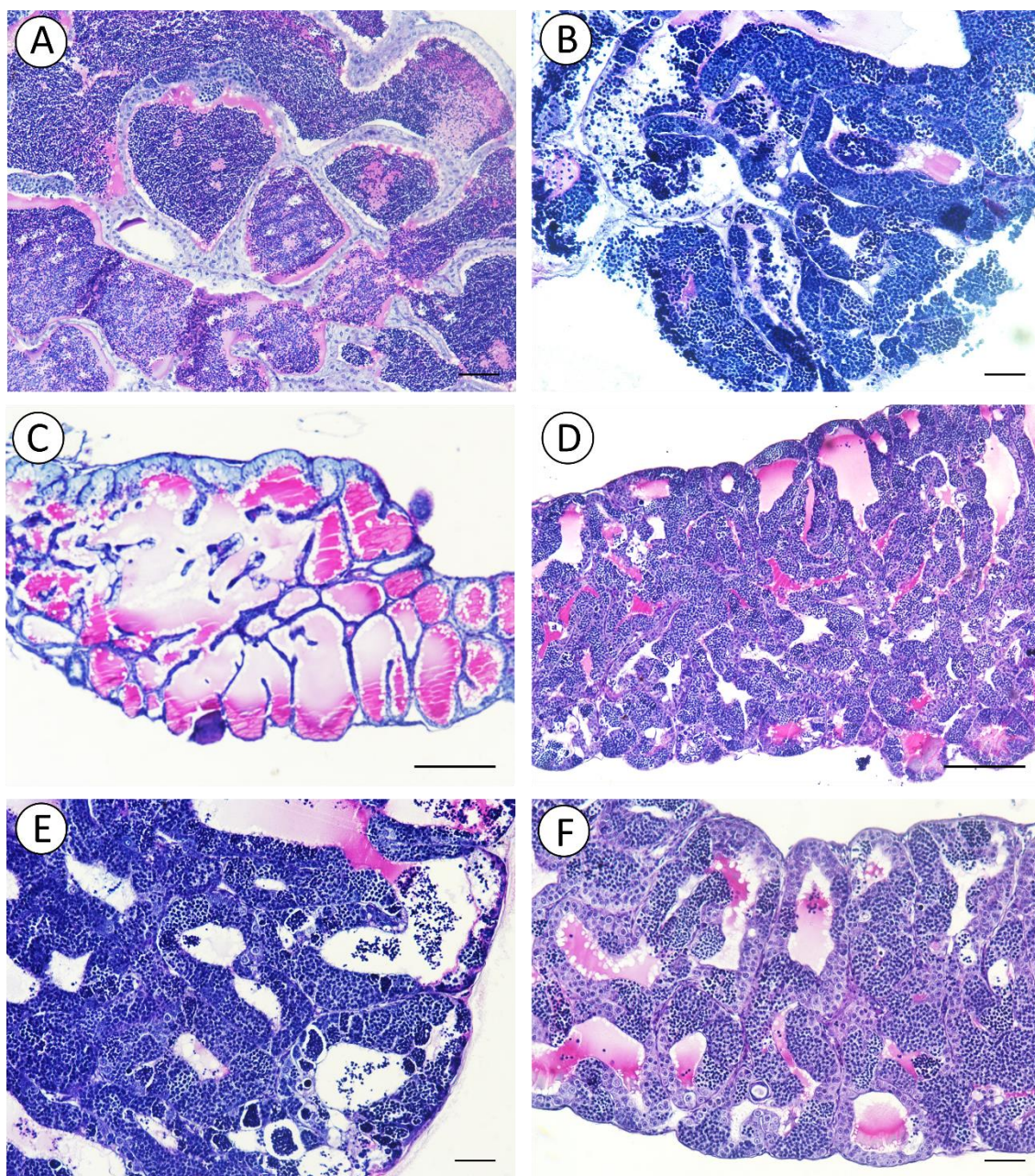


Fig. 6. Caracterização da linhagem germinativa de machos provenientes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. A. altiparanae* (prole 2n), B. *A. altiparanae* (prole 3n), C. *A. fasciatus* (prole 3n), D. *A. schubarti* (prole 2n), E. *Hyphessobrycon anisitsi* (prole 3n), F. *Oligosarcus pinto* (prole 3n). Barra: 200µm.

3.4. Espículas sexuais

A diafanização mostrou que fêmeas de todos os tratamentos não apresentaram espículas na nadadeira anal (Fig. 7A). Tais espículas foram observadas nas nadadeiras anais de machos (Fig 7B), com exceção dos machos triploides resultantes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. fasciatus* (Fig. 7C).

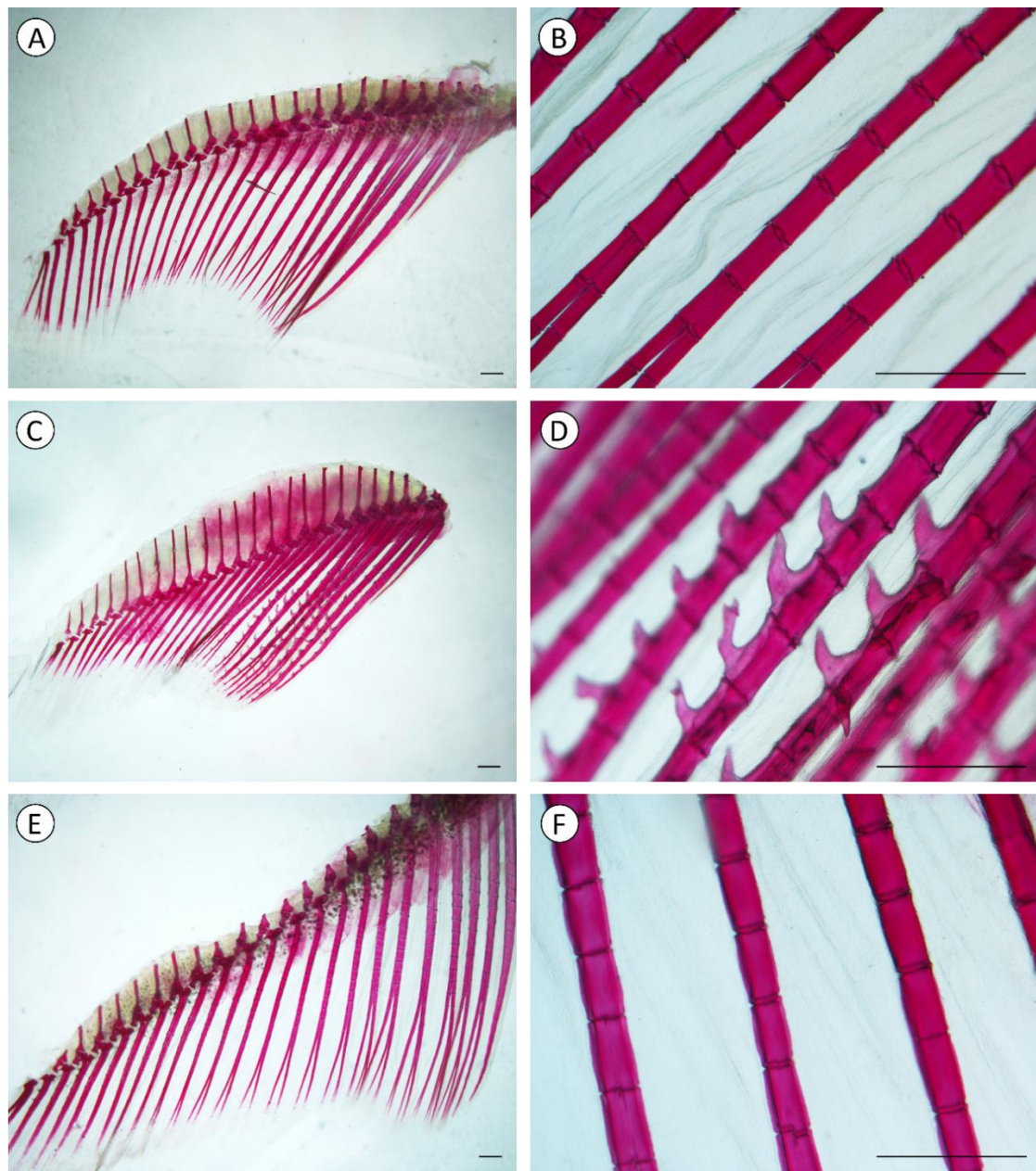


Fig. 7. Nadadeiras anais diafanizadas provenientes de A. Fêmea de *Astyanax altiparanae* diploide, B. Fêmea de *Astyanax altiparanae* diploide com destaque para raio sem espículas C. Macho de *Astyanax altiparanae* diploide, D. Macho de *Astyanax altiparanae* diploide com destaque em espículas, E. Machos triploide resultantes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. fasciatus*, F. Machos triploide resultantes do cruzamento entre fêmeas de *Astyanax altiparanae* e machos de *A. fasciatus* com destaque para raio sem espículas. Barra: 750 μ m.

4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que interessantes possibilidades de esterilização podem ser obtidas por meio de hibridação e triploidização utilizando lambari-do-rabo-amarelo. A obtenção de peixes triploides estéreis já foi observada para diversas espécies, como bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011), truta marrom (*Salmo trutta fario*) (KIZAK et al., 2013) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (TABATA; RIGOLINO e TSUKAMOTO, 1999). Adicionalmente, NA-NAKORN et al. (2004), observaram que híbridos triploides de *Clarias macrocephalus* e *Clarias gariepinus* apresentam maior esterilidade do que peixes diploides e triploides.

A produção de peixes estéreis é importante tanto para a conservação quanto para a aquicultura, pois a energia que seria utilizada para o desenvolvimento gonadal é empregada no crescimento somático e, caso ocorra escapes para o ambiente, os impactos são reduzidos (PIFERRER et al., 2009). Outra importante aplicabilidade é a de servirem como receptores de células germinativas em estudos de quimerismo (OKUTSU et al., 2007).

Grandes porcentagens de peixes triploides foram obtidos em todos os tratamentos. Estes resultados vão de acordo com o observado por ADAMOV (2013) no *A. altiparanae*, indicando que tal protocolo pode ser aplicado eficientemente na obtenção de híbridos triploides de lambaris. Adicionalmente, indivíduos estéreis foram identificados tanto para triploides, híbridos e híbridos triploides. Para *A. altiparanae*, grande parte das fêmeas triploides (88%) foram estéreis. Este resultado difere do observado por NASCIMENTO (2014), que relatou a obtenção de 100% de fêmeas triploides estéreis. Uma possível explicação para os diferentes resultados pode estar relacionada à idade dos peixes: autores vêm observando que peixes triploides de idade mais avançada podem proceder à gametogênese e apresentar gônadas similares aos indivíduos normais diploides

(MANNING; BURTON e CRIM, 2004). Apesar da causa deste fenômeno ainda não estar bem elucidada, o mesmo pode ter ocorrido para o lambari, pois enquanto NASCIMENTO (2014) analisou peixes com até seis meses pós fertilização, neste estudo as coletas foram realizadas em animais nove meses após a fertilização. Além disso, apesar de 12% das fêmeas triploides de *A. altiparanae* apresentarem desenvolvimento gonadal semelhante às fêmeas diploides, futuros estudos são necessários para verificar a viabilidade de tais oócitos. Em *Takifugu niphobles*, fêmeas triploides apresentam desenvolvimento gonadal normal e, após a fertilização com sêmen proveniente de machos diploides, todas as larvas morreram no início da alimentação exógena (HAMASAKI et al., 2013). Este resultado é devido provavelmente à produção de gametas aneuploides, os quais geram proles anormais que facilmente morrerão após a eclosão. No entanto, devido aos resultados observados para fêmeas triploides de *A. altiparanae*, como os maiores valores de taxa de crescimento e rendimento de carcaça (NASCIMENTO, 2014), a produção em larga escala de fêmeas triploides desta espécie continua sendo uma importante opção para o aumento da produção.

Nesse estudo, foi evidenciada uma grande parcela de machos $3n$ que não são estéreis de forma que pode ser observada a produção de espermatozoides. Estudos vêm mostrando que machos triploides produzem espermatozoides aneuploides (LINHART et al., 2006; FUJIMOTO et al., 2008; HAMASAKI et al., 2013), os quais podem inviabilizar as larvas resultantes. Em machos de lambaris triploides, NASCIMENTO (2014), verificou que os mesmos apresentam baixa concentração espermática e motilidade, além de serem aneuploides. Portanto, é provável que os machos híbridos triploides deste estudo apresentem tal característica.

Peixes estéreis também podem ser utilizados em estudos de transplante de células germinativas (quimerismo) (OKUTSU et al., 2007). Esta técnica pode ser aplicada para

conservação e aquicultura, pois uma espécie de fácil manejo reprodutivo pode produzir gametas de espécies ameaçadas ou de difícil reprodução. Além disso, para que o quimerismo seja concretizado com sucesso, o receptor das células germinativas deve ser estéril, uma vez que assim será possível garantir que os gametas produzidos sejam provenientes da espécie doadora. Com este objetivo, OKUTSU et al., (2007) utilizaram peixes triploides de salmão como receptores de células germinativas de trutas. Apesar do transplante ter sido concretizado com sucesso, as gônadas do salmão triploide apresentavam-se repletas de células germinativas primordiais, sendo que tal morfologia é comumente encontrada em peixes triploides estéreis (PIFERRER et al., 2009). Apesar de ser observado em muitas fêmeas triploides híbridas estéreis, as gônadas do híbrido utilizando-se o sêmen de *A. fasciatus* apresentaram-se totalmente desprovidas de células germinativas, podendo ser utilizado como receptor de células germinativas em estudos de quimerismo, uma vez não haverá competição pelos nichos entre as células endógenas e transplantadas.

No que se refere à proporção entre os sexos, estudos mostram que triploides apresentam maior proporção de fêmeas do que machos, como observado para catfish (GOUDIE et al., 1995), turbot (*Scophthalmus maximus*) (CAL et al., 2006) e no híbrido triploide dos esturjões *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (OMOTO et al., 2005). Tais resultados diferem do observado no presente estudo, o que pode ser resultado de uma maior taxa de mortalidade em fêmeas. Além disso, a proporção sexual depende de inúmeros fatores ambientais e do sistema genético de determinação do sexo para cada espécie (por exemplo, XY ou ZW).

5. CONCLUSÃO

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

6. REFERÊNCIAS

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

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

DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Oxford: GABI Publishing, 2004.

ESPINOSA, E.; JOSA, A.; GIL, L.; MALO, C.; MITJANA, O. Comparing Sex Steroid Levels During the Annual Cycles of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Diploid Female (XX) and Triploid Female (XXX) Genotypic Sex. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 149-155, Feb 2013. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313875800026 >.

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

FEINDEL, N. J.; BENFEY, T. J. e TRIPPEL., E. A. Gonadal development of triploid Atlantic Cod *Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology**, v. 79, p. 1900 - 1912, 2011.

FELIP, A.; CARRILLO, M. e ZANUY, S. Older triploid fish retain impaired reproductive endocrinology in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 10, p. 2657-2669, Dec 2009. ISSN 0022-1112. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273899600015 >.

FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S.; YOSHIKAWA, H.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Genetic and reproductive potential of spermatozoa of diploid and triploid males obtained from interspecific hybridization of *Misgurnus anguillicaudatus* female with *M. mizolepis* male. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 430-437, Aug 2008. ISSN 0175-8659. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258458400013 >.

GARUTTI, V. Caráter sexual secundário em *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), relacionado às nadadeiras anal e pélvicas. **Naturalia**, v. 15, p. 109-119, 1990.

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

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

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

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

HAMASAKI, M.; TAKEUCHI, Y.; MIYAKI, K.; YOSHIZAKI, G. Gonadal Development and Fertility of Triploid Grass Puffer *Takifugu niphobles* Induced by Cold Shock Treatment. **Marine Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 133-144, Apr 2013. ISSN 1436-2228. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314987500002 >.

KIZAK, V.; GUNER, Y.; TUREL, M.; KAYIM, M. Comparison of Growth Performance, Gonadal Structure and Erythrocyte Size in Triploid and Diploid Brown Trout (*Salmo trutta fario* L, 1758). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 13, p. 571 - 580, 2013.

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

LINHART, O.; RODINA, M.; FLAJSHANS, M.; MAVRODIEV, N.; NEBESAROVA, J.; GELA, D.; KOCOUR, M. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). **Aquaculture International**, v. 14, n. 1-2, p. 9-25, Feb 2006. ISSN 0967-6120. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234692500003 >.

LUTZ, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. London: Blackwell, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIERE, J.-C.; FLAJSHANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, n. 3-4, p. 125-156, Aug 16 2009. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268150000001 >.

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

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

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: MOSER, H. G. (Ed.). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. Lawrence, KS, USA: Allen Press, 1984. p.35-37.

SACOBIE, C. F. D.; GLEBE, B. D.; BARBEAU, M. A.; LALL, S. P.; BENFEY, T. J. Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. **Aquaculture**, v. 334, p. 58-64, Mar 7 2012. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301693600008 >.

TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. e TSUKAMOTO, R. Y. Production of all female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III. Growth up to first sexual maturation. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 4, p. 101 - 102, 1999.

XAVIER, P. L. P. **Métodos de fixação de amostras para citometria de fluxo em peixes.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Abi - Ciências Biológicas). Pontifícia Universidade Católica de Campinas

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

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

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

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

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