

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INDUÇÃO À TRIPLOIDIA NO TAMBAQUI
Colossoma macropomum, PACU *Piaractus
mesopotamicus* E O RESPECTIVO HÍBRIDO
TAMBACU**

Lucas Seiti Sato

Jaboticabal, SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INDUÇÃO À TRIPLOIDIA NO TAMBACUI
Colossoma macropomum, PACU *Piaractus
mesopotamicus* E O RESPECTIVO HÍBRIDO
TAMBACU**

Lucas Seiti Sato

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP

2015

S253i Sato, Lucas Seiti
Indução à triploidia no tambaqui *Colossoma macropomum*, pacu
Piaractus mesopotamicus e o respectivo híbrido tambacu / Lucas Seiti
Sato. -- Jaboticabal, 2015
x, 53 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2015

Orientador: Diogo Teruo Hashimoto

Banca examinadora: Rafael Yutaka Kuradomi, George Shigueki
Yasui

Bibliografia

1. Triploide. 2. Genética de peixes. 3. Manipulação cromossômica.
I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
DEDICATÓRIA	2
APOIO FINANCEIRO	3
RESUMO	4
PALAVRAS-CHAVE	4
ABSTRACT	5
KEY-WORDS	5
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Caracterização do tambaqui, pacu e o híbrido interespecífico tambacu	8
1.2 Produção de peixes poliplóides: enfoque em triploides	11
1.3 Métodos citogenéticos para a identificação de triploides	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material	18
3.2 Métodos	19
3.3 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Protocolo de citogenética de larvas para detecção de triploides	30
4.2 Triploidização em pacu, tambaqui e tambacu.....	32
4.2 Análise de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) em diploides e triploides	38
5 DISCUSSÃO	41
5.1 Protocolo de citogenética de larvas e análise de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) para detecção de triploides.....	41
5.2 Triploidização em pacu, tambaqui e tambacu.....	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7 REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tratamentos dos experimentos pilotos em pacu e tambaqui.	21
Tabela 2 Tratamentos dos experimentos finais em pacu, tambaqui e tambacu....	23
Tabela 3 Quantidade média (Qm) de metáfases de baixa e alta qualidade por lâmina e por tratamento.	30
Tabela 4 Taxas de eclosão dos experimentos pilotos em pacu <i>P. mesopotamicus</i> e tambaqui <i>C. macropomum</i>	33
Tabela 5 Taxas de eclosão e de triploides do experimento final em pacu <i>P. mesopotamicus</i>	34
Tabela 6 Taxas de eclosão e de triploides (fases juvenil e larva) do experimento final em tambaqui.	36
Tabela 7 Taxas de eclosão e de triploides (fases juvenil e larva) do experimento final em tambacu.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Colossoma macropomum</i>	19
Figura 2 <i>Piaractus mesopotamicus</i>	19
Figura 3 Incubadoras de acrílico (60 l) do Laboratório de Reprodução.	21
Figura 4 Comparação entre os tratamentos (0,007% por 4 h e 0,014% por 2 h) em relação a quantidade média e o índice de qualidade das metáfases.....	31
Figura 5 Cariótipos de larvas de tambaqui <i>C. macropomum</i> 2n = 54 cromossomos (acima) e 3n = 81 cromossomos (abaixo).	32
Figura 6 Cariótipos de juvenis de pacu 2n = 54 cromossomos (acima), e 3n = 81 cromossomos (abaixo).....	35
Figura 7 Cariótipo de juvenis de tambaqui 2n = 54 cromossomos (acima) e 3n = 81 cromossomos (abaixo).....	36
Figura 8 Cariótipo de juvenis de tambacu 2n = 54 cromossomos (acima) e 3n = 81 cromossomos (abaixo).....	38
Figura 9 Cromossomos metafásicos marcados com Nitrato de Prata (AgNO ₃): Situações que podem levar à identificações equivocadas. (a) pacu 2n com 2 marcações e (b) pacu 3n com duas marcações; (c) tambaqui 2n com 3 marcações e (d) tambaqui 3n com 2 marcações; (e) tambacu 2n com 3 marcações e (f) tambacu 3n com 3 marcações.	39
Figura 10 Núcleos interfásicos marcados com Nitrato de Prata (AgNO ₃) revelando diferentes marcações (NOR-múltipla) para tambaqui diploide (acima) e tambaqui triploide (abaixo).....	40

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todos os momentos que vivi durante esses 2 anos de Mestrado;

Agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram e investiram na minha educação;

À minha amada esposa que sempre esteve ao meu lado durante todo mestrado e ao meu cachorrinho Pou por sua alegria contagiante;

Ao produtor Fernando Nagano e ao Prof. Dr. Ricardo Ribeiro que me apresentaram a aquicultura;

Ao meu orientador Prof. Dr. Diogo pela oportunidade, confiança e sua enorme paciência;

Agradeço a toda equipe de funcionários do Caunesp, em especial ao Valdecir que sempre esteve de prontidão em tudo que precisei durante as atividades e também a Sú por suas orações que com certeza tiveram impacto durante os experimentos;

Agradeço ao grupo do Laboratório de Reprodução, em especial, Prof. Dr. Sérgio, Dr. Rafael, Dr. Tiago e Valéria.

E por fim, porém não menos especiais, agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Genética: Vito, Paulo, Milene, Bruna, Marcos, Paola, Raquel, Milena, e quem mais um dia fizer parte desse lab. que tive a honra de também fazer. Muito obrigado de coração pela ajuda durante toda caminhada do mestrado e pela amizade que sempre levarei. Porque não importa onde vocês estejam, vocês sempre estarão aqui, no meu coração.

Obrigado a todos que de alguma forma fizeram parte desse trabalho!

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e
à minha esposa,
Dedico.*

APOIO FINACEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), bolsa de mestrado.

RESUMO

No presente estudo avaliou-se a eficiência da indução à triploidia em duas espécies (pacu *Piaractus mesopotamicus* e tambaqui *Colossoma macropomum*) e seu respectivo híbrido interespecífico tambacu (♀ tambaqui x ♂ pacu). O principal objetivo foi avaliar a indução por choque de temperatura quente e frio e a forma de identificação da ploidia dos peixes. Além disso, foi padronizado um protocolo de obtenção de cromossomos mitóticos a partir de larvas (citogenética de larvas). Nas avaliações de quantidade e qualidade das metáfases, observaram-se melhores resultados para o protocolo de citogenética de larvas utilizando a concentração de colchicina a 0,007% (4 h). Inicialmente, nos experimentos pilotos, foram avaliados choque quente e frio em pacu e tambaqui, os quais apresentaram melhores resultados de taxa de eclosão e índice de triploides nos tratamentos quentes. Dessa forma, apenas tratamentos quentes foram avaliados nos experimentos seguintes. Na indução do pacu, foram detectados 11,8% de triploides por citogenética em juvenis no choque a 43 °C (2 min), 2 min após a fertilização. Para o tambaqui, em análise por citogenética de larvas, foram detectados 80% de triploides no choque a 43 °C (2 min), 2 min após a fertilização; entretanto, quando analisado na fase juvenil, este tratamento apresentou 29,4% de triploides. Já para o híbrido tambacu, foram detectados 33,3% de triploides na fase larval no choque a 43 °C (2 min), 2 min após a fertilização; e 8,7% na fase de juvenil. Entretanto, no choque a 41°C (2 min), 1 min após na fertilização, foram detectados 57,8% de triploides na fase juvenil. Quando o nível de ploidia foi analisado por meio da análise das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) nos cromossomos metafásicos, verificou-se variação intra-individual (NORs múltiplas) para o pacu, tambaqui e tambacu, assim como na análise dos núcleos interfásicos do tambaqui, inviabilizando essa técnica para a verificação da ploidia. Em conclusão, apesar deste estudo não ter atingido 100% de triploidia, esse trabalho possibilita a produção de triploides para estudos futuros e identificá-los no estágio larval, através de um método prático e de baixo custo. Em geral, peixes triploides são estéreis, resultante da incompatibilidade cromossômica dos gametas, assim, a energia antes utilizada para o desenvolvimento gonadal é direcionada para o desenvolvimento de tecido somático, melhorando a qualidade da carne, taxa de crescimento e rendimento de carcaça. Além disso, é uma excelente alternativa para ser utilizada no confinamento genético de híbridos interespecíficos. Dessa forma, estudos posteriores são necessários para padronização de 100% de triploidia e dimensionar os reais impactos que os peixes triploides podem causar.

PALAVRAS-CHAVE

Triploide, genética de peixes, manipulação cromossômica

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the triploidy induction efficiency in two species (pacu *Piaractus mesopotamicus* and tambaqui *Colossoma macropomum*) and their respective interspecific hybrid tambacu (♀ tambaqui x ♂ pacu). The main objective was to evaluate the heat and cold shock temperatures and the form of identification of the fish ploidy. Furthermore, a protocol has been standardized to obtain mitotic chromosomes from larvae (larvae cytogenetics). In the evaluations of quantity and quality of metaphases, we observed better results for larvae cytogenetics using the concentration of 0.007% (4 hours). Initially, in the pilot experiments, we analyzed heat and cold shock treatments in pacu and tambaqui, which showed better results from hatching rate and triploid index in heat temperatures. Thus, only heat shocks were evaluated in the final experiments. In pacu, 11.8% of triploid juveniles were detected by cytogenetic method in the shock induction at 43 °C (2 min), 2 min after fertilization. For tambaqui, 80% of triploid were detected in larvae cytogenetic analysis for the shock at the 43 °C (2 min), 2 min after fertilization; however, when analyzed in the juvenile stage, we observed 29.4% of triploids. For the hybrid tambacu, we detected 33.3% of triploids in the larval stage at the shock at 43 °C (2 min), 2 min after fertilization; and 8.7% in the juvenile stage. However, in the shock at 41 °C (2 min), 1 min after fertilization, we detected 57.8% of triploid in the juvenile stage. When the ploidy level was analyzed by Nucleolar Organizer Regions analysis (NOR) on metaphase chromosomes, intra-individual variation was found (multiple NOR) for pacu, tambaqui and tambacu, as well as the analysis of interphase nuclei tambaqui, preventing this technique for verification of ploidy. In conclusion, although this study did not reach 100% triploidy, this work enables the triploid production for future studies and identifies them in the larval stage, through a practical and inexpensive method. In general, triploid fish are sterile, resulting from chromosomal incompatibility of gametes, thus the energy used before for gonadal development is directed to the development of somatic tissue, improving meat quality, growth rate and carcass yield. Moreover, it is an excellent alternative for use in genetic containment of interspecific hybrids. Therefore, further studies are needed to standardize 100% triploidy and measure the real impacts that triploid fish can cause.

KEY-WORDS

Triploid, genetic fish, chromosome manipulation

1 INTRODUÇÃO

No período compreendido entre 1980 e 2012, a produção mundial de peixes proveniente da aquicultura vem aumentando a uma taxa média anual de 8,6% (FAO, 2014). Segundo estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011), o setor da piscicultura continental brasileira correspondeu a 86,6% do total da aquicultura, com uma produção de mais de 544 mil toneladas em 2010. O Brasil apresenta excelentes recursos naturais e uma rica biodiversidade de peixes com potencial para produção em larga escala, sendo que aproximadamente 40 espécies nativas são tradicionalmente utilizadas para aquicultura (Godinho, 2007). A maioria dos cultivos é realizada com espécies exóticas, principalmente a tilápia (46% da piscicultura continental) (MPA, 2011), que é a principal espécie cultivada no Brasil e que passou por programas de melhoramento genético. Este panorama é de certa forma surpreendente e demonstra a carência por projetos de melhoramento genéticos com enfoque nas espécies nativas.

Apesar do Brasil já dispor de alguns programas de melhoramento clássico, com futuro promissor para duas espécies nativas (tambaqui e cachara), estes deverão se prolongar por vários anos, pois faltam conhecimentos básicos para aprimoramento das técnicas de manejo. Além disso, as condições reprodutivas das espécies nativas são desfavoráveis, como o longo período para primeira maturação sexual, entre 2 a 4 anos, e ciclo reprodutivo anual (Gomes *et al.*, 2010).

Enquanto isso, a produção de híbridos interespecíficos tem sido largamente realizada nos sistemas de cultivo, pois é uma solução que permite

rápida exploração zootécnica e que vem se tornando cada vez mais popular na indústria (Bartley *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2012). Como exemplo, podemos destacar os híbridos da família Serrasalmidae, que em 2007 resultaram em aproximadamente 23% da produção nacional de serrasalmídeos (IBAMA, 2007). Porém, caso sejam manejados erroneamente, estes animais podem causar sérios prejuízos para as pisciculturas, além de riscos ambientais incalculáveis (Hashimoto *et al.*, 2011, 2012, 2013).

Desta forma, existe uma necessidade urgente de inovações biotecnológicas serem aplicadas na aquicultura simultaneamente com os programas de seleção, para se otimizar o ganho genético e evitar possível contaminação genética proveniente dos produtos melhorados e da hibridação. Embora progressos tenham sido feitos em programas de melhoramento genético de peixes por abordagens genéticas tradicionais (seleção e hibridação), o potencial da aquicultura poderá ser acelerado com uso de práticas de hibridação e manipulação cromossômica. Portanto, progressos significantes poderão ser obtidos pela integração das técnicas tradicionais e novas biotecnologias, a fim de maximizar o acúmulo de ganho genético e se buscar melhores produtos para a aquicultura (Dunham, 2004).

Dentre as biotecnologias potencialmente aplicáveis na aquicultura, a poliploidia merece destaque, pois indivíduos triploides apresentam inúmeras vantagens, o que tem causado a realização de importantes estudos em diversas espécies de peixes (Dunham, 2004; Piferrer *et al.*, 2009). Triploidização em peixes despertam interesse do setor produtivo principalmente por possivelmente causarem esterilidade, além de otimizar a produção (ex., maiores taxas de crescimento e qualidade de carne) e também servirem como um potencial método

de confinamento reprodutivo (Piferrer *et al.*, 2009). Porém, para que a eficácia dessa biotecnologia seja testada é necessário um método confiável para a avaliação da ploidia dos peixes estudados.

1.1 Caracterização do tambaqui, pacu e o híbrido interespecífico tambacu

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) estão incluídos dentro da família Serrasalminidae. De acordo com a estatística do IBAMA (2007), dentro da produção de serrasalmídeos, o cultivo de espécies puras representa 77% (43,3 milhões de kg), cujo maior destaque é o tambaqui (30,6 milhões de kg) e em seguida o pacu (12,4 milhões de Kg). No período entre 2003 e 2009, a produção de tambaqui cresceu 123% (MPA, 210) e em 2010 alcançou o valor de 54,3 milhões de kg (MPA, 2011) e a produção de pacu aumentou mais de 70% no período entre 2008 e 2010 (MPA, 2010). Portanto, é notável a necessidade de implantar programas de melhoramento genético para estas espécies, tanto por meio da seleção clássica quanto da aplicação da manipulação cromossômica.

A combinação de programas de melhoramento genético, empregando a seleção tradicional integrada com a triploidia, possibilita acelerar a obtenção de produto de melhor qualidade e é provável que resulte em melhores genótipos para a aquicultura no futuro. Além disso, devido à esterilidade, a triploidia evitaria que os tambaquis melhorados, cujo *pool* genético foi alterado, causassem contaminação genética do *pool* genético original das populações selvagens, como tem ocorrido com a tilápia e salmão (Bentsen e Thodesen, 2005; Svåsand *et al.*, 2007).

Em relação à produção de híbridos da família Serrasalminidae, o tambacu (♀ *C. macropomum* x ♂ *P. mesopotamicus*) tem maior evidência, pois alcança um valor de 21,6 milhões de kg e representa a segunda maior produção de peixes nativos (MPA, 2011). Com isso, verifica-se que estes animais são produzidos em larga escala pelas pisciculturas e têm abastecido de forma relevante a indústria da aquicultura.

Hibridação é o cruzamento de indivíduos ou grupos geneticamente diferentes e pode envolver cruzamentos entre linhagens ou cruzamento entre espécies. É comumente utilizada pelos aquicultores para obtenção de prole com maior desempenho em relação aos pais. A hibridação tem sido usada em várias espécies de peixes para aumentar a taxa de crescimento, na manipulação da diferenciação sexual, produzir animais estéreis, melhorar a qualidade da carne, aumentar resistência a doenças e tolerâncias climáticas entre outras características (Bartley *et al.*, 2001).

No Brasil, a hibridação é amplamente praticada nas pisciculturas e aproximadamente 20 tipos de híbridos são produzidos (Porto-Foresti *et al.*, 2010), Porém, os híbridos que possuem maior aceitação pelo mercado consumidor são o tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*), tambatinga (*C. macropomum* x *Piaractus brachypomus*), patinga (*P. mesopotamicus* x *P. brachypomus*), cachapinta ou ponto e virgula (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans*), cachandiá (*P. reticulatum* x *Leiarius marmoratus*), cachapirá (*P. reticulatum* x *Phractocephalus hemiliopterus*) (Hashimoto *et al.*, 2012). Tal diversidade de cruzamento muito se deve ao aumento do uso de técnicas de reprodução induzida, como a hipofiseção, uso de hormônios sintéticos e o

aumento do conhecimento da biologia reprodutiva pelos produtores (Bartley *et al.*, 2001).

A presença de híbridos em ecossistemas aquáticos pode representar ameaça para a conservação de espécies nativas por diversos motivos: a competição por espaço e recursos tende a se tornar mais intensa; a ocorrência de híbridos predadores pode reduzir populações nativas de presas; podem ocorrer restrições de locais de desova; e o genoma modificado destas espécies poderá causar a chamada contaminação gênica dos estoques naturais, sendo que estes podem apresentar fertilidade e a capacidade de retrocruzar com espécies parentais (Porto-Foresti *et al.*, 2008).

No entanto, há poucos estudos sobre os reais impactos genético-ecológicos que esses animais apresentam para as populações selvagens (Hashimoto *et al.*, 2010; Porto-Foresti *et al.*, 2008, 2010). Alguns híbridos Neotropicais, como no caso do tambacu, podem apresentar certa taxa de fertilidade e retrocruzar com espécies puras (Almeida-Toledo *et al.*, 1996; Martino *et al.*, 2002). Como consequências, híbridos podem entrar em processo reprodutivo com as espécies selvagens e levar ao surgimento de uma única população formada por híbridos. Neste caso, as populações puras podem ser reduzidas devido à contaminação genética e até mesmo extintas no ambiente que ocorreu o contato com os híbridos (Allendorf *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2012).

Uma alternativa para controlar os problemas causados pelos híbridos seria a proibição do uso desses peixes. No entanto, frente à importância que representam para a produção aquícola, a proibição talvez gerasse consequências econômicas indesejáveis para o setor, o que poderia causar uma crise na aquicultura brasileira. O ideal é buscar o almejado desenvolvimento sustentável,

em que não se pode simplesmente proibir, mas também não se devem ignorar os problemas decorrentes do uso errôneo destes animais (Hashimoto *et al.*, 2012).

Desta forma, tanto o estabelecimento de ações mitigadoras quanto a criação de um programa rígido de controle e monitoramento são necessários. Neste caso, a indução de híbridos triploides seria uma solução biotecnológica viável, pois estes animais seriam estéreis e os danos ao meio ambiente seriam minimizados.

1.2 Produção de peixes poliplóides: enfoque em triploides

Poliplóides podem ser definidos como organismos com um ou mais conjuntos de cromossomos adicionais em relação ao número encontrado na natureza. O fenômeno da poliploidia é letal em mamíferos e aves. Por outro lado, tem permitido o desenvolvimento de muitas variedades de plantas melhoradas que são utilizadas na agricultura moderna, que incluem: aneuploides (cana de açúcar), triploides (banana, maçã, laranja ou limão), tetraploides (batata, trigo, algodão ou tabaco), hexaploides (alho ou kiwi) e octaploides (morango) (Piferrer *et al.*, 2009).

Em relação ao grupo dos peixes, a poliploidia é viável e a ocorrência de triploides tem sido frequentemente reportada (Thorgaard *et al.*, 1981; Chourrout, 1984; Silva *et al.*, 2007). Os triploides podem ser encontrados espontaneamente em populações naturais de peixes (Centofante *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011) ou podem ser induzidos artificialmente em sistemas de cultivo por métodos físicos e químicos (Tiwary *et al.*, 2004; Huergo e Zaniboni-Filho, 2006).

A retenção do segundo corpúsculo polar durante a divisão meiótica dos ovócitos resulta em indivíduos triploides, dos quais dois conjuntos de cromossomos são herdados da mãe e um do pai. Triploidia é induzida pela fertilização normal seguida de um processo para forçar a retenção do segundo corpúsculo polar, que variam desde choques de temperatura, pressão hidrostática e até produtos químicos (colchicina e citocalasina), que são aplicados brevemente após a fertilização (Piferrer *et al.*, 2009). A eficiência da triploidização depende do tempo de iniciação do choque e a magnitude e seu tempo de duração (Dunham, 2004).

Outra forma de produção de triploides é por meio de métodos indiretos, em que ovos normais são fertilizados com espermatozoides diploides a partir de um macho tetraploide (Francescon *et al.*, 2004). Entretanto, a tetraploidia é um evento pouco frequente e a taxa de sobrevivência é muito baixa e são poucas espécies que apresentam adultos viáveis e férteis (Yoshikawa *et al.*, 2008). Além do mais, existe um alto risco caso tetraploides escaparem para ambientes naturais, pois poderiam reproduzir livremente com indivíduos diploides, resultando em possíveis triploides estéreis, o que afetaria toda a população.

Peixes triploides são geralmente estéreis, que é um resultado da falta de desenvolvimento gonadal provocado pela incompatibilidade dos conjuntos cromossômicos (Chourrout *et al.*, 1986). É exatamente a característica da esterilidade que faz dos triploides um excelente modelo para ser utilizado em escala comercial. O cultivo de peixes triploides pode ser vantajoso por várias razões. Os principais estudos têm demonstrado potencial para maiores taxas de crescimento (Chourrout *et al.*, 1986), rendimento da carcaça e qualidade de carne aumentados (Hussain *et al.*, 1995). Durante o início da maturidade sexual, o

desenvolvimento gonadal reduzido ou inibido pode permitir que a energia normalmente utilizada no processo reprodutivo seja direcionada para o crescimento do tecido somático (Thorgaard e Gall, 1979).

A esterilidade de triploides também pode ser desejável para o confinamento genético de híbridos interespecíficos, como uma prevenção contra as consequências negativas decorrentes dos escapes de pisciculturas. Assim, evitaria que estes animais gerassem um impacto genético sobre as populações nativas de peixes, similarmente ao que tem sido proposto para peixes melhorados geneticamente e transgênicos (Mair, 2007; Hallerman, 2008).

Manipulações cromossômicas para a produção de peixes começaram a afetar a indústria mundial somente durante as décadas de 1980 e 1990, e as principais espécies triploides que são produzidas em larga escala são as trutas, salmões e carpas (Hulata, 2001). Entretanto, no Brasil, estas biotecnologias genéticas ainda não alcançaram a indústria da aquicultura para as espécies nativas, pois só foram realizados testes experimentais.

Os principais trabalhos sobre triploides no Brasil foram desenvolvidos para a espécie jundiá *Rhamdia quelen* (Silva *et al.*, 2007; Weiss e Zaniboni-Filho, 2009, 2010). Nestes experimentos, os protocolos para indução já permitem a obtenção de 100% de triploides (Vozzi *et al.*, 2003; Huergo e Zaniboni-Filho, 2006). Atualmente, em sistemas de cultivo existem algumas dificuldades para a produção em larga escala do jundiá, tais como a maturação sexual precoce e a heterogeneidade na taxa de crescimento (Fracalossi *et al.*, 2004). Dessa forma, em um futuro próximo, há perspectivas de que esses animais sejam utilizados em escala comercial e também para fins de programas de conservação (Silva *et al.*, 2011).

Em relação aos híbridos, a hibridação combinada com manipulação cromossômica pode aumentar a viabilidade e a estabilidade dos peixes híbridos durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento (Wilkins *et al.*, 1995). Como também, conferir aumento da viabilidade, crescimento e sobrevivência (Grey *et al.*, 1993).

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar o efeito da triploidização em híbridos como o aumento da sobrevivência e da taxa de crescimento do triploide entre *Salmo salar* x *Salmo trutta* (Galbreath e Thorgard, 1995), aumento de resistência a doenças de triploides de *Oncorhynchus mykiss* x *Salvenius* sp. (Dorson *et al.*, 1991) e na diminuição no tempo de aclimação do híbrido triploide proveniente do cruzamento entre *Oncorhynchus keta* e *Oncorhynchus tshawytscha* (Seeb *et al.*, 1993), entre outros.

Dessa forma, é necessário que estudos mais aprofundados de híbridos triploides sejam realizados, com a finalidade de se obter informações sobre os reais impactos que podem causar nos ambientes selvagem e de cultivo.

1.3 Métodos citogenéticos para a identificação de triploides

Os métodos para detecção de ploidia podem ser baseados em diferentes classes de marcadores genéticos, tais como a cariotipagem, bandamentos cromossômicos, medição do conteúdo de DNA, medição do núcleo ou célula e genotipagem por meio de marcadores moleculares (Piferrer *et al.*, 2009).

Os métodos citogenéticos, além de serem considerados de baixo custo, constituem uma maneira precisa e direta de se verificar tanto os níveis de ploidia quanto a procedência dos complementos cromossômicos dos parentais nos

produtos híbridos (Ocalewicz *et al.*, 2006). Atualmente, existem técnicas citogenéticas bastante resolutivas para a análise cromossômica de peixes, tais como a coloração convencional por Giemsa, coloração por Nitrato de Prata - Ag-NOR (região organizadora de nucléolo), bandamento C (regiões de heterocromatina), coloração por fluorocromos e hibridação *in situ* fluorescente (FISH), que permite a localização de genes específicos (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009; 2014). Dentre estas, as principais metodologias utilizadas para detecção de triploides é a contagem direta dos cromossomos por coloração Giemsa e a análise das NORs por Nitrato de Prata.

Triploides de peixes Neotropicais já foram identificados por técnicas citogenéticas em várias espécies, tais como *Rhamdia quelen* (Huergo e Zaniboni-Filho, 2006; Tsuda *et al.*, 2010), *Characidium gomesi* (Centofante *et al.*, 2001), *Curimata modesta* (Venere e Galetti Jr., 1985), *Gymnotus carapo* (Fernandes-Matioli *et al.*, 1998), *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano e Bertollo 1990), *Trichomycterus davisii* (Borin *et al.*, 2002), *Leporinus cf. elongatus* (Molina *et al.*, 2007), e em vários *Astyanax* (Morelli *et al.*, 1983; Maistro *et al.*, 1994; Fauaz *et al.*, 1994; Malacrida *et al.*, 2003; Kantek *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2012).

Os métodos citogenéticos também já permitiram a perfeita identificação dos parentais e dos híbridos obtidos dos cruzamentos entre pacu e tambaqui (Almeida-Toledo *et al.*, 1987). Além disso, um híbrido triploide proveniente destes mesmos cruzamentos também foi detectado, com um cariótipo de 81 cromossomos (3n). Em cruzamentos artificiais de carpa capim com carpa cabeça-grande, Beck *et al.* (1980) e Beck e Biggers (1982) puderam identificar os híbridos através da análise cariotípica, observando que, deste cruzamento, obtinham-se tanto híbridos diploides, 2n=48, quanto híbridos triploides, 3n=72. Desta forma,

considera-se que os métodos citogenéticos são uns dos mais apropriados e utilizados para identificação de triploides em peixes e também para detecção de híbridos interespecíficos (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2014).

Para realizar o cariótipo, a disponibilidade de técnicas citogenéticas para obtenção de preparações cromossômicas é fundamental. Atualmente, duas técnicas de preparação cromossômica em peixes Neotropicais são amplamente utilizadas, o método *in vivo* (Bertollo *et al.*, 1978) e o método *in vitro* (Foresti *et al.*, 1993). Os dois métodos podem ser utilizados a partir de vários tecidos de peixes, principalmente de rim, brânquia ou baço. Entretanto, para a coleta destes órgãos, é necessário que os peixes apresentem um tamanho mínimo (cerca de 3-5 cm, dependendo da espécie), de forma a permitir a coleta suficiente de tecido para obtenção de preparação cromossômica. Este detalhe técnico é um entrave para os inúmeros protocolos de padronização que são indispensáveis para indução de triploidia, pois para cada tratamento é necessário aguardar o crescimento do peixe (cerca de 2-3 meses, dependendo da espécie), o que demanda tempo, espaço e custo econômico, além da possibilidade de morte (ex. surto de doença) dos animais durante este período.

Neste contexto, a citogenética a partir de peixes em estágios iniciais de vida, como larva, é uma excelente alternativa para aperfeiçoar os protocolos de detecção de triploidia, de forma simples, confiável e de baixo custo.

1.3.1 Localização das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR)

As Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) caracterizam-se por apresentarem genes que produzem determinados tipos de RNA ribossomais

(Howell e Black, 1980). Compreendem a constrição secundária dos cromossomos e pode ser visualizada a partir da coloração com Nitrato de Prata (AgNO_3) (Sumner, 2008). Tal coloração é o principal método de identificação de NORs em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos.

Entretanto, a coloração com AgNO_3 é capaz de corar somente regiões que estavam ativas no momento da fixação. Dessa forma, em espécies como o lambari *Astyanax bockmanni*, $2n = 50$ cromossomos, NORs múltiplas podem ser detectadas em vários cromossomos, com variação no número de cromossomos marcados em diferentes células do mesmo indivíduo (Hashimoto e Porto-Foresti, 2010). Esta variação intra-individual impede a análise da ploidia por meio da coloração com Nitrato de Prata e, conseqüentemente, é restrita para espécies que apresentem número de NORs invariável.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver um pacote tecnológico para produção de peixes triploides, especialmente *C. macropomum*, *P. mesopotamicus* e o respectivo híbrido tambacu.

2.2 Específicos

- Caracterizar a viabilidade da indução de triploides por meio de choques térmicos para *C. macropomum*, *P. mesopotamicus* e o respectivo híbrido tambacu;
- Verificar a eficiência da produção de triploides por meio de marcadores citogenéticos (cromossômicos).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação (LaGeAC), Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP. Para a obtenção das desovas e dos alevinos, os peixes utilizados compõem o plantel de reprodutores do próprio Centro de pesquisa. As etapas de reprodução induzida dos peixes foram realizadas no Laboratório de Reprodução de Peixes, CAUNESP, com a colaboração do Dr. Sergio Ricardo Batlouni e Dr. Rafael Yutaka Kuradomi. Para os experimentos de reprodução que deram início aos testes de triploidização, utilizou-se uma 1 fêmea x 3 machos em cada tipo de cruzamento:

- tambaqui (Figura 1): ♀ *C. macropomum* x ♂ *C. macropomum*
- pacu (Figura 2): ♀ *P. mesopotamicus* x ♂ *P. mesopotamicus*
- híbrido tambacu: ♀ *C. macropomum* x ♂ *P. mesopotamicus*

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os padrões e normas de bem-estar animal, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal (Protocolo n° 7924/15). Os animais manipulados para reprodução foram anestesiados em benzocaína (100 mg/l). Após a triploidização por choques térmicos, os animais utilizados para análise de ploidia foram eutanaziados por overdose de benzocaína (500 mg/l).

Figura 1 *Colossoma macropomum*Figura 2 *Piaractus mesopotamicus*
Fonte: Rafael Kuradomi

3.2 Métodos

3.2.1 Reprodução

Para início dos procedimentos de reprodução, foi realizada uma prévia seleção dos peixes aptos para reprodução, por meio de exames visuais da papila urogenital (papila genital intumescida e avermelhada) como também, a espessura e macieza do abdômen (Woynarovich e Horváth, 1983). Em dezembro de 2013 e 2014, a indução à desova foi efetuada com uso de extrato bruto de hipófise (EBH) de carpa, dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) e aplicado intramuscular em duas doses, com intervalo de 12 h (1ª dose de 0,6 mg hipófise kg⁻¹ de peixe; 2ª dose de 5,4 mg de hipófise kg⁻¹ de peixe) com aplicação de 5 ml de Ciosin® (0.25 mg/mL cloprostenol, Schering-Plough Saúde Animal Ind. Com. Ltda. Campinas, SP, BR), no momento da segunda dose conforme protocolo descrito por Criscuolo-Urbinati *et al.* (2012) com adaptação no intervalo entre as doses (de 24

h para 12 h). Nos machos, foi utilizada dose única (no momento da 2ª dose das fêmeas), equivalente a 1,5 mg kg⁻¹ de EBH. A extrusão dos gametas foi realizada com aproximadamente 260 h/grau para o pacu e 240 h/grau para o tambaqui.

3.2.2 Triploidização. Taxa de eclosão e manejo dos peixes (larva – juvenil)

O experimento piloto de triploidização foi realizado para as espécies puras pacu (*P. mesopotamicus*) e tambaqui (*C. macropomum*), em dezembro de 2013 e janeiro de 2014, respectivamente. Com base em dados obtidos na literatura para outras espécies (revisão em Piferrer *et al.*, 2009), diferentes choques térmicos (quente e frio) foram testados nos ovos de pacu e tambaqui, 1 min após a fertilização, conforme **Tabela 1**. Antes de cada choque térmico, cada tratamento recebeu 5 ml de ovócitos (1 fêmea) e 50 µl de sêmen (*pool* resultante de 3 machos), ativados com 500 ml de água a 28°C por 1 min. Em seguida, a água utilizada na ativação e fertilização dos gametas foi descartada e os ovos recém-fertilizados foram submetidos a choques térmicos (quente e frio) por tempos específicos, conforme **Tabela 1**. Por fim, foram transferidos para incubadoras de acrílico com volume de 60 l (**Figura 3**). Nesse experimento piloto, foi utilizado um tratamento controle, cuja fertilização ocorreu a 28°C, mas não sofreu choque térmico.

Tabela 1 Tratamentos dos experimentos pilotos em pacu e tambaqui.

<i>Tratamento</i>	<i>Espécie</i>	<i>Mês/Ano</i>	<i>Tempo pós fertilização (min)</i>	<i>Tempo de choque (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	Pacu	dez/13	1	15	7
2			1	30	7
3			1	4	41
4			1	8	41
Controle			-	-	28
1	Tambaqui	jan/14	1	10	6
2			1	10	8
3			1	2	39
4			1	2	41
Controle			-	-	28



Figura 3 Incubadoras de acrílico (60 l) do Laboratório de Reprodução.

Para determinar a taxa de eclosão, 100 ovos foram coletados aleatoriamente e contados 17 h pós-fertilização (antes da eclosão das larvas), contando apenas larvas não deformadas. Quatro contagens foram realizadas para determinar taxa de eclosão significativa. Após a eclosão, as larvas foram mantidas em incubadoras por 5 dias e, posteriormente, foram transferidas para tanques-rede (cerca de 100 l). Os tanques-rede foram mantidos em caixas de 1.000 l, com temperatura a 28°C e renovação constante de água (1,9 l/min). Cada

tanque-rede recebeu aproximadamente 200 larvas, onde permaneceram até a fase de alevino (30 dias) e, em seguida, foram distribuídos nas caixas de 1.000 l.

Os resultados iniciais de triploidização do experimento piloto foram de baixa qualidade para os choques frios no pacu e tambaqui (descritos na Seção Resultados), quando comparados com os choques quentes. Desta forma, em uma segunda etapa (Experimento final) realizada em dezembro de 2014 e janeiro de 2015, preferiu-se aprimorar apenas os protocolos de choques térmicos quentes, conforme **Tabela 2**. Neste momento, foram realizados testes de triploidização no pacu, tambaqui e o respectivo híbrido tambacu. Os procedimentos foram os mesmos descritos acima no experimento piloto. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

As larvas foram alimentadas com náuplios de artêmia recém-eclodidos durante 20 dias. Gradativamente, foram substituídas por ração comercial farelada 50% PB (proteína bruta). Na alevinagem, utilizou-se ração extrusada 1,2 mm 40 % PB, sendo gradativamente substituída por ração extrusada 2 a 3 mm 36% PB. Na fase juvenil, os peixes foram alimentados com ração extrusada 3 a 4 mm 32% PB. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia

Tabela 2 Tratamentos dos experimentos finais em pacu, tambaqui e tambacu.

<i>Tratamento</i>	<i>Espécie</i>	<i>Mês/Ano</i>	<i>Tempo pós fertilização (min)</i>	<i>Tempo de choque (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	Pacu	dez/14	1	2	43
2			2	2	41
3			2	2	43
Controle			-	-	28
1	Tambaqui	jan/15	1	2	41
2			2	2	43
Controle			-	-	28
1	Tambacu	jan/15	1	2	41
2			2	2	43
Controle			-	-	28

3.2.3 Verificação do nível da ploidia

A verificação da ploidia em peixes juvenis foi realizada de forma direta, pela contagem do número de cromossomos mitóticos em metáfase, de acordo com o protocolo utilizado por Foresti *et al.* (1993), com algumas modificações.

Para reduzir o intervalo de tempo em que são iniciadas as análises do nível de ploidia (pode durar 2 meses até que o peixe tenha um tamanho mínimo para realização da técnica de citogenética), também foi padronizado um protocolo de citogenética de larvas no presente estudo, o que permite verificar os resultados de triploidização alguns dias pós-eclosão. A técnica foi inicialmente utilizada na verificação da ploidia dos tratamentos extremos dos experimentos finais de tambaqui e tambacu. Também foi utilizado o método de coloração por Nitrato de Prata para detecção das regiões organizadoras de nucléolo (NOR), que também é uma técnica indireta de determinar o nível de ploidia em alguns grupos de peixes.

3.2.3.1 - Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes juvenis

Com o objetivo de se obter maior número de mitoses foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por injeção de uma solução de fermento biológico, adaptada para peixes por Oliveira *et al.* (1988). O procedimento consistiu em:

- 1 preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2 incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;
- 3 injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal, 48 h antes da técnica de preparação cromossômica;
- 4 manter o animal em aquário bem aerado.

A técnica para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foi a utilizada por Foresti *et al.* (1993), realizada com algumas modificações:

- 1 injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 0,5 ml por 100 g de peso do animal;
- 2 deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min;
- 3 sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCl (0,075M);
- 4 dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur;
- 5 transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e manter em uma estufa a 37°C por 21 min;
- 6 retirar o tubo da estufa e colocar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;

- 7** adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9** repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação das células;
- 10** pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar;
- 11** as lâminas foram guardadas no congelador, conservando-as para aplicação das técnicas de coloração com Giemsa ou Nitrato de Prata.

3.2.3.2 - *Obtenção de cromossomos mitóticos de larvas*

Com base em experimentos pilotos, utilizou-se duas variáveis (concentração da colchicina e tempo de exposição na solução) para otimizar um protocolo que permitisse visualizar cromossomos metafásicos em células mitóticas de larvas de tambaqui. Inicialmente, as larvas de *C. macropomum* foram submetidas a dois tratamentos, 0,007% e 0,014% de colchicina, com tempos de 4 e 2 h de incubação das larvas nas soluções, respectivamente.

Após a etapa de colchicina, as larvas foram sacrificadas e dissociadas individualmente (por inteiro) em placas de Petri, contendo 7 ml de solução hipotônica de KCl (0,075 M). Os materiais foram transferidos para tubos de centrífuga e colocados na estufa a 37°C por 21 min. Os passos a seguir foram os mesmos utilizados no processo de fixação das células do protocolo padrão:

- retirar o tubo da estufa e colocar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;

- adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- repetir o item 8 por duas vezes, para uma completa fixação das células;
- pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar;
- cada lâmina foi padronizada com duas gotas de 20 μ l da preparação cromossômica, e corada com Giemsa (5%, com tampão fosfato pH 6,8). Para cada tratamento foram utilizadas 9 larvas; e para cada larva foram analisadas três lâminas.

Os resultados foram avaliados em relação à quantidade e também qualidade das metáfases por larva. O parâmetro quantitativo foi obtido a partir da quantidade média (Q_m) de metáfases por lâmina e, o qualitativo, a partir da contagem de metáfases de alta e baixa qualidade, classificadas segundo a condensação dos cromossomos e possibilidade de identificação da ploidia do indivíduo. Assim, metáfases de baixa qualidade foram consideradas quando os cromossomos estavam altamente condensados (sem possibilidade de verificar a morfologia cromossômica), vistos no interior de uma célula intacta ou apenas ligeiramente distribuídos.

Para o cálculo do índice de qualidade média de metáfases (IQ $_m$), para efeito estatístico, foi estipulado peso 2 para metáfases de alta qualidade (A) e peso 1 para metáfases de baixa qualidade (B), da seguinte forma: para cada tratamento (0,007% colchicina por 4 h e 0,014% colchicina por 2 h) foram analisadas 9 larvas, e para cada larva foram feitas 3 lâminas (9 repetições em triplicata).

$$IQ_m = \sum \{(2*AL_1+1*BL_1)/AL_1+BL_1\}+.../n^\circ \text{ de Lâminas}$$

Sendo AL₁ = Quantidade de metáfases de alta qualidade da Lâmina 1 e

BL₁ = Quantidade de metáfases de baixa qualidade da Lâmina 1.

3.2.3.3 - Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

Com o intuito de buscar marcadores cromossômicos para detecção de triploides de forma indireta e rápida, foi feita uma análise dos cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo (NOR), por coloração com Nitrato de Prata, em indivíduos diploides e triploides de pacu, tambaqui e o respectivo híbrido tambacu. A finalidade foi de obter marcadores para identificação de triploides por análises de núcleos interfásicos, em que a simples contagem de NORs poderia caracterizar a quantidade de conjuntos cromossômicos (nível de ploidia) nos indivíduos sujeitos a triploidização, como tem sido realizado para algumas espécies de peixes.

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentou-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1 g de AgNO₃ dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções foram mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das NORs foi o seguinte:

- 1 hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 min em HCl 1N a 60°C;
- 2 secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;

3 deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3 min), a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada, retirando a lamínula e deixar secar;

4 corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 s.

3.2.3.4 *Estudos cariotípicos*

A partir dos dados das análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases de cada indivíduo, procurou-se estabelecer a ploidia para cada exemplar analisado.

Assim, as melhores metáfases, que apresentaram melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas pela câmera CCD Leica DFC310FX montada em microscópio binocular Leica DM4000, com objetiva de imersão de 100X. As imagens foram capturadas e processadas pelo *software* Leica LAS v4.3.0.

Os cromossomos foram recortados utilizando o programa Adobe Photoshop Elements 6.0 (Adobe System) para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), conforme Levan *et al.* (1964). Por fim, foram dispostos em ordem decrescente de tamanho para a organização final do cariótipo.

3.3 Análise estatística

Todos os tratamentos de triploidização deste experimento foram feitos em triplicatas, sendo que as análises citogenéticas em juvenis compreenderam 10 indivíduos por réplica, com total de 30 exemplares analisados por tratamento.

O teste estatístico foi realizado com o auxílio do software STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Os pressupostos como a normalidade e homocedasticidade foram testados pelos teste de Shapiro-Wilk's e Levene's, respectivamente. As variáveis paramétricas (quantidade média e índice de qualidade de metáfases) foram avaliadas pelo teste t de Student com nível de significância de $\alpha=0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Protocolo de citogenética de larvas para detecção de triploides

Após as análises citogenéticas de 9 larvas de tambaqui para cada tratamento, 0,007% de colchicina por 4 h de incubação e 0,014% de colchicina por 2 h de incubação, foi observado que a média de metáfases encontrada por lâmina (duas gotas de 20 µl de preparação cromossômica por lâmina) correspondeu a 6 (5 A e 1 B) e 3 (2 A e 1 B) metáfases, respectivamente (**Tabela 3**), demonstrando que os parâmetros (quantidade e qualidade) são superiores para o tratamento a 0,007% (4 h) (**Figura 4**).

Tabela 3 Quantidade média (Qm) de metáfases de baixa e alta qualidade por lâmina e por tratamento.

<i>0,007% - 4h</i>			<i>0,014% - 2 h</i>		
<i>Indivíduo</i>	<i>Qualidade</i>		<i>Indivíduo</i>	<i>Qualidade</i>	
	<i>Alta (A)</i>	<i>Baixa (B)</i>		<i>Alta (A)</i>	<i>Baixa (B)</i>
1	4	1	1	2	2
2	4	2	2	0	0
3	5	1	3	1	1
4	5	1	4	1	1
5	6	1	5	1	1
6	7	2	6	3	0
7	7	0	7	3	2
8	3	0	8	3	0
9	3	3	9	1	0
Qm/lâmina	5	1	Qm/lâmina	2	1

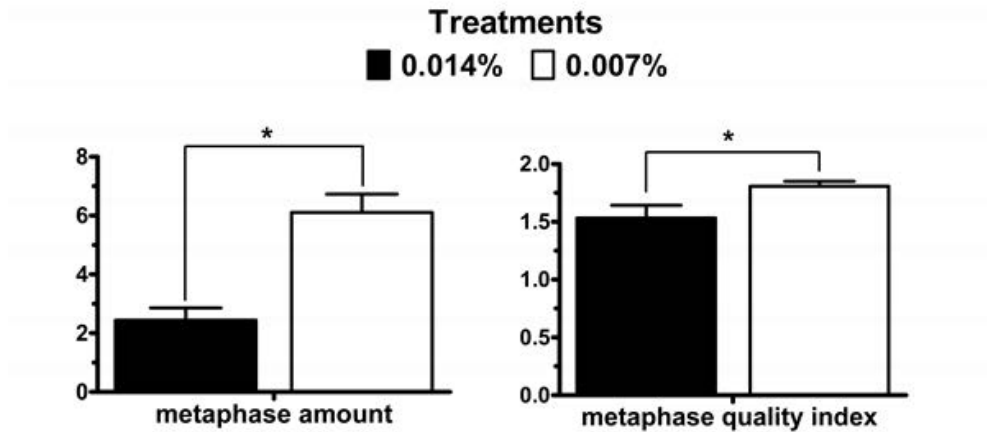


Figura 4 Comparação entre os tratamentos (0,007% por 4 h e 0,014% por 2 h) em relação a quantidade média e o índice de qualidade das metáfases.

Dessa forma, por meio das análises citogenéticas a partir de larvas, foi possível identificar a ploidia em estágios iniciais de vida de tabaqui. Os resultados permitiram identificar células mitóticas diploides ($2n$) de tabaqui, com 54 cromossomos, sendo de morfologias dos tipos metacêntricos e submetacêntricos (**Figura 5**). Além disso, verificaram-se também células mitóticas triploides ($3n$), com 81 cromossomos, dos tipos meta e submetacêntricos (**Figura 5**), confirmando a aplicabilidade da citogenética de larvas.

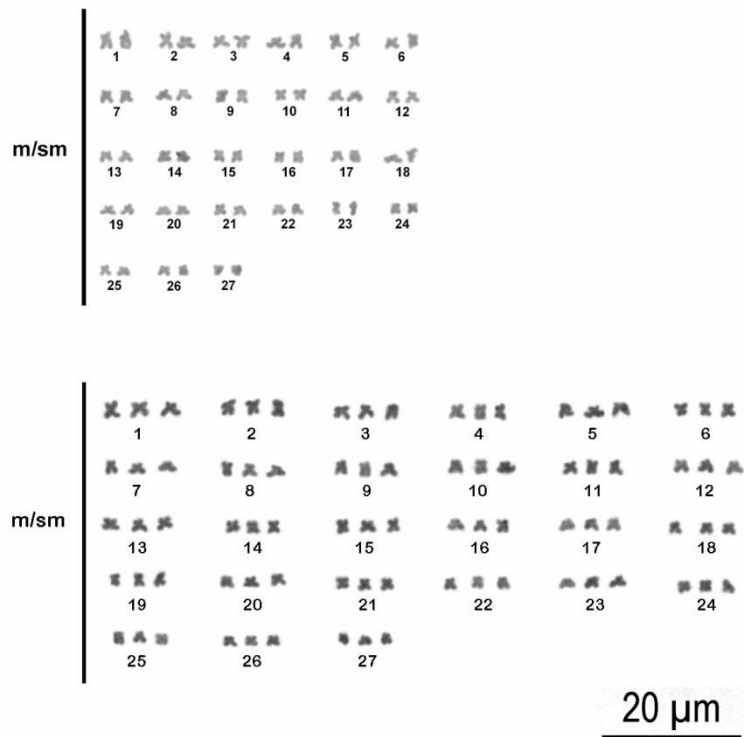


Figura 5 Cariótipos de larvas de tambaqui *C. macropomum* $2n = 54$ cromossomos (acima) e $3n = 81$ cromossomos (abaixo).

4.2 Triploidização em pacu, tambaqui e tambacu

4.2.1 Experimentos Pilotos

Inicialmente, os testes de triploidização do presente estudo foram direcionados para as espécies puras de pacu (*P. mesopotamicus*) e tambaqui (*C. macropomum*), para que posteriormente os resultados fossem aplicados no híbrido interespecífico tambacu ($\text{♀ } C. macropomum \times \text{♂ } P. mesopotamicus$). Estes testes foram realizados na temporada de dezembro de 2013 e janeiro de 2014.

De forma geral, os choques frios apresentaram taxas de eclosão menores do que os choques quentes. No pacu, por exemplo, não houve taxa de eclosão no

choque térmico frio a 7°C, seja com tempo de 15 min ou 30 min (**Tabela 4**). No tambaqui, reduziu-se o tempo de choque frio para 10 min, o que permitiu obter taxas de eclosão melhores que do pacu, de 57,3% a temperatura de 8°C e 48,4% a 6°C (**Tabela 4**). Entretanto, esses valores de taxas de eclosão dos choques frios foram considerados menos efetivos do que os choques quentes nos ovos de tambaqui, reduzindo a viabilidade de se realizar triploidia no tambaqui por choques frios (**Tabela 4**). Além disso, anomalias no desenvolvimento embrionário foram verificadas quando se realiza choques térmicos frios nos ovos, com alta frequência de embriões deformados, tanto para o pacu quanto para o tambaqui.

Tabela 4 Taxas de eclosão dos experimentos pilotos em pacu *P. mesopotamicus* e tambaqui *C. macropomum*.

Tratamento	Espécie	Tempo de fertilização (min)	Tempo de choque (min)	Temperatura (°C)	Taxa de eclosão
1		1	15	7	0,0%
2		1	30	7	0,0%
3	Pacu	1	4	41	33,3%
4		1	8	41	4,7%
Controle				25	36,9%
1		1	10	6	57,3%
2		1	10	8	48,4%
3	Tambaqui	1	2	39	65,4%
4		1	2	41	85,7%
Controle				25	86,0%

4.2.2 Experimentos finais

✓ *Pacu Piaractus mesopotamicus*

Para o pacu, as análises citogenéticas de juvenis revelaram que não houve triploides no tratamento realizado 2 min pós-fertilização, com choque de

temperatura a 41°C por 2 min de duração. Neste tratamento, observaram-se apenas exemplares com 54 cromossomos, de morfologias meta e submetacêntricos, o que é característico de indivíduos 2n (**Tabela 5 e Figura 6**). Da mesma forma, foram encontrados somente exemplares de juvenis diploides (2n=54) para o tratamento realizado 1 min pós fertilização, com choque de temperatura a 43°C por 2 min de duração (**Tabela 5**).

Contudo, indivíduos triploides de pacu com 81 cromossomos, revelados por citogenética em juvenis, foram detectados a uma taxa de 11,8% no tratamento realizado 2 min pós-fertilização, com choque de temperatura a 43°C por 2 min de duração (**Tabela 5 e Figura 6**).

Tabela 5 Taxas de eclosão e de triploides do experimento final em pacu *P. mesopotamicus*.

Tratamento	Espécie	Tempo pós fertilização (min)	Tempo de choque (min)	Temperatura (°C)	Taxa de eclosão	Taxa de 3n (Fase Juvenil)
1	Pacu	1	2	43	30,4%	0,0%
2		2	2	41	50,0%	0,0%
3		2	2	43	50,0%	11,8%
Controle		-	-	25	77,3%	0,0%

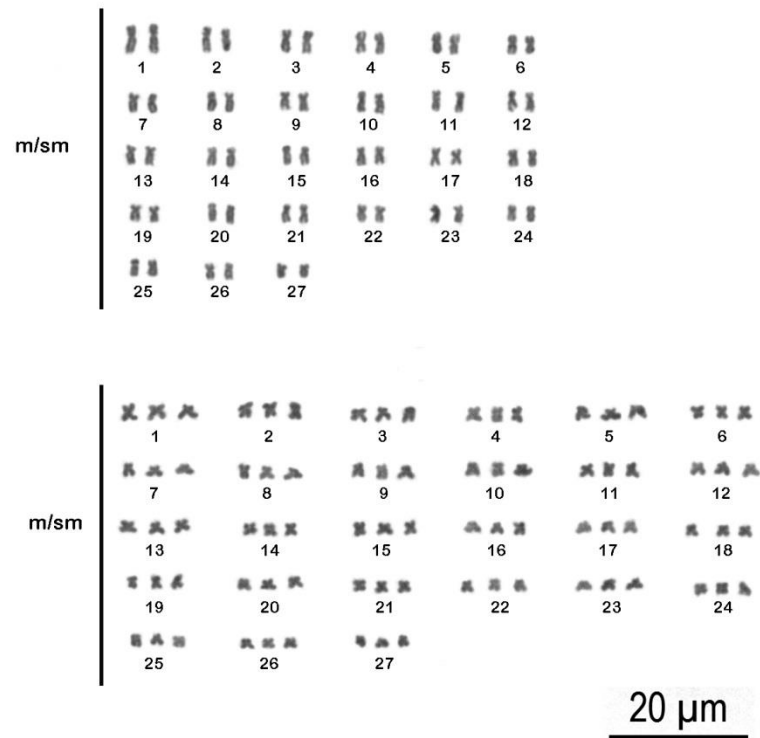


Figura 6 Cariótipos de juvenis de pacu $2n = 54$ cromossomos (acima), e $3n = 81$ cromossomos (abaixo)

✓ *Tambaqui Colossoma macropomum*

Para o experimento de triploidia no tambaqui, não se verificou juvenis triploides no choque a 41°C (por 2 min), 1 min pós-fertilização. Porém, quando os ovos foram expostos a 43°C (por 2 min), 2 min pós-fertilização, obteve-se uma frequência de 80% de larvas triploides analisadas citogeneticamente; entretanto, observou-se uma redução de indivíduos triploides ($3n = 81$ cromossomos) na fase juvenil, com taxa de triploide de 29,4% (**Tabela 6** e **Figura 7**). Em ambos os tratamentos, as taxas de eclosão foram similares (**Tabela 6**).

Tabela 6 Taxas de eclosão e de triploides (fases juvenil e larva) do experimento final em tambaqui.

Tratamento	Espécie	Tempo pós fertilização (min)	Tempo de choque (min)	Temperatura (°C)	Taxa de eclosão	Taxa de 3n (Fase Larval)	Taxa de 3n (Fase Juvenil)
1		1	2	41	66,7%	-	0,0%
2	Tambaqui	2	2	43	50,4%	80,0%	29,4%
Controle		-	-	25	75,1%	-	0,0%

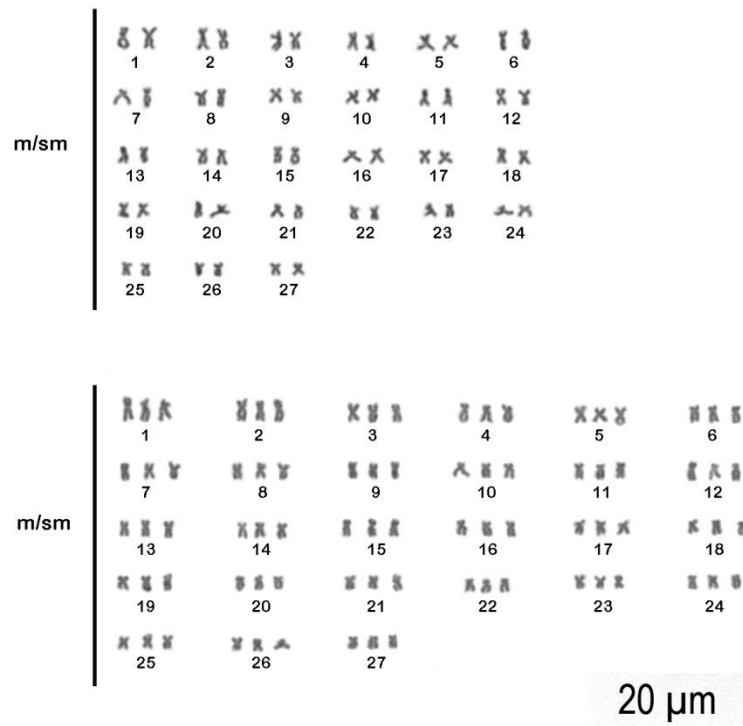


Figura 7 Cariótipo de juvenis de tambaqui $2n = 54$ cromossomos (acima) e $3n = 81$ cromossomos (abaixo).

✓ *Tambacu* (♀ *C. macropomum* x ♂ *P. mesopotamicus*)

Quando os ovos de tambacu foram expostos a 41°C (2min), 1 min pós fertilização, apesar das taxas de eclosão serem similares, a taxa de triploides ($3n = 81$ cromossomos) (**Figura 8**) na fase juvenil foram maiores (57,8%) (**Tabela 7**) do que os resultados observados para o parental tambaqui (0%).

Por outro lado, quando os ovos de tambacu foram expostos a 43°C (2 min), 2 min pós-fertilização, os resultados de citogenética de larvas foram abaixo do

que foi observado para o parental tambaqui, pois a taxa de larvas triploides detectada para o tambacu foi de 33,3%, enquanto que para o tambaqui foi de 80%. Além disso, a taxa de eclosão do híbrido tambacu no tratamento a 43°C (51,7%) foi menor do que no tratamento a 41°C (67,8%) (**Tabela 7**).

Similarmente ao que foi observado no tambaqui, para o híbrido tambacu também foram encontradas diferentes taxas de triploides quando os tratamentos foram avaliados por citogenética de larvas e, posteriormente, por citogenética de juvenis (com aproximadamente 3 meses de idade). Foi possível detectar diminuição na taxa de indivíduos triploides de tambacu no tratamento a 43 °C, quando analisado da fase larval para fase juvenil (33% em larvas para 8,7% em juvenis) (**Tabela 7**).

Tabela 7 Taxas de eclosão e de triploides (fases juvenil e larva) do experimento final em tambacu.

<i>Tratamento</i>	<i>Peixe</i>	<i>Tempo pós fertilização (min)</i>	<i>Tempo de choque (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Taxa de eclosão</i>	<i>Taxa de 3n (Fase Larval)</i>	<i>Taxa de 3n (Fase Juvenil)</i>
1		1	2	41	67,8%	-	57,8%
2	Tambacu	2	2	43	51,7%	33,3%	8,7%
Controle		-	-	25	69,2%	-	0,0%

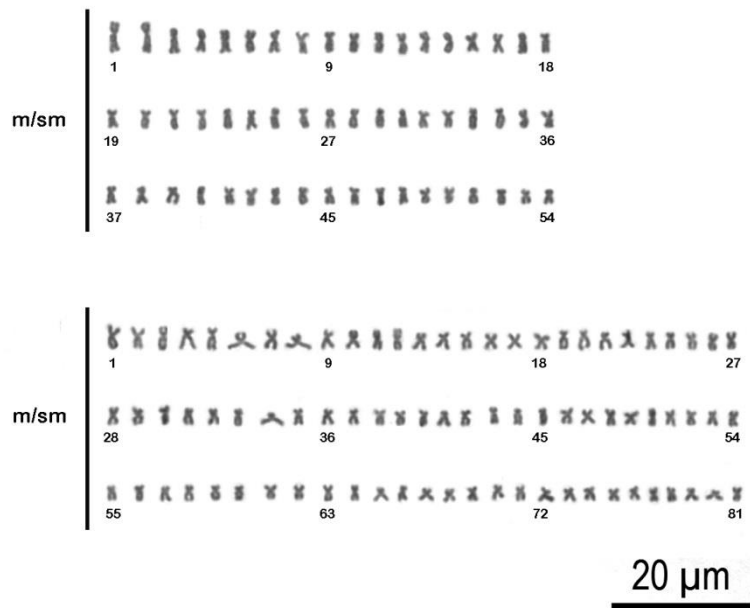


Figura 8 Cariótipo de juvenis de tabaco $2n = 54$ cromossomos (acima) e $3n = 81$ cromossomos (abaixo).

4.2 Análise de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) em diploides e triploides

Análises das NORs por coloração com Nitrato de Prata (AgNO_3) evidenciou variação intra-individual (NORs múltiplas) de cromossomos portadores de nucléolos. Este padrão de NORs múltiplas estava presente nas metáfases diploides e triploides de pacu, tambaqui e tabaco, particularmente nas regiões terminais do braço longo ou curto de alguns cromossomos (**Figura 9**). Nas células mitóticas dos indivíduos pacus diploides foram encontradas metáfases com 2 a 4 cromossomos marcados com AgNO_3 , enquanto que em triploides foram observadas metáfases com 2 a 5 NORs. Nas células dos tambaquis diploides foram encontradas metáfases com 2 e 3 cromossomos portadores de NOR, e nos triploides foram encontradas metáfases com 2 a 4 marcações. Em híbridos

tambacus, os exemplares diploides também apresentavam metáfases com 2 e 3 cromossomos portadores de NOR, e em triploides foram verificadas de 2 a 4 marcações de Ag-NOR.

Dessa forma, as análises de núcleos interfásicos também apresentaram o mesmo padrão de NORs múltiplas (**Figura 10**), com variação intra-individual, o que impede de utilizar este marcador cromossômico para distinguir com confiança indivíduos diploides e triploides, tanto de pacu e tambaqui, quanto do respectivo híbrido tambacu.

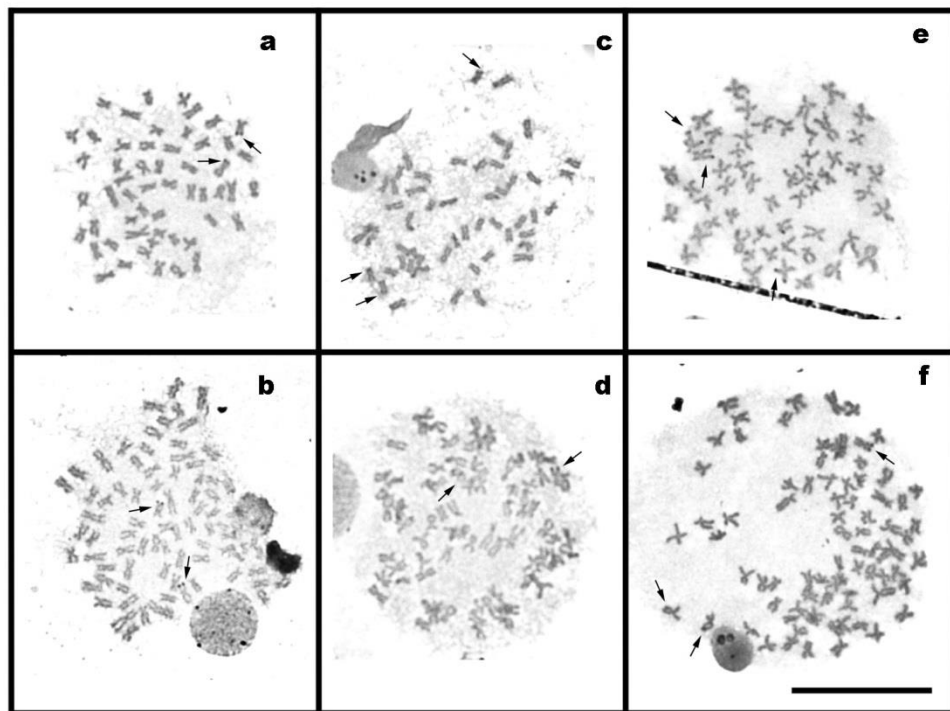


Figura 9 Cromossomos metafásicos marcados com Nitrato de Prata (AgNO_3): Situações que podem levar à identificações equivocadas. (a) pacu $2n$ com 2 marcações e (b) pacu $3n$ com duas marcações; (c) tambaqui $2n$ com 3 marcações e (d) tambaqui $3n$ com 2 marcações; (e) tambacu $2n$ com 3 marcações e (f) tambacu $3n$ com 3 marcações.

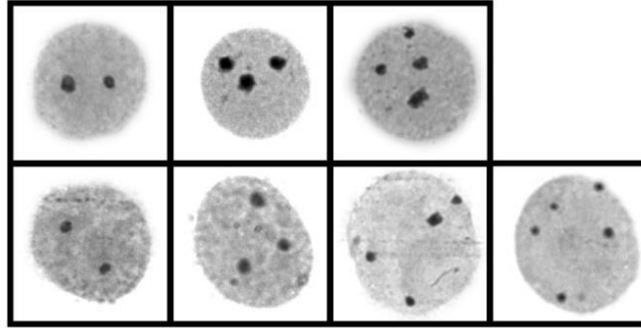


Figura 10 Núcleos interfásicos marcados com Nitrato de Prata (AgNO_3) revelando diferentes marcações (NOR-múltipla) para tabaqui diploide (acima) e tabaqui triploide (abaixo).

5 DISCUSSÃO

5.1 Protocolo de citogenética de larvas e análise de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NOR) para detecção de triploides

Na maioria das análises de citogenética de peixes neotropicais, as preparações de cromossomos foram obtidas pelo método de “*air-drying*” precedido por tratamentos curtos com colchicina de células *in vitro* (Foresti *et al.*, 1993) ou *in vivo* (Bertollo *et al.*, 1978; Foresti *et al.*, 1981). Outras modificações de tais protocolos têm sido descritas, como método alternativo de se obter metáfases de peixe em campo, onde nenhuma infraestrutura se encontra disponível (Blanco *et al.*, 2012). As células utilizadas para estas técnicas são geralmente obtidas de amostras de tecido do rim anterior. Entretanto, tecidos celulares específicos de peixes não podem ser isolados para preparação de cromossomos nos estágios de vida iniciais de peixes, como nas larvas.

Poucas técnicas de preparação cromossômica estão disponibilizadas para a realização de estudos cromossômicos nos estágios iniciais de vida dos peixes. De acordo com Baksi e Means (1988), em estudos de citogenética de larvas, maior exposição das células em maiores concentrações de colchicina é necessária, pois tal método possibilitaria melhor difusão desta substância dentro do meio celular. Neste protocolo, foram obtidos cromossomos provenientes das espécies *Cyprinodon variegatus* e *Morone saxatilis*, e o melhor método de tratamento com colchicina para ovos e larvas foram determinados em solução de 0,05% por 4 h. Entretanto, os autores responsáveis pela metodologia aconselharam a realização de estudos adicionais para refinar o método e ampliar

sua aplicabilidade em outras espécies de peixe. Portanto, no presente estudo, os resultados indicaram que o melhor tratamento com colchicina para a espécie tambaqui, a fim de se obter metáfases mitóticas de alta qualidade foram aplicações de soluções de 0,007% por 4 h. Em maiores concentrações de colchicina e tempo menor de exposição (0,014% por 2 h), os resultados mostraram altas taxas de metáfases de baixa qualidade, onde cromossomos condensados foram facilmente observados, muitas vezes dentro de uma célula intacta ou apenas ligeiramente espalhados. A presença de cromossomos condensados é uma das principais dificuldades em se obter metáfases mitóticas de alta qualidade nos estágios iniciais de vida dos peixes (Baksi e Means, 1988).

A região Neotropical possui a ictiofauna de água doce mais diversificada no mundo, com aproximadamente 6.000 espécies reconhecidas (Reis *et al.*, 2003). Destas, cerca de 1.000 espécies têm sido descritas citogeneticamente (Oliveira *et al.*, 2009). Tais estudos cromossômicos abordam diversos aspectos, muitos deles relacionados ao entendimento de processos de diferenciação cromossômica entre espécies e populações. Alguns estudos são também relacionados à descoberta da origem, função e evolução de cromossomos B, assim como cromossomos sexuais (Oliveira *et al.*, 2009). Entretanto, apesar de pouco utilizada na aquicultura, a citogenética pode trazer benefícios e aplicações práticas para o cultivo de peixes (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009, 2014), como observado no presente estudo para verificar o nível de ploidia. Indivíduos diploides de tambaqui mostraram 54 cromossomos, enquanto que exemplares triploides demonstraram um número de 81 cromossomos.

Em estudos citogenéticos prévios, tambaqui foi caracterizado por um número de cromossomos diploide de 54, e demonstrou morfologias do tipo metacêntrica e submetacêntrica (Almeida-Toledo *et al.*, 1987; Nirchio *et al.*, 2003).

A análise da região organizadora de nucléolo por nitrato de prata em cromossomos metafásicos não se mostrou eficiente para detectar triploides das espécies e híbrido estudados. Este método pode ser útil em casos de peixes com genomas de NOR simples (somente um par portador da NOR), como em *Rhamdia quelen* (Huergo e Zaniboni-Filho, 2006), mas em situações de NORs múltiplas podem levar a interpretações errôneas sobre o nível de ploidia. NORs representam regiões dos cromossomos envolvidas na transcrição de genes ribossomais que podem ser visualizados após a coloração por nitrato de prata quando genes apresentam atividade na fase de intérfase que antecipa a mitose (Goodpasture e Bloom, 1975; Miller *et al.*, 1976; Howell e Black, 1980). Deste modo, o nitrato de prata detecta por coloração somente regiões NORs ativas, desde que não é o rDNA que sofre coloração, mas sim proteínas ácidas associadas com o processo de produção de ribossomos (Howell, 1977; Jordan, 1986). Tal fato explica a variabilidade intra-individual de marcações de NORs entre diferentes metáfases analisadas.

Em conclusão, a validação do protocolo de citogenética de larva auxiliará na otimização dos estudos de triploidia no pacu, tambaqui e seu respectivo híbrido, cuja meta é alcançar 100% de peixes triploides. Neste caso, uma vez realizados os tratamentos de triploidização, pouco tempo será necessário para verificar o nível de ploidia, fornecendo um método simples, confiável e de baixo custo. Tambaquis triploides representam uma biotecnologia importante para a

aquicultura brasileira e, no futuro, poderão ser comercializados em larga escala de forma sustentável para o meio ambiente e sociedade.

5.2 Triploidização em pacu, tambaqui e tambacu

Os valores críticos de indução de poliploides por choque de temperatura para cada variável (tempo, intensidade e duração) são espécie-específicos. Portanto, para obtenção de altas taxas de triploides, é necessária a otimização de protocolos para cada espécie que se deseja realizar a indução à triploidia (Piferrer *et al.*, 2000, 2003).

Os protocolos de indução de triploides podem variar conforme a temperatura da água em que espécies de peixe sobrevivem em ambientes naturais (Piferrer *et al.*, 2009). Aparentemente, choques quentes parecem ser mais efetivos em espécies de água mais frias, enquanto que choques frios mostraram-se mais eficientes em espécies de peixe que habitam águas com temperaturas mais elevadas (Chourrout, 1980; Hammed *et al.*, 2010).

Entretanto, estudos piloto de triploidização realizadas por meio de choque térmico em espécies consideradas de água quente como o pacu (*P. mesopotamicus*) e tambaqui (*C. macropomum*), demonstraram melhores taxas de eclosão para ambas as espécies, e maiores índices de triploides para o tambaqui por meio de choques térmicos realizados com temperaturas quentes do que por temperaturas frias. Porém, no experimento piloto do pacu as taxas de eclosão do próprio controle foram baixas, provavelmente afetadas pela baixa qualidade dos gametas (Taylor *et al.*, 2011).

A mortalidade durante o desenvolvimento embrionário é geralmente maior em indivíduos triploides quando comparadas a indivíduos diploides (Piferrer *et al.*, 2009). Segundo Taylor *et al.* (2011) e Kjørsvik *et al.* (2003), a qualidade dos gametas tem maior influência na taxa de sobrevivência do que a própria ploidia, assim como o tipo de choque induzido (Opstad *et al.*, 2013). Certamente, fatores como o grau de maturação e temperatura de cultivo dos reprodutores podem ter efeitos significativos na qualidade dos gametas e sobrevivência da progênie (Bromage *et al.*, 1992).

O desempenho de triploides durante seu desenvolvimento é espécie-específico (Piferrer *et al.*, 2009). Diversos estudos demonstram baixas sobrevivências nas fases iniciais de desenvolvimento de triploides em relação aos organismos diploides, principalmente devido à baixa viabilidade dos ovos, danos no desenvolvimento embrionário e larvas eclodidas tardiamente (Chourrout, 1988; Ihssen *et al.*, 1990; Pandian and Koteeswaran, 1998; Benfey, 1999; Arai, 2001; Felip *et al.*, 2001; Hulata, 2001; Gomelsky, 2003; Tiwary *et al.*, 2004; Maxime, 2008). Tais resultados corroboraram com os resultados do experimento final do pacu e do tambaqui, uma vez que no experimento final do pacu foi constatada uma baixa taxa de triploides (11,8%) na fase juvenil. Já no experimento final do tambaqui foi constatado maior taxa de triploides % na fase larval, sendo que na fase juvenil tal índice caiu bruscamente, além de já observada grande quantidade de embriões deformados (dados não quantificados). Esses dados sugerem que a mortalidade de triploides é alta durante seu desenvolvimento (larva – juvenil) e que a mortalidade ocorre principalmente no estágio larval, provavelmente ocasionado pelo choque da indução (Piferrer *et al.*, 2009).

Teoricamente, a hibridação poderia ocasionar a heterose positiva e poderia ser somada com a esterilidade da triploidia. Alguns estudos mostram que a hibridação combinada com manipulação cromossômica pode aumentar a viabilidade e a estabilidade dos peixes híbridos durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Grey *et al.*, 1993; Wilkins *et al.*, 1995). Entretanto, não é o que foi observado no estudo realizado com o híbrido tambacu.

Em estudo comparativo entre espécies puras, diploides híbridos e triploides híbridos de *Labeo rohita* x *Cirrhinus cirrhosu*, duas espécies de água quente e induzidas à triploidia por meio de choque quente, Rahi e Shah (2012) observaram que a taxa de sobrevivência em espécies puras é maior do que em híbridos diploides e híbridos triploides nas fases iniciais (avaliação feita em larvas até a absorção do saco vitelínico), e maior para híbridos diploides com relação aos híbridos triploides.

Da mesma forma, pode ter ocorrido quando se compara a taxa de triploides do híbrido na fase larval e na fase juvenil com a taxa de triploides do parental tambaqui na fase larval e na fase juvenil, pois nota-se que ocorre maior mortalidade do híbrido em relação ao tambaqui nos estágios iniciais de desenvolvimento corroborando também com outros trabalhos (Kim *et al.*, 1995; Blanc *et al.*, 2000; Fopp-Bayat *et al.*, 2007).

No entanto, como ainda não foram obtidos 100% de triploidia no presente estudo, estudos posteriores ainda são necessários para se avaliar e refinar os protocolos de triploidia das espécies tambaqui, pacu e seu respectivo híbrido tambacu, com maior enfoque nos choques de temperatura quente. Porém, para o pacu, pelos poucos resultados obtidos, mais estudos relacionados triploidização

por meio de choque de temperaturas frias também podem ser necessários. Vários testes de padronização podem ser feitos, inclusive no tempo pós-fertilização dos ovos. Para espécies de água quente, geralmente o choque pode ser aplicado de 2 a 7 min pós-fertilização, com variações de temperatura entre 34 a 41 °C, com um tempo de duração de 45 s a 3,5 min; já na temperatura fria, o choque pode variar entre -1 a 4 °C, com duração estimada de 2 a 20 min (Piferrer *et al.*, 2009).

No presente estudo, a obtenção de peixes triploides para o pacu *P. mesopotamicus*, tambaqui *C. macropomum* e o híbrido interespecífico tambacu a partir de indução artificial com choques térmicos foi o principal resultado obtido. Triploidia em Serrasalmídeos já foi detectada de forma espontânea, principalmente para híbridos interespecíficos, como o caso de um indivíduo do híbrido tambacu (♀ tambaqui *Colossoma macropomum* x ♂ pacu *Piaractus mesopotamicus*) (Almeida-Toledo *et al.*, 1987), um espécime pós-F1 resultante do cruzamento entre ♀ pacu x ♂ tambacu (♀ tambaqui x ♂ pacu) (Almeida-Toledo *et al.*, 1996), e outro indivíduo híbrido entre gêneros entre ♀ patinga (♀ pacu x ♂ pirapitinga *Piaractus brachypomus*) x ♂ tambaqui (Hashimoto *et al.*, 2014).

No Brasil, a ocorrência de triploidização natural para peixes Neotropicais parece ser um fenômeno relativamente frequente. Já foram detectados para diferentes espécies e grupos de peixes, tais como *Leporinus* cf. *elongatus* (Characiformes, Anostomidae); *Astyanax eigenmanniorum* e *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae); *Characidium* cf. *zebra* (Characiformes, Crenuchidae); *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae); *Gymnotus carapo* (Gymnotiformes, Gymnotidae); *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) entre outras (Fauaz *et al.*, 1994; Fernandes-Matioli *et al.*, 1998; Giuliano-Caetano e Bertollo, 1990; Borin *et al.*, 2002; Molina *et*

al., 2007; Pansonato-Alves *et al.*, 2011). A maioria dos casos está relacionada a peixes de pequeno porte e que apresentam fecundação externa (realização da segunda fase da divisão meiótica ocorre no meio ambiente), e vivem em cabeceiras de riachos onde é mais provável que ocorram mudanças bruscas da temperatura, o que pode facilitar a retenção do segundo corpúsculo polar. Até o momento, em aquicultura, os estudos de indução de peixes triploides no Brasil foram desenvolvidos para a espécie jundiá (*Rhamdia quelen*) (Silva *et al.*, 2007; Weiss e Zaniboni-Filho, 2009; 2010). Nesses experimentos, os protocolos já permitem a obtenção de 100% de triploides (Vozzi *et al.*, 2003; Huergo e Zaniboni-Filho, 2006), e em um futuro próximo, há perspectivas que estes animais sejam utilizados em escala comercial devido às dificuldades para a produção em larga escala do jundiá, tais como a maturação sexual precoce e a heterogeneidade em sua taxa de crescimento (Fracalossi *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2011).

Por esta razão, a triploidia em espécies Neotropicais também deve ser melhor explorada na piscicultura brasileira, pois podem trazer benefícios para aumentar a produção das principais espécies nativas para o desenvolvimento da aquicultura, uma vez que peixes triploides têm potencial para obtenção de maiores taxas de crescimento, melhor rendimento da carcaça e de qualidade de carne (para revisão, ver Piferrer *et al.*, 2009). Assim, o uso de biotecnologias para o melhoramento genético é uma alternativa para suprir a demanda do mercado consumidor e uma estratégia para auxiliar na redução da pressão da pesca sobre as populações naturais.

Por outro lado, peixes triploides apresentam tendência de serem estéreis, devido à incompatibilidade no pareamento dos conjuntos cromossômicos durante

a formação dos gametas. Esta característica faz dos triploides um excelente modelo para ser utilizado com finalidade de conservação. A triploidia se mostra um mecanismo importante para o cultivo de espécies alóctones, como é o caso da introdução do tambaqui (originalmente da bacia Amazônica) na bacia do Tocantins-Araguaia, onde a sua produção foi recentemente liberada (Instrução Normativa n. 9/2012, Ministério do Meio Ambiente). Nesta bacia, existem espécies nativas como a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), que já é amplamente utilizada pelos piscicultores da região. Sendo assim, escapes acidentais podem ocorrer com a produção de tambaquis em tanques-rede, com consequente quebra da barreira geográfica entre as duas espécies e formação de zonas híbridas. Isso poderia gerar uma população somente de híbridos e causar a contaminação de todo o *pool* genético da espécie autóctone (Hashimoto *et al.*, 2012), como também o desequilíbrio da ictiofauna da bacia do Tocantins-Araguaia. Assim, a introdução do tambaqui triploide (ao invés de diploide) poderia ser uma alternativa para esta problemática. Entretanto, é importante ressaltar que a esterilidade de tambaqui e pacu triploides ainda precisa ser avaliada em estudos posteriores, assim como o híbrido proveniente desse cruzamento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em análise geral do trabalho, observa-se que as maiores taxas de triploides ocorreram nas temperaturas quentes e para as espécies puras os melhores resultados foram encontrados nos mesmos tratamentos (43°C por 2 min, 2 min pós-fertilização), já para o híbrido os melhores resultados foram encontrados no tratamento de menor temperatura (41°C por 2 min, 1 min pós fertilização). Outro aspecto importante é a constatação de mortalidade de triploides durante o período de desenvolvimento larval para juvenil, que foi possível identificar a partir da técnica de citogenética de larvas desenvolvida durante o trabalho. Pode-se observar também que a coloração das NORs por AgNO_3 é ineficaz para verificar o status de ploidia dos cruzamentos estudados. Apesar desse estudo não ter atingido 100% de triploidia, poderá servir como suporte para estudos posteriores de padronização da técnica de indução a triploidia. Estudos com relação à esterilidade e desempenho zootécnico se fazem importantes para desvendarmos o real impacto que as espécies estudadas podem causar tanto nas pisciculturas quanto no meio ambiente, principalmente quando se trata de espécies nativas. E juntamente com a indução é necessário que haja uma técnica de verificação da ploidia dos peixes. Sendo assim, esse trabalho viabiliza a produção de triploides para estudos futuros.

7 REFERÊNCIAS

ALLENDORF, F. W. *et al.* The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613-622, 2001.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *et al.* Cytogenetic studies in *Colossoma mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. **Selection, hybridization and genetic engineering in aquaculture**, v. 1, p. 189-195, 1987.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F. *et al.* Gynogenetic fish produced by a backcross involving a male hybrid (female *Colossoma macropomum* x male *Piaractus mesopotamicus*) and a female *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 9, p. 31-37, 1996.

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

BAKSI, S. M.; MEANS, J. C. Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. **Journal of fish biology**, v. 32, n. 3, p. 321-325, 1988.

BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 325-337, 2001.

BECK, M. L.; BIGGERS, C. J.; DUPREE, H. K. Karyological analysis of *Ctenopharyngodon idella*, *Aristichthys nobilis*, and their F1 hybrid. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 109, n. 4, p. 433-438, 1980.

BECK, M. L.; BIGGERS, C. J. Chromosomal investigation of *Ctenopharyngodon idella* x *Aristichthys nobilis* hybrids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 38, n. 3, p. 319-319, 1982.

BENFEY, T. J. The physiology and behavior of triploid fishes. **Reviews in Fisheries Science**, v. 7, n. 1, p. 39-67, 1999.

BENTSEN, H. B.; THODESEN, J. Genetic interactions between farmed and wild fish, with examples from the Atlantic salmon case in Norway. In: **Selection and breeding programs in aquaculture**. Springer Netherlands, p. 319-334, 2005.

BERTOLLO, L. A. C. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 1, p. 103-120, 1978.

BLANC, J. M.; VALLÉE, F.; DORSON, M. Survival, growth and dressing traits of triploid hybrids between rainbow trout and three charr species. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 4, p. 349-358, 2000.

BLANCO, D. R. *et al.* A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of fish biology**, v. 81, n. 1, p. 351-357, 2012.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; OLIVEIRA, C. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. **Genetica**, v. 115, n. 3, p. 253-258, 2002.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**: Brasil 2010. Brasília: MPA, 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011.

BROMAGE, N. *et al.* Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 100, n. 1, p. 141-166, 1992.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among sympatric species of Characium (Pisces, Characiformes). Diversity analysis with the description of a ZW sex chromosome system and natural triploidy. **Caryologia**, v. 54, n. 3, p. 253-260, 2001.

CHOURROUT, D. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Reproduction Nutrition Développement**, v. 20, n. 3A, p. 727-733, 1980

CHOURROUT, D. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. **Aquaculture**, v. 36, n. 1, p. 111-126, 1984.

CHOURROUT, D. *et al.* Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—potential of tetraploid fish. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, n. 2, p. 193-206, 1986.

CHOURROUT, D. Induction of gynogenesis, triploidy, and tetraploidy in fish. **Isi Atlas of Science-animal & Plant sciences**, v. 1, n. 1, p. 65-70, 1988.

CRISCUOLO-URBINATI, E. *et al.* The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 2087-2094, 2012.

DORSON M.; CHEVASSUS B.; TORHY C. Comparative susceptibility of three species of char and rainbow trout x char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses. **Diseases of aquatic Organisms**, v. 11, n. 3, p. 217-224, 1991.

DUNHAM R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Wallingford, UK: CABI, 2004.

FAO The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, 2014

FAUAZ, G.; VICENTE, V. E.; MOREIRA, O. Natural triploidy and B-chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 17, n. 2, p. 157-163, 1994.

FELIP, A. *et al.* Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 1, p. 76-88, 2001.

FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; TOLEDO-FILHO, S. A. Natural triploidy in the Neotropical species *Gymnotus carapo* (Pisces: Gymnotiformes). **Caryologia**, v. 51, n. 3-4, p. 319-322, 1998.

FOPP-BAYAT, D. *et al.* Viability of diploid and triploid larvae of Siberian sturgeon and bester hybrids. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 12, p. 1301-1304, 2007.

FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, L. F.; TOLEDO, F. S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; 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.

FRACALOSSO, D. M. *et al.* Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

FRANCESCON, A. *et al.* Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquaculture**, v. 236, n. 1, p. 201-209, 2004.

GALBREATH, P. F.; THORGAARD, G. H. Sexual maturation and fertility of diploid and triploid Atlantic salmon x brown trout hybrids. **Aquaculture**, v. 137, n. 1, p. 299-311, 1995.

GIULIANO-CAETANO, L.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotypic variability in hoplerythrinus-unitaeniatus (pisces, characiformes, erythrinidae). 2. Occurrence of natural triploidy. **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, n. 2, p. 231-237, 1990.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GOMELSKY, B. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 05, p. 408-415, 2003.

GOMES L. C.; SIMÕES L. N.; ARAUJO-LIMA C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO B.; GOMES L. C. **Espécies nativas para a**

piscicultura no Brasil, p. 589-606. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, n. 1, p. 37-50, 1975.

GRAY, A. K.; EVANS, M. A.; THORGAARD, G. H. Viability and development of diploid and triploid salmonid hybrids. **Aquaculture**, v. 112, n. 2, p. 125-142, 1993.

HALLERMAN E. Application of risk analysis to genetic issues in aquaculture. In: BONDAD-REANTASO M. G.; ARTHUR J. R.; SUBASINGHE R. P. **Understanding and Applying Risk Analysis in Aquaculture**, p. 47–66. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 519. FAO, Rome, 2008.

HAMMED, A. M.; FASHINA-BOMBATA, H. A.; OSINAIKE, A. O. The use of cold shock in inducing triploidy in African mud catfish (*Clarias gariepinus*). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 12, 2010.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Genetica**, v. 137, n. 2, p. 135-140, 2009.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**, v. 298, n. 3, p. 346-349, 2010.

HASHIMOTO, D. T.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 4, p. 861-866, 2010.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture**, v. 321, n. 1, p. 49-53, 2011.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, n. 2, p. 108-118, 2012.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 876-884, 2013.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture. **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014.

HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, v. 62, n. 4, p. 361-367, 1977.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

HUERGO, G. M.; 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.

HULATA, G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica**, v. 111, n. 1-3, p. 155-173, 2001.

HUSSAIN, M. G. *et al.* Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 138, n. 1, p. 87-97, 1995.

IBAMA (2007) Estatística da Pesca 2007: Brasil – Grandes regiões e unidades da Federação. 113 pp.

IHSSEN, P. E. *et al.* Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 119, n. 4, p. 698-717, 1990.

JORDAN, G. At the heart of the nucleolus. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 489-490, 1986.

KANTEK, D. L. Z. *et al.* Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguazu River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 67-74, 2007.

KIM, D. S.; NAM, Y. K.; PARK, I. S. Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Aquaculture**, v. 135, n. 4, p. 257-265, 1995.

KJØRSVIK, E.; HOEHNE-REITAN, K.; REITAN, K. I. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 227, n. 1, p. 9-20, 2003.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

MACHADO, S. N. *et al.* Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. **Caryologia**, v. 65, n. 1, p. 40-46, 2012.

MAIR G.C. (2007). Genetics and breeding in seed supply for inland aquaculture. In: Bondad-Reantaso MG (ed.) Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture, pp. 519-547. **FAO Fisheries Technical Paper**. No. 501. FAO, Rome.

MAISTRO, E. L. *et al.* Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia**, v. 47, n. 3-4, p. 233-239, 1994.

MALACRIDA, A. C. C. P.; DIAS, A. L.; GIULIANO-CAETANO, L. Natural triploidy in *Astyanax aff. scabripinnis* (Pisces, Characidae) of the Tibagi river basin-PR. **Cytologia**, v. 68, n. 3, p. 267-270, 2003.

MARTINO, G. Retrocruce de hembras híbridos (F1) (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) con machos de las especies parentales. **CIVA 2002: Comunicaciones y Foros de Discusión**, p. 688-693, 2002.

MAXIME, V. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. **Fish and Fisheries**, v. 9, n. 1, p. 67-78, 2008.

MILLER, O. J. *et al.* Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 12, p. 4531-4535, 1976.

MOLINA, W. F.; MARGARIDO, V. P.; GALETTI JR, P. M. Natural triploidy in *Leporinus cf. elongatus* bearing sex chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 567-569, 2007.

MORELLI, S. *et al.* Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235-244, 1983.

NIRCHIO, M. *et al.* Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Caryologia**, v. 56, n. 4, p. 405-411, 2003.

OCALEWICZ, K.; JANKUN, ME LUCZYNSKI M. Cytogenetic characteristics of interspecific hybrids and chromosome set manipulated finfish. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F e Kapoor BG (eds.), **Fish Cytogenetics**. 2006.

OLIVEIRA, C. *et al.* Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, n. 57, p. 624, 1988.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009.

OPSTAD, I. *et al.* The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on survival, growth and deformities during early life stages. **Aquaculture**, v. 388, p. 54-59, 2013.

PANDIAN, T. J.; KOTEESWARAN, R. Ploidy induction and sex control in fish. **Hydrobiologia**, v. 384, n. 1-3, p. 167-243, 1998.

PANSONATO-ALVES, J. C. *et al.* Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). **Journal of fish biology**, v. 78, n. 1, p. 183-194, 2011.

PIFERRER, F. *et al.* Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. **Aquaculture**, v. 188, n. 1, p. 79-90, 2000.

PIFERRER, F. *et al.* Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. **Aquaculture**, v. 220, n. 1, p. 821-831, 2003.

PIFERRER, F. *et al.* 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.

PORTO-FORESTI, F. *et al.* Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 195-202, 2008.

PORTO-FORESTI, F. *et al.* Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas In: BALDISSEROTTO B.; GOMES L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 589-606, 2010.

PRADO, F. D. *et al.* Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. **Fisheries Research**, v. 125, p. 300-305, 2012.

RAHI, M. L.; SHAH, M. S.. Triploidization in rohu× mrigal hybrid and comparison of growth performance of triploid hybrid. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 12, p. 1867-1879, 2012.

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

SEEB, J. E.; THORGAARD, G. H.; TYNAN, T. Triploid hybrids between chum salmon female× chinook salmon male have early sea-water tolerance. **Aquaculture**, v. 117, n. 1, p. 37-45, 1993.

SILVA, F. S. D. *et al.* Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes)(Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture**, v. 272, p. S110-S114, 2007.

SILVA, M. *et al.* Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. **Environmental biology of fishes**, v. 91, n. 3, p. 361-366, 2011.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. John Wiley & Sons, 2008.

SVÅSAND, T. *et al.* Genetic impact of aquaculture activities on native populations. **European Commission**, 2007.

TAYLOR, J. F. *et al.* Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 315, n. 1, p. 61-68, 2011.

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

THORGAARD, G. H.; JAZWIN, M. E.; STIER, A. R. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 110, n. 4, p. 546-550, 1981.

TIWARY, B. K.; RAY, Arun Kumar. Alterations in air-sac and skeleton of triploid *Heteropneustes fossilis*. **Journal of fish biology**, v. 64, n. 1, p. 268-272, 2004.

TSUDA, J. R. *et al.* Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1929-1935, 2010.

VÊNERE, P. C.; GALETTI JR, P. M. Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). **Revista Brasileira de Genética**, v. 8, n. 4, p. 681-687, 1985

VOZZI, P. A.; SÁNCHEZ, S.; PERMINGEAT, E. D. Inducción de triploidía en *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE). **Boletim Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 87-94, 2003.

WEISS, L. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival of diploid and triploid *Rhamdia quelen* juveniles in different ammonia concentrations. **Aquaculture**, v. 298, n. 1, p. 153-156, 2009.

WEISS, L. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Survival of diploid and triploid *Rhamdia quelen* juveniles under different oxygen concentrations. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 22, n. 1, p. 30-38, 2010.

WILKINS, N. P. *et al.* Fluctuating asymmetry in Atlantic salmon, European trout and their hybrids, including triploids. **Aquaculture**, v. 137, n. 1, p. 77-85, 1995.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. FAO/CODEVASF/CNPQ, 1983.

YOSHIKAWA, H. *et al.* Ploidy manipulation using diploid sperm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: a review. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 410-414, 2008.