



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU (IBB – UNESP)

Departamento de Zoologia

São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

TESE DE DOUTORADO

**Produção de tetraploides e ginogenéticos em
Siluriformes e Characiformes neotropicais**

Rafaela Manchin Bertolini

Botucatu/SP
Fevereiro de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU (IBB – UNESP)
Departamento de Zoologia
São Paulo State University- Institute of Bioscience of Botucatu

TESE DE DOUTORADO

PRODUÇÃO DE TETRAPLOIDES E GINOGENÉTICOS EM
SILURIFORMES E CHARACIFORMES NEOTROPICAIS

Rafaela Manchin Bertolini

Orientador:

Dr. George Shigueki Yasui

Coorientadores:

Dr. José Augusto Senhorini

Dr. Nivaldo Ferreira Do Nascimento

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

Botucatu/SP
Fevereiro de 2023

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

Bertolini, Rafaela Manchin.

Produção de tetraploides e ginogenéticos em
Siluriformes e Characiformes neotropicais / Rafaela
Manchin Bertolini. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: George Shigueki Yasui

Coorientador: Nivaldo Ferreira do Nascimento

Coorientador: José Augusto Senhorini

Capes: 20406002

1. Aquicultura. 2. Biotecnologia. 3. Poliploidia.
4. Bagre (Peixe).

Palavras-chave: Aquicultura; Biotecnologia; Manipulação
cromossômica; Poliploidia.

Agradecimentos

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

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

Ao meu namorado Júlio Veneroso, por todo carinho, amor e compreensão. Obrigada por sempre estar do meu lado apoiando, se preocupando e incentivando.

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

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Peixes: Nivaldo Ferreira do Nascimento, Bruna dos Santos Machado, Dilberto Ribeiro Arashiro, Nycolas Pereira, Paulo Sérgio Monzani, Natália G. Matheus, Gabriella Carvalho, Geovanna Coelho, Jhennifer Gomes, Gabriel Marra, Andreoli Correia Alves, Milena Chaguri, Amanda Pereira Silva, Giselle Pessoa, Hatus Siqueira, Gustavo Shiguemoto, Natália R. de Alcântara Rocha, Talita Lázaro, Letícia Maia, Jeniffer Rosero. Sou muito grata a vocês!

Em especial agradeço a Lucia Suarez Lopez, uma irmã que a pós-graduação me concedeu. Obrigada por transmitir todo seu conhecimento, pela paciência e amizade. Foi um grande prazer dividir essa caminhada com você!

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP, especialmente na pessoa do Dr. José Augusto Senhorini e funcionários, por ter fornecido o material biológico e infraestrutura para a realização deste trabalho.

A CTG Brasil, Projeto nº 155034 pelo o apoio financeiro para execução deste projeto e a bolsa concedida.

Ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP/ Botucatu e a Capes pela bolsa concedida.

Por fim, a todos que estiveram ao meu lado apoiando e sendo amigos.

Obrigada a todos!

Sumário

Lista de figuras	5
Lista de tabelas	7
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Poliploidia e peixes triploides	14
1.2 Produção de peixes tetraploides	16
1.3 Produção de peixes ginogenéticos	17
1.4 Espécies modelo para o estudo	20
1.4.1 <i>Pimelodus maculatus</i>	20
1.4.2 <i>Prochilodus lineatus</i>	21
2 OBJETIVO	23
2.1 Geral:	23
2.2 Específicos:	23
3 ESTRUTURAÇÃO DA TESE	24
CAPÍTULO I: Indução de mandi <i>Pimelodus maculatus</i> tetraploides utilizando choque térmico	33
1 MATERIAL E MÉTODOS	33
1.1 Origem dos parentais, indução hormonal e fertilização in vitro	33
1.2 Tetraploidização através de choque de temperatura	34
1.3 Desenvolvimento e sobrevivência das larvas	34
1.4 Avaliação da ploidia através de Citometria de Fluxo	35
1.5 Confirmação da ploidia através da citogenética	36
1.6 Análise estatística	36
2 RESULTADOS	37
2.1 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência	37
2.2 Análise da ploidia por citometria de fluxo	38
2.3 Confirmação da ploidia através da citogenética	38
3 DISCUSSÃO	41
4 REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO II: Indução de mandi <i>Pimelodus maculatus</i> ginogenéticos	47
1 MATERIAL E MÉTODOS	47

1.1 Origem dos peixes parentais	47
1.2 Indução hormonal, coleta de gametas heterólogos e indução à ginogênese	47
1.3 Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia através de citometria de fluxo	49
1.4 Confirmação da ploidia através da citogenética	50
1.5 Confirmação da ginogênese por genotipagem	51
1.6 Proporção sexual	52
1.7 Análise estatística	53
2. RESULTADOS	53
2.1 Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia	53
2.2 Avaliação da ploidia através de citometria de fluxo	54
2.3 Confirmação da ginogênese por genotipagem	54
2.4 Proporção sexual	55
3 DISCUSSÃO	59
4- REFERÊNCIAS	63
Capítulo III: Indução à tetraploidização do curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	66
1 MATERIAL E MÉTODOS	66
1.1 Origem dos peixes parentais	66
1.2 Seleção dos reprodutores, indução hormonal e fertilização in vitro	67
1.3 Tetraploidização através de choque de temperatura	68
1.4 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência	68
1.5 Avaliação da ploidia através de Citometria de Fluxo e Citogenética	69
1.6 Análise estatística	69
2 RESULTADOS	70
2.1 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência	70
2.2 Análise da ploidia por citometria de fluxo e citogenética	71
3 DISCUSSÃO	77
4 REFERÊNCIAS	81
Capítulo IV: Estocagem de sêmen e indução a ginogênese no curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	84
1 MATERIAL E MÉTODOS	84
1.1 Experimento 1: Avaliação da melhor solução de estocagem de sêmen de curimbatá, <i>Prochilodus lineatus</i>	84
1.1.1 Coleta de sêmen de curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	84
1.1.2 Ajuste da osmolaridade das soluções de estocagem	85

1.1.3 <i>Análise de motilidade e viabilidade do sêmen</i>	86
1.2 <i>Experimento 2: Avaliação de fertilização de oócitos com sêmen diluído em diferentes em soluções.</i>	87
1.3 <i>Experimento 3: Indução a ginogênese</i>	89
1.3.1 <i>Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia através de citometria de fluxo e citogenética</i>	91
1.3.2 <i>Confirmação da ginogênese por genotipagem</i>	92
1.3.3 <i>Amplificação dos loci através do PCR</i>	93
1.4 <i>Análise estatística</i>	95
2 RESULTADOS	95
2.1 <i>Experimento 1: Avaliação da melhor solução de estocagem de sêmen de curimbatá, Prochilodus lineatus</i>	95
2.2 <i>Experimento 2: Fertilização de oócitos com sêmen diluído em diferentes em soluções.</i>	97
2.3 <i>Experimento 3: Indução a ginogênese fertilizando oócitos com sêmen irradiado com luz UV em diferentes dosagens e choque térmico para reconstituição da ploidia.</i>	98
2.3.1 <i>Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia</i>	98
2.3.2 <i>Avaliação da ploidia através de citometria de fluxo e citogenética</i>	99
2.3.3 <i>Confirmação da ginogênese por genotipagem</i>	100
3 DISCUSSÃO	107
4 REFERÊNCIAS	111
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113

Lista de figuras

Capítulo I

Figura 1. Histograma ilustrativo de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodida de *Pimelodus maculatus* do grupo controle diploide (A) e do grupo tetraploide (B). 1: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 2: grupo controle diploide. 3: grupo tetraploide.....42

Figura 2. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Pimelodus maculatus*. A. Controle diploide com 56 cromossomos. B. Descendentes tetraploides com 112 cromossomos. Escala: 10 µm.....43

Capítulo II

Figura 1. Desenho esquemático das etapas de produção de peixes ginogenéticos. Espermatozoides heterólogos de *Astyanax altiparanae* irradiados (A) são utilizados para fertilizar oócitos de fêmeas de *Pimelodus maculatus* (B), seguido pelo choque de temperatura para inibir a liberação do segundo corpúsculo polar (C) e produção de prole ginogenética 2n (D).....51

Figura 2. Visualização macroscópica das gônadas de mandi, *Pimelodus maculatus*, fêmea (A) e macho (B). Escala: 1000 µm.....55

Figura 3. Histograma de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodidas de *Pimelodus maculatus* do grupo haploide (A), do grupo controle diploide (B) e do grupo ginogenéticos (C). 1: grupo haploide. 2: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 3: grupo controle diploide. 4: grupo ginogenéticos diploide.....59

Figura 4. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Pimelodus maculatus*. A. Controle diploide com 56 cromossomos. B. Diploides ginogenéticos com 56 cromossomos. C. Haploides com 28 cromossomos. Escala: 10 µm.....60

Figura 5. Visualização dos produtos amplificados de *Pimelodus maculatus* ginogenéticos induzido por espermatozoide de *Astyanax altiparanae* irradiados com luz UV e choque térmico. M₁: Marcador 50 pb; M_♀: Mandi *P. maculatus* fêmea; M_♂: Mandi *P. maculatus* macho; L_{1♂}: Lambari *A. altiparanae* macho; L_{2♂}: Lambari *A. altiparanae* macho; G1-G7: Descendentes do grupo ginogenético; C1-C7: Descendentes do grupo controle; M₂: Marcador 1Kb. Amostras de descendentes da Repetição 1 (Seção 1.1) utilizando primers *Asty* 26 (160 pb) (Zaganini et al., 2014).....60

Figura 6. Visualização dos produtos amplificados de *Pimelodus maculatus* ginogenéticos induzido por espermatozoide de *Astyanax altiparanae* irradiados com luz UV e choque térmico. M₁: Marcador 50 pb; M_♀: Mandi *P. maculatus* fêmea; M_♂: Mandi *P. maculatus* macho; L_{1♂}: Lambari *A. altiparanae* macho ; L_{2♂}: Lambari *A. altiparanae* macho; G1-G7: Descendentes do grupo ginogenético; C1-C7: Descendentes do grupo controle; M₂: Marcador 1Kb. Amostras de descendentes da Repetição 1 (Seção 1.1) utilizando primers *Mandi 07* (127–182 pb) (Paiva and Kalapothakis 2008).....60

Capítulo III

Figura 1. Histograma ilustrativo de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodida de *Prochilodus lineatus* do grupo controle diploide (A), do grupo tetraploide (B) e mosaicos diploide/tetraploide (C). 1: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 2: grupo controle diploide. 3: grupo tetraploide.....78

Figura 2. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Prochilodus lineatus*. A. Controle diploide com 54 cromossomos. B. Descendentes tetraploides com 108 cromossomos. Escala: 10 µm.....79

Capítulo IV

Figura 1. A) Desenho esquemático das etapas de coleta e estocagem de sêmen de *Prochilodus lineatus* em diferentes soluções. **A1)** Indução hormonal realizada com dose única de hipófise desidratada de carpa (HDC) na concentração de 5 mg kg⁻¹ e coleta de sêmen com auxílio micropipeta de 1000 µL. **A2)** Utilizando uma micropipeta, 5 µL de sêmen foi diluído em 1,995 µL em cada uma das cinco soluções de estocagem (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM). **A3)** As amostras foram armazenadas em incubadoras BOD a 2,5°C durante 48 horas. **A4)** A análise da motilidade e viabilidade espermática das soluções testadas foi realizada a cada 6 horas. **B)** Desenho esquemático das etapas de avaliação da capacidade de fertilização do sêmen de *P. lineatus* diluído em diferentes soluções de estocagem. **B1 e B2)** Indução hormonal, coleta de sêmen e diluição em diferentes soluções conforme descrito nos itens A1 e A2. **B3)** Indução hormonal das fêmeas realizada em duas doses de HDC, na concentração de 0,5 mg kg⁻¹ e 5 mg kg⁻¹, coleta dos oócitos e fertilização dos seis tratamento testados, sendo um controle, fertilizado com sêmen puro e fresco e os outros cinco com sêmen diluídos nas soluções de estocagem. **B4)** As porcentagens de fertilização e sobrevivência dos tratamentos testados foram avaliadas através de estereomicroscópio nas fases de 2 células, blástula, gástrula, somito e eclosão.....91

Figura 2. Desenho esquemático das etapas de produção de peixes ginogenéticos. Espermatozoides de *Prochilodus lineatus* irradiados a 30, 60, 90 e 120 mJ/cm² (A) são utilizados para fertilizar oócitos da mesma espécie (B), seguido pelo choque de temperatura para inibir a liberação do segundo corpúsculo polar (C) e produção de prole ginogenética 2n (D).....92

Figura 3. Avaliação da motilidade (A) e viabilidade (B) espermática de *Prochilodus lineatus* após armazenamento refrigerado. Amostras de 5 µL de sêmen foram diluídas em 1.995 µL de cinco diferentes soluções (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM) e armazenadas a 2,5°C durante 48 horas. Os parâmetros foram medidos a cada 6 horas. As porcentagens resultam de três repetições, cada uma utilizando sêmen de machos diferentes.....102

Figura 4. Avaliação dos parâmetros de VCL (velocidade curvilínea) (A), VMD (velocidade média de trajeto) (B) e VLR (velocidade em linha reta) (C) dos espermatozoides de *Prochilodus lineatus* após armazenamento refrigerado. Amostras de 5 µL de sêmen foram diluídas em 1.995 µL de cinco diferentes soluções (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM) e armazenadas a 2,5°C durante 48 horas. Os parâmetros foram avaliados a cada 6 horas. As porcentagens resultam de três repetições, cada uma utilizando sêmen de machos diferentes.....103

Figura 5. Histograma de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodidas de *Prochilodus lineatus* do grupo haploide (A), do grupo controle diploide (B) e do grupo ginogenéticos (C). 1: grupo haploide. 2: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 3: grupo controle diploide. 4: grupo ginogenéticos diploide.....107

Figura 6. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Prochilodus lineatus*. A. Controle diploide com 54 cromossomos. B. Diploides ginogenéticos com 54 cromossomos. C. Haploides com 27 cromossomos. Escala: 10 µm.....108

Figura 7. Confirmação de ginogênese do *Prochilodus lineatus* por genotipagem. No Grupo controle todas as amostras apresentaram herança materna (A) e sete herança paterna (B). No tratamento de 30 mJ/cm², oito amostras apresentaram somente herança materna (A) e duas apresentaram herança paterna (B). As amostras do tratamento 60 mJ/cm² apresentaram somente herança materna (A). C: controle e G: Ginogenético.....108

Lista de tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Desenvolvimento e sobrevivência do Mandi, *Pimelodus maculatus*, após tratamentos com choque térmico para indução a tetraploidia¹41

Tabela 2. Porcentagens de indivíduos tetraploides de *Pimelodus maculatus* analisados através de citometria de fluxo, resultantes de tratamentos de choque de temperatura 11', 13', 15', 17' e 19' mpf.....42

Capítulo II

Tabela 1. Primers de microssatélite utilizados na amplificação DNA do mandi (*Pimelodus maculatus*) e o lambari (*Astyanax altiparanae*).....54

Tabela 2. Desenvolvimento e sobrevivência de Mandi, *Pimelodus maculatus*, após tratamento com choque térmico para indução da ginogênese¹58

Tabela 3. Proporção sexual de controle diploide e ginogenético diploide de *Pimelodus maculatus*.....61

Capítulo III

Tabela 1. Desenvolvimento e sobrevivência de *Prochilodus lineatus* descendente de reprodutores provenientes do CEPTA/ICMBio (Lote 1), após tratamentos com choque térmico para indução a tetraploidia¹75

Tabela 2. Desenvolvimento e sobrevivência de *Prochilodus lineatus* descendente de reprodutores provenientes do rio Mogi Guaçu (Lote 2), após tratamentos com choque térmico para indução a tetraploidia¹76

Tabela 3. Porcentagens de indivíduos tetraploides de *Prochilodus lineatus* analisados através de citometria de fluxo, resultantes de tratamentos de choque de temperatura a 26', 28', 30', 32', 34', 36' e 38 mpf¹77

Capítulo IV

Tabela 1. Primers de microssatélite utilizados para amplificação DNA do curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>) e posteriormente confirmação da indução a ginogênese na espécie por genotipagem.....	96
Tabela 2. Fluorocromos utilizados para marcação dos primers do curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>) para confirmação de paternidade dos tratamentos de indução à ginogênese.....	96
Tabela 3. Desenvolvimento e sobrevivência de Curimbatá, <i>Prochilodus lineatus</i> , após fertilização com sêmen diluído em diferentes em soluções de estocagem ¹	104
Tabela 4. Desenvolvimento e sobrevivência de Curimbatá, <i>Prochilodus lineatus</i> , após tratamento com choque térmico para indução da ginogênese ¹	105
Tabela 5. Desenvolvimento e sobrevivência de Curimbatá, <i>Prochilodus lineatus</i> , após fertilização com sêmen irradiado com luz UV (254 nm) nas intensidades de 30, 60, 90 e 120 mJ/cm ² ¹	106

RESUMO

A aquicultura é a atividade de produção de alimentos que mais tem se expandido no mundo nas últimas décadas. Atualmente, para atender à crescente demanda, o emprego da biotecnologia aplicada à reprodução é visto como uma das principais opções. O presente estudo teve como objetivo aplicar técnicas de manipulação cromossômica para obtenção de indivíduos tetraploides e ginogenéticos de mandi (*Pimelodus maculatus*) uma espécie da ordem dos Siluriformes e do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) uma espécie da ordem dos Characiformes. Para tetraploidização no mandi (*P. maculatus*), foram aplicados choques de temperatura (38°C por 2 minutos) com 11, 13, 15, 17 e 19 minutos pós-fertilização (mpf) para inibição da clivagem. A análise de citometria de fluxo mostrou que o choque aplicado com 15 mpf garantiu a maior porcentagem de tetraploides (73,3%), sendo os resultados também confirmados citogenética. Porém, após o segundo dia após a eclosão, não houve sobrevivência das larvas tetraploides resultantes. Para indução de ginogenéticos no mandi *P. maculatus*, foi utilizado sêmen de lambari *Astyanax altiparanae* irradiado com luz UV (80 mJ/cm²) para inativação dos espermatozoides e posteriormente, para restaurar o estado diploide foi aplicado choque de temperatura (38°C por 2 minutos, 2 mpf) para evitar a liberação do segundo corpúsculo polar. A análise molecular confirmou que os peixes ginogenéticos apresentam herança exclusivamente materna e apresentam número de cromossomos idêntico ao grupo controle. Em relação à razão sexual, a grande quantidade de fêmeas obtidas sugere que o sistema genético de determinação sexual seja homogamético para fêmeas (XX; XY). Para tetraploidização no curimbatá (*P. lineatus*), foram aplicados choques de temperatura (40°C por 2 minutos) com 26, 28, 30, 32, 34, 36 e 38 mpf para inibição da clivagem. A análise de citometria de fluxo mostrou que o choque aplicado com 28 mpf garantiu a maior porcentagem de tetraploides (72,0%), sendo os resultados também confirmados por citogenética. Para indução de ginogenéticos no curimbatá (*P. lineatus*), foi primeiramente avaliada a melhor solução para imobilização do sêmen da espécie e o potencial de fertilização. Posteriormente, diferentes doses de irradiação UV (30, 60, 90 e 120 mJ/cm²) para inativação dos espermatozoides, sendo verificado que a dose de 60 mJ/cm² foi suficiente para assegurar a ativação dos oócitos e obtenção de larvas 100% haploides. Para restauração da diploidia foi aplicado choque de temperatura (40°C por 2 minutos, 2 mpf) para evitar a liberação do segundo corpúsculo polar. A análise molecular confirmou que os peixes ginogenéticos apresentam herança exclusivamente materna e apresentam número de cromossomos idêntico ao grupo controle. Portanto, o protocolo estabelecido poderá ser aplicado em futuros trabalhos para avaliar a determinação sexual da espécie *P. lineatus*. Por fim, no presente estudo foi possível obter protocolos biotecnológicos promissores para produção de lotes triploides monossexuais em duas espécies (*Pimelodus maculatus* e *Prochilodus lineatus*) pertencentes às maiores ordens de peixes da região Neotropical.

Palavras-chave: Biotecnologia, Aquicultura. Manipulação cromossômica. Poliploidia. *Pimelodus maculatus*. *Prochilodus lineatus*.

ABSTRACT

Aquacultural production has expanded in in last decades. In order to supply the global demand for food, the use of reproductive biotechnologies is necessary to optimize food production. This study aimed to apply chromosomal manipulation to obtain tetraploid and gynogenetic individuals in the spotted catfish (*Pimelodus maculatus*), a catfish species, and the streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) a characin species. For tetraploidization in the spotted catfish different temperature shocks were used (38°C for 2 min) at 11, 13, 15, 17 and 19 minutes post-fertilization (mpf) to inhibit the cleavage. The flow cytometric analysis and cytogenetics showed that heat shock applied at 15 mpf provide the highest percentage of tetraploids (73.3 %). However, after the second day after hatching, there was no survival of the resultant tetraploid larvae. Gynogenetic induction in the same species was conducted by using semen from the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* irradiated with UV light (80 mJ/cm²) to inactivate sperm genome followed by diploidization by heat shock (38°C for 2 minutes, 2 mpf) to retention of the second polar body. Genotyping by microsatellite markers confirmed that that gynogenetic fish presented exclusive maternal inheritance and also showed the same number of chromosomes of the diploid control group. Sex ratio showed increased amount of females, which suggest XX/XY sex determination system. Tetraploidization in the streaked prochilod *P. lineatus*, was achieved using heat shocks (40°C for 2 min) at 26, 28, 30, 32, 34, 36 and 38 mpf to inhibit the cleavage. The flow cytometric analysis and cytogenetics showed that heat shock applied at 28 mpf gave the highest percentage of tetraploids (72.0%), the results also being confirmed by cytogenetics. For gynogenetic induction in streaked prochilod *P. lineatus*, firstly it was evaluated the best solution for semen immobilization and the fertilization ability. Using the best solution, UV-dosage for inactivation of sperm DNA (30, 60, 90 and 120 mJ/cm²) was evaluated and the dosage of 60 mJ/cm² ensure oocyte inactivation and 100% haploid larvae. To restore diploid status, a temperature shock (40° for 2 min, 2 mpf) was used to avoid the extrusion of the 2nd polar body. Genotyping using microsatellite markers confirmed maternal inheritance and also showed the same number of chromosomes of the diploid control group. However, the established protocol can be applied in future works to evaluate the sexual determination of the *P. lineatus* species. Finally, in the present study, it was possible to obtain promising biotechnological procedures for production of monosex triploid individuals in the species (*Pimelodus maculatus* and *Prochilodus lineatus*) belonging to the largest orders of fish in the Neotropical region.

Keywords: Biotechnology. Aquaculture. Chromosomal manipulation. Polyploidy. *Pimelodus maculatus*. *Prochilodus lineatus*.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é a produção de organismos aquáticos em cativeiro, em qualquer um dos seus estágios de desenvolvimento. Esta atividade apresenta-se em franca expansão, como mostram os dados da FAO (2022), onde a produção aquícola cresceu 5,7% e atingiu aproximadamente 88 milhões de toneladas anualmente, correspondendo cerca de 34 milhões para peixes marinhos e 54 milhões para peixes de água doce. No Brasil, esta atividade cresceu 4,7%, com 841.005 mil toneladas anuais (Peixe 2022). No entanto, com a queda de 4,4% da pesca extrativista, paralela ao aumento populacional e do consumo de pescado per capita em nível global (20,2 Kg/ hab/ano) (Garlock, Asche et al. 2020, FAO 2022), o aumento da produção através da aquicultura será uma peça chave para atender tal demanda.

Assim, para atender à crescente demanda, o emprego de biotecnologias na aquicultura é visto como uma das principais opções (Espinosa, Josa et al. 2013). Entre as técnicas empregadas, vale destacar a manipulação cromossômica, principalmente pelo potencial imediato de impactar a produção de peixes (Arai 2001). Em termos de manipulação cromossômica, três principais tecnologias são empregadas em escala comercial: 1) poliploidia, que é a alteração da ploidia normal através da adição de um ou mais conjuntos cromossômicos. 2) ginogênese, que origina progênies com herança unicamente materna e 3) androgênese, que é o oposto da ginogênese, e portanto origina proles com herança exclusivamente paterna (Komen and Thorgaard 2007, Basavaraju 2023, Goswami, Trudeau et al. 2023).

Peixes triploides e ginogenéticos atualmente são facilmente induzidos em muitas espécies aquáticas comercialmente importantes (Arai and Fujimoto 2018). A produção de animais triploides é vantajosa principalmente por possibilitar a esterilização completa e subsequente maior crescimento somático (do Nascimento, de Siqueira-Silva et al.

2017). Além disso, o cultivo de peixes estéreis minimiza os impactos causados pelos escapes frequentes na aquicultura (Piferrer, Beaumont et al. 2009). Vale citar ainda que tais animais estéreis, também podem ser empregados como receptores de células germinativas-tronco, sendo a esterilidade endógena o ponto chave para produzir uma quimera germinativa com capacidade de produzir gametas heterólogos para a reconstituição de espécies em risco de extinção ou de espécies de interesse comercial (Okutsu, Suzuki et al. 2006, Yoshizaki, Ichikawa et al. 2010, Takeuchi, Yatabe et al. 2018).

Além da esterilização, o cultivo monossexual é outra técnica importante para otimizar o desempenho produtivo. Assim como ocorre em outras atividades mais tradicionais, como a avicultura e a bovinocultura, o desempenho de machos e fêmeas em peixes é diferenciado. Portanto, o cultivo exclusivo de um sexo, dependendo da espécie, se torna mais atrativo. Novamente, a manipulação cromossômica se destaca como importante alternativa na obtenção de lotes monossexuais em peixes, através da ginogênese (lotes femininos) e androgênese, técnicas que serão abordadas posteriormente.

Por fim, a fusão dos dois conceitos, ou seja, a esterilização e o cultivo monossexual indicam que o futuro da produção de peixes será o cultivo de fêmeas estéreis ou de machos estéreis. Isso, embora factível e empregado em alguns grupos como os salmonídeos (Myers, Hershberger et al. 1986, Quillet and Gaignon 1990, Johnstone and Stet 1995), apresenta limitações e nem sempre pode ser aplicado para outras espécies. No caso de espécies nativas, são conhecidos somente protocolos de indução a ginogênese (do Nascimento, Monzani et al. 2020a) e tetraploidização (do Nascimento, Pereira-Santos et al. 2020b) para o lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), sendo possível através da fertilização de oócitos de fêmeas tetraploides, a

obtenção de lotes de larvas 100% triploides (Alves, Yasui et al. 2022). Dessa forma, o presente trabalho tem como principal objetivo estabelecer protocolos de tetraploidização e indução a ginogênese em duas espécies neotropicais (*Pimelodus maculatus* e *Prochilodus lineatus*) visando a produção de triploides e lotes monossexuais de ambas as espécies.

1.1 Poliploidia e peixes triploides

Um indivíduo poliploide (poli = múltiplos; ploide = ploidia) apresenta um ou mais conjuntos de cromossomos além do considerado normal para a espécie (Piferrer, Beaumont et al. 2009). Em peixes, de forma geral, o número diploide de cromossomos ($2n$) é normalmente encontrado (Lutz 2008). Assim, para que esse número permaneça constante, ao final do processo da gametogênese formam-se gametas haploides (n), os quais irão reconstituir o número normal de cromossomos ($2n$) após a fertilização.

No entanto, esse processo de constituição da ploidia normal pode ser alterado através da adição de um ou mais conjuntos de cromossomos. Quando esse processo é consolidado, o indivíduo resultante é chamado de poliploide (Piferrer, Beaumont et al. 2009). Portanto, triploides, tetraploides e hexaploides são organismos poliploides com três, quatro e seis conjuntos de cromossomos, respectivamente (Dunham 2004).

Peixes poliploides podem ser encontrados na natureza (Dunham 2004) devido ao processo evolutivo (Borin, Martins-Santos et al. 2002), ou por processos como hibridação (Arias-Rodriguez et al., 2009) e oócitos envelhecidos/tardios (Dos Santos et al., 2018) ou induzidos artificialmente através da manipulação cromossômica (Arai 2001). Peixes triploides ($3n$) são indivíduos cujas células possuem três conjuntos de cromossomos, contendo dois de origem materna e um de origem paterna (Adamov,

Nascimento et al. 2016). Eles são obtidos através da inibição do segundo corpúsculo polar, por meio de choques de temperatura, químico ou de pressão (Piferrer, Beaumont et al. 2009), dando origem a um zigoto $3n$.

Em espécies cultivadas, a técnica de triploidização tem sido a mais empregada, principalmente devido às vantagens em relação aos organismos diploides (Arai 2001, Tiwary, Kirubakaran et al. 2004). A possibilidade de esterilização é uma das vantagens e está relacionada à etapa reducional da meiose durante a gametogênese, pois apresentam conjunto ímpar de cromossomos ($3n$), o que, consequentemente, compromete esse processo (Piferrer, Beaumont et al. 2009). Devido a possível esterilidade, peixes triploides podem apresentar maior crescimento e/ou rendimento de carcaça (do Nascimento, de Siqueira-Silva et al. 2017), já que a energia que seria utilizada para a diferenciação das gônadas é parcialmente empregada no crescimento somático (Arai 2001), sendo portanto uma característica vantajosa para aquicultura.

No entanto, os métodos de indução à triploidização (choque de temperatura, químico ou pressão), nem sempre são 100% efetivos. Em estudos anteriores com a espécie *Pimelodus maculatus*, por exemplo, o choque de temperatura levou a produção de 96% de peixes triploides e 4% diploides (Bertolini, Lopez et al. 2020). Resultados similares foram relatados por Adamov, Nascimento et al. (2016), onde choque de temperatura para indução de triploides no lambari *Astyanax altiparanae* levou a produção de 92% de peixes triploides e 8% diploides. Além disso, de acordo com (Malison, Procarione et al. 1993) os choques de pressão ou de temperatura podem afetar negativamente o crescimento dos organismos triploides. Assim, o pior desempenho destes indivíduos pode não estar diretamente ligado à poliploidia, mas sim ao processo de indução (Malison, Procarione et al. 1993, Fjellidal and Hansen 2010, Opstad, Fjellidal et al. 2013). Portanto, produzir lotes 100% triploides através de um reprodutor

tetraploide pode ser a solução para tais problemas, evitando os efeitos deletérios dos choques supramencionados. Além disso, para a legalização de cultivos de espécies exóticas e organismos geneticamente modificados (GMO), a garantia de organismos 100% triploides estéreis é necessária (Dunham and Su, 2020, Sahoo and Paul, 2023), o que pode ser obtido através de gametas de indivíduos tetraploides.

1.2 Produção de peixes tetraploides

A tetraploidização é uma técnica de manipulação cromossômica que pode ser aplicada na produção em massa de peixes triploides (Nam and Kim 2004), pois ao cruzar um indivíduo tetraploide ($4n$), que pode produzir gametas diploides ($2n$) (Fujimoto, Yasui et al. 2010, Yasui, Fujimoto et al. 2010, Alves, Yasui et al. 2022), com um diploide normal, lotes de peixes 100% triploides ($3n$) podem ser gerados, evitando os efeitos deletérios de choques de temperatura ou pressão.

Para indução à tetraploidização as estratégias utilizadas são similares à triploidização, como o uso de choques de temperatura, químico ou de pressão (Zhang and Onozato 2004, Piferrer, Beaumont et al. 2009). No entanto, os choques são aplicados em diferentes fases do ciclo celular antes da primeira mitose, atuando na desfunção dos centríolos e impedindo a segunda divisão celular (Zhang and Onozato 2004), produzindo assim um zigoto com quatro conjuntos de cromossomos (Zhang and Onozato 2004).

Protocolos para indução de peixes tetraploides são escassos na literatura, quando comparados com triploides (Piferrer, Beaumont et al. 2009). Sucesso na indução de tetraploides foi descrito para algumas espécies, como bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Okomoda, Olufeagba et al. 2021), truta (*Salvelinus fontinalis*) (Weber, Hostuttler et al. 2015) e lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) (do

Nascimento, Pereira-Santos et al. 2020b, Alves, Yasui et al. 2022). Porém, a indução a tetraploidização nem sempre é viável, como é o caso do salmão masu *Oncorhynchus masou* (Sakao, Fujimoto et al. 2006) e tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (de Alvarenga, Fernandes et al. 2020). É comum observar baixa sobrevivência (Sakao, Fujimoto et al. 2006), malformações e sistemas vasculares comprometidos, levando os peixes à morte alguns dias após a eclosão. Alguns trabalhos sugerem que a sobrevivência de tetraploides depende não apenas dos efeitos colaterais do tratamento, mas também da própria condição como tetraploide (Malison, Held et al. 2001, Sakao, Fujimoto et al. 2006).

Portanto, mesmo diante das dificuldades nos protocolos de indução de tetraploides viáveis, essa condição é espécie-específica, portanto não deve ser tratada como inviável para todas as espécies. Vale destacar que além de serem utilizados para a produção de peixes triploides, gametas diploides provenientes de tetraploides são muito úteis para outros estudos de manipulação cromossômica. Por exemplo, fêmeas tetraploides também podem ser utilizadas para indução à ginogênese, pois os oócitos das fêmeas tetraploides podem ser ativados com espermatozóides geneticamente inativados, sem necessidade de aplicação de nenhum choque para a diploidização (Arai and Fujimoto 2018, Li, Lian et al. 2022).

1.3 Produção de peixes ginogenéticos

Ginogênese é o termo que descreve a reprodução uniparental (Komen and Thorgaard 2007) com herança materna. Nesta técnica, os oócitos são ativados por espermatozoides geneticamente inativados (Dunham 2004) empregando-se radiação não-ionizante como ultravioleta (UV), ou radiação ionizante como radiação gama ou X.

A radiação ultravioleta tem sido a mais indicada para esses tratamentos (Chourrout 1984), pois além de ser eficiente na inativação do DNA, em doses corretas, não compromete a motilidade espermática, além de apresentar baixo custo e simplicidade na operação.

Os oócitos ativados com espermatozoides irradiados dão origem a embriões haploides, os quais apresentam várias anormalidades morfofisiológicas (fenômeno conhecido como “síndrome haploide” (Suzuki, Oshiro et al, 1985, PAN et al., 2017) , são inviáveis e morrem durante o desenvolvimento embrionário (antes ou logo após a eclosão) (Arai 2001). Sendo assim, é necessário restaurar o estado diploide para garantir a sobrevivência, o que geralmente é obtido através da retenção do segundo corpúsculo polar (Luckenbach, Godwin et al. 2004, Komal, Munir et al. 2020). A diploidização pode ser conduzida através da aplicação de tratamentos físicos (choques de temperatura ou de pressão) ou químicos, nos ovos fertilizados (Arai 2001, Manan, Hidayati et al. 2020). O choque térmico (frio ou quente) é o tratamento mais comumente utilizado, pois além de ser bastante eficiente, pode tratar grande quantidade de ovos (Felip, Zanuy et al. 2001).

Na aquicultura, os organismos ginogenéticos são interessantes, pois podem ser utilizados para a geração de populações monossexuais (Dunham 2004). Essa técnica também é conhecida por produzir lotes unicamente femininos em diferentes espécies de peixes (Emefe and Sorhue 2014), sendo possível elucidar o mecanismo genético de determinação sexual de uma espécie. Embora este mecanismo seja multifatorial, algumas espécies de peixes apresentam sistemas de determinação sexual genético similares ao de mamíferos e aves, no qual 1) o macho é heterogamético (XY – macho, XX – fêmea) e 2) aquele no qual a fêmea é heterogamética (ZW – fêmea, ZZ – macho) (Whitehead, Benfey et al. 2012). Assim, caso o sexo homogamético determine fêmeas,

os ginogenéticos serão todos XX (fêmeas), como observado para *Gasterosteus aculeatus* (Samonte-Padilla, Eizaguirre et al. 2011), bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (Whitehead, Benfey et al. 2012), *Astyanax altiparanae* (do Nascimento, Monzani et al. 2020a), *Siniperca chuatsi* (Cheng, Yu et al. 2019), *Silurus lanzhouensis* (Li, Lian et al. 2022) e *Salmo coruhensis* (Özdemir and Ekici 2022). Do contrário, se as fêmeas forem o sexo heterogamético (ZW), ambos os sexos serão observados nas proles (ZZ e WW), como observado para *Acipenser baeri* (Fopp-Bayat 2010). Embora essa herança seja simples mendeliana, existem outros mecanismos mais complexos de determinação do sexo, incluindo epistasia (Carrasco et al., 1999), vários pares de cromossomos (Marreta et al., 2012), além dos fatores ambientais e fisiológicos como o estresse (Yamamoto et al., 2019, Fernandino and Hattori, 2019).

Na Ginogênese, caso o espermatozoide utilizado seja da mesma espécie, este é chamado de homólogo (do Nascimento, Monzani et al. 2020a, Özdemir and Ekici 2022). Por outro lado, quando o sêmen é de uma espécie diferente, este é chamado de Heterólogo (Hassanzadeh Saber, Zolgharnein et al. 2020, Li, Lian et al. 2022). O uso de espermatozoides heterólogos possibilita o emprego de sêmen de espécies onde o tempo de inativação esteja estabelecido e que tenha capacidade de fertilizar oócitos de outra espécie. Além disso, outra vantagem é porque os diploides/triploides híbridos produzidos muitas vezes não sobrevivem ou são morfologicamente diferentes dos diploides ginogenéticos (Zheng, Wang et al. 2017, Zhang, Fan et al. 2021), portanto, facilitam a identificação dos ginogenéticos resultantes. Porém, nem sempre é possível utilizar espermatozoides heterólogos, devido à incompatibilidade entre os gametas (fusão espermatozoide/oócito) (Gert, Panser et al. 2022), diâmetros da micrópila, inativação ineficiente, etc. Portanto, trabalhos relacionados à imobilização e estocagem de sêmen a curto ou longo prazo, assim como a inativação de sêmen através de luz

ultravioleta, são indispensáveis para produzir proles 100% ginogenéticas (Yasui, Senhorini et al. 2015, do Nascimento, Monzani et al. 2020^a).

1.4 Espécies modelo para o estudo

1.4.1 *Pimelodus maculatus*

A região Neotropical possui 20% das espécies de peixes descritas atualmente, contemplando mais de 6000 espécies e com estimativas do número total ser acima de 8000, desta forma sendo a região com maior biodiversidade de peixes no mundo (Malabarba and Malabarba 2020).

Entre as maiores ordens de peixes que se distribuem na região Neotropical e o segundo grupo mais ameaçado, com 96 espécies listadas no Brasil (ICMBIO 2018), destacm-se os Siluriformes, constituída basicamente por bagres e cascudos e que conta com mais de 2.400 espécies, distribuídas em 34 famílias e 412 gêneros (Helfman, Collette et al. 2009, Nelson, Grande et al. 2016). A espécie *P. maculatus*, descrita pela primeira vez em 1803 por Lacépède (Reis, Albert et al. 2016), pertence à ordem dos Siluriformes, à família Pimelodidae, que inclui cerca de 50-60 gêneros e 300 espécies (Mees 1974) e ao gênero *Pimelodus*, o mais abundante da família, que apresenta 26 espécies (Ribeiro, Lucena et al. 2008). Esta espécie tem ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo encontrada nas bacias do rio Paraná e São Francisco (Reis, Albert et al. 2016), caracterizada como onívora generalista, com hábitos alimentares diversos, incluindo matéria vegetal, invertebrados e peixes (Lobon-Cervia and Bennemann 2000, Silva, Fugi et al. 2007, Hahn and Fugi 2009), sendo capaz de explorar mais de um nível trófico (Lobon-Cervia and Bennemann 2000, Callisto, Vono

et al. 2002, Silva, Fugi et al. 2007). Esse hábito alimentar oportunista é bastante valorizado na aquicultura pela habilidade em ingerir dietas artificiais inclusive em tanques redes (Ramos 2009), o que facilita a criação em cativeiro. Também possui características vantajosas como fácil reprodução em cativeiro e sob condições laboratoriais, o que possibilita o controle da fertilização artificial, vital para estudos de manipulação cromossômica, como é o caso da indução de peixes poliplóides (Bertolini, Lopez et al. 2020) e ginogenéticos (do Nascimento, Monzani et al. 2020a). Diante dessas características e potencialidades, pode-se considerar o mandi *Pimelodus maculatus* como uma espécie de dupla aptidão, ou seja, uma espécie de laboratório e de aquicultura, servindo, portanto, para as ciências básicas e aplicadas.

1.4.2 *Prochilodus lineatus*

Dentre os peixes que se distribuem na região Neotropical, a ordem Characiformes se destaca como uma das mais ricas em quantidade de espécies, sendo representada atualmente por 23 famílias e mais de mil espécies descritas (Arcila, Ortí et al. 2017). A família Prochilodontidae está inserida na ordem Characiformes e é composta atualmente por três gêneros (Ichthyolephas, Prochilodus e Semaprochilodus) e 21 espécies válidas, amplamente distribuídas pela região Neotropical (Castro and Vari 2004, Fricke 2022). Dentre estas espécies, o *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), popularmente conhecido como curimatá, é um peixe de ampla distribuição nas bacias da América do Sul (Castro and Vari 2004), distribuído na bacia do Prata (Paraná, Paraguai, Uruguai, Rio De La Plata, entre outros). É um peixe migrador de grandes distâncias, capaz de percorrer milhares de quilômetros em época reprodutiva (Godoy 1975). Possui hábito alimentar iliófago, consumindo finas partículas de lodo, com sedimentos, detritos inorgânicos e diatomáceas (Fugi, Hahn et al. 1996). Por ser um

peixe que se alimenta na base da cadeia, exerce função importante no fluxo de energia e ciclagem de nutrientes no ecossistema (Bowen 1983). Apresenta uma única desova por temporada com alta fecundidade, fecundação externa e ausência de cuidado parental ativo (Lowe-McConnell 1999). O curimbatá é uma espécie explorada comercialmente e representa um dos recursos de água doce mais importantes da América do Sul (Ros, Sverlij et al. 1998, Avigliano, Pisonero et al. 2017). Também é uma das preferidas pela pesca artesanal e esportiva (Alho 2008), explorada na Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Estas características fizeram do curimbatá uma importante espécie para diversos estudos (Croux 1992), como criopreservação de sêmen (Di Chiacchio, Almeida et al. 2017), manipulação cromossômica (Yasui, Nakaghi et al. 2020), preparação de embriões para micromanipulação (Coelho, Isaac et al. 2019) e trabalhos pilotos como receptor de células germinativas primordiais (Carvalho, Coelho et al. 2022).

2 OBJETIVO

2.1 Geral:

- Estabelecer protocolos de tetraploidização e ginogênese em *Pimelodus maculatus* e *Prochilodus lineatus*, que poderão facilitar a produção de lotes monossexuais e triploides de ambas às espécies.

2.2 Específicos:

- Obter peixes tetraploides empregando choques de temperatura a fim de inibir a primeira divisão celular;
- Obter lotes ginogenéticos de mandi *Pimelodus maculatus* fertilizando oócitos com sêmen de lambari *Astyanax altiparanae* geneticamente inativado e reconstituindo a ploidia através de choque térmico;
- Avaliar soluções de estocagem para manutenção de sêmen de curimbatá *P. lineatus*, visando sua utilização na produção de animais ginogenéticos.
- Identificar a solução de estocagem que apresenta maior capacidade de fertilização de oócitos de curimbatá *P. lineatus*.
- Obter lotes ginogenéticos de curimbatá *P. lineatus* fertilizando oócitos com sêmen homólogo geneticamente inativado e reconstituindo a ploidia através de choque térmico.
- Identificar o mecanismo de determinação do sexo do *P. maculatus* e *P. lineatus*, analisando a proporção sexual nos ginogenéticos resultantes.

3 ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Tendo em vista os objetivos acima, este trabalho foi dividido em quatro capítulos. No **Capítulo I** foi obtido um protocolo de tetraploidização no mandi *Pimelodus maculatus* utilizando choque de temperatura, sendo observada uma porcentagem de 73,3% de larvas tetraploides resultantes. Os resultados foram confirmados por citometria de fluxo e citogenética, porém a sobrevivência dos descendentes foi observada somente até o segundo dia após a eclosão.

No **capítulo II** foi estabelecido um protocolo de indução a peixes ginogenéticos no mandi *Pimelodus maculatus*. Inicialmente, oócitos foram ativados com espermatozoide de lambari *Astyanax altiparanae* inativados geneticamente e a diploidia restabelecida por meio de choque de temperatura. Os resultados são confirmados por citometria de fluxo e citogenética e análise molecular. Os peixes foram criados até a fase adulta, quando é realizada a análise de proporção sexual.

No **Capítulo III**, foi obtido um protocolo de tetraploidização no curimbatá *Prochilodus lineatus* utilizando choque de temperatura, onde a maior porcentagem de indivíduos tetraploides alcançada foi de 72,0%. Os resultados foram confirmados por citometria de fluxo e citogenética.

No **Capítulo VI**, foi estabelecido um protocolo de indução a peixes ginogenéticos no curimbatá *Prochilodus lineatus*, utilizando gametas homólogos. Inicialmente, foi estabelecida uma solução de imobilização do sêmen para a espécie e a faixa de irradiação ideal para inativação dos espermatozoides que garanta a fertilização. Posteriormente, a diploidização foi consolidada por meio de choque de temperatura e os resultados são confirmados por citometria de fluxo e citogenética e análise molecular.

4 REFERÊNCIAS

- Adamov, N. S. d. M., N. F. d. Nascimento, E. C. S. Maciel, M. Pereira-Santos, J. A. Senhorini, L. L. Calado, M. M. Evangelista, L. S. O. Nakaghi, A. H. M. Guerrero and T. Fujimoto (2016). "Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture." Journal of the World Aquaculture Society.
- Alho, C. J. R. (2008). "Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation." Brazilian Journal of Biology **68**: 957-966.
- Alves, A. C., G. S. Yasui, N. F. do Nascimento, P. S. Monzani, J. A. Senhorini and M. P. Dos Santos (2022). "All-triploid offspring in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei, Characidae) derived from female tetraploid× male diploid crosses." Zygote: 1-6.
- Arai, K. (2001). "Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan." Aquaculture **197**(1-4): 205-228.
- Arai, K. and T. Fujimoto (2018). "Chromosome manipulation techniques and applications to aquaculture." Sex control in Aquaculture: 137-162.
- Arcila, D., G. Ortí, R. Vari, J. W. Armbruster, M. L. Stiassny, K. D. Ko, M. H. Sabaj, J. Lundberg, L. J. Revell and R. Betancur-R (2017). "Genome-wide interrogation advances resolution of recalcitrant groups in the tree of life." Nature Ecology & Evolution **1**(2): 1-10.
- Arias-Rodriguez, L., Yasui, G.S., Arai, K., 2009. Disruption of normal meiosis in artificial inter-population hybrid females of *Misgurnus loach*. *Genetica* 136, 49–56. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9299-x>
- Avigliano, E., J. Pisonero, A. Dománico, S. Sánchez and A. V. Volpedo (2017). "Migration and brackish environment use of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) inferred by Sr: Ca ratio transects of otolith." Neotropical Ichthyology **15**.
- Baiz, M., E. Cabrera and C. Candia (1968). "Alimentación natural del bagre amarillo (*Pimelodus clarias*) de la zona de Punta Lara (Río de La Plata)." FAO CARPAS, Rio Janeiro: 7.
- Basavaraju, Y. (2023). Monosex population in aquaculture. Frontiers in Aquaculture Biotechnology, Elsevier: 89-101.
- Basile, M., H. Godinho, N. Fenerich and J. Branley (1975). "Influencia de factores abióticos sobre a maturacao dos ovarios de *Pimelodus maculatus* Lac. 1803." Bol. Inst. Pesca (Sao Paulo) **4**(1): 1-28.
- Bertolini, R. M., L. S. Lopez, N. F. do Nascimento, D. R. Arashiro, D. H. de Siqueira Silva, S. C. A. dos Santos, J. A. Senhorini and G. S. Yasui (2020). "Strategies for

aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*." Aquaculture International **28**(1): 127-137.

Borin, L. A., I. C. Martins-Santos and C. Oliveira (2002). "A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses." Genetica **115**(3): 253-258.

Bowen, S. H. (1983). "Detritivory in neotropical fish communities." Environmental Biology of Fishes **9**(2): 137-144.

Callisto, M., V. Vono, F. A. Barbosa and S. M. Santeiro (2002). "Chironomidae as a food resource for *Leporinus amblyrhynchus* (Teleostei: Characiformes) and *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Siluriformes) in a Brazilian reservoir." Lundiana **3**(1): 67-73.

Carvalho, G. B., G. C. Z. Coelho, A. C. Alves, A. P. D. S. Silva, P. S. Monzani, J. A. Senhorini, N. C. Vianna and G. S. Yasui (2022). "Embryo manipulation in neotropical characiform fish: incubation system, anaesthetic, and PGC transplantation in *Prochilodus lineatus*." Zygote **30**(6): 773-780.

Carrasco, L.A.P., Penman, D.J., Bromage, N., 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture* 173, 207–218.

Castro, R. and R. P. Vari (2004). "Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study." Smithsonian contributions to Zoology.

Cheng, W., X. Yu, K. Yang, J. Tong, S. Zhu, Q. Wang, R. Xia, B. Li, B. Fu and G. Deng (2019). "Meiotic gynogenesis with heterologous sperm in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* and evidence for female homogamety." Aquaculture Research **50**(11): 3286-3294.

Chourrout, D. (1984). "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 **36**(1-2): 111-126.

Coelho, G. C., S. Y. Isaac, T. M. Mira-López, P. S. Monzani, D. R. Arashiro, T. Fujimoto, J. A. Senhorini and G. S. Yasui (2019). "Preparation of a fish embryo for micromanipulation: staging of development, removal of the chorion and traceability of PGCs in *Prochilodus lineatus*." International Journal of Developmental Biology **63**(1-2): 57-65.

Croux, M. (1992). "Comportamiento y crecimiento de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae) en condiciones controladas." Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral **23**(1-2).

de Alvarenga, É. R., A. F. A. Fernandes, L. R. Lopes, T. E. Soares, G. F. de Oliveira Alves, F. F. B. da Costa, S. C. M. de Sales, G. K. Lima and E. M. Turra (2020). "Attempt to produce a Nile tilapia tetraploid line by heat shock induction." Aquaculture **529**: 735647.

de RESENDE, E. (2000). "Trophic structure of fish assemblages in the lower Miranda river, Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil." Revista brasileira de Biologia **60**(3): 389-403.

Di Chiacchio, I. M., I. L. Almeida, M. C. Leal and A. T. Viveiros (2017). "Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*." Theriogenology **90**: 284-288.

do Nascimento, N. F., D. H. de Siqueira-Silva, M. Pereira-Santos, T. Fujimoto, J. A. Senhorini, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2017). "Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions." Zygote **25**(4): 537-544.

do Nascimento, N. F., P. S. Monzani, M. Pereira-Santos, D. Niedzielski, J. A. Senhorini, L. A. Silva, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2020a). "The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism." Aquaculture **514**: 734432.

do Nascimento, N. F., M. Pereira-Santos, N. Levy-Pereira, P. S. Monzani, D. Niedzielski, T. Fujimoto, J. A. Senhorini, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2020b). "High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in Neotropical characins." Aquaculture **520**: 734938.

Dos Santos, M.P., Do Nascimento, N.F., Yasui, G.S., Pereira, N.L., Fujimoto, T., Senhorini, J.A., Nakaghi, L.S.O., 2018. Short-term storage of the oocytes affects the ploidy status in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Zygote* **26**, 89–98.

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

Dunham, R.A., Su, B., 2020. *Genetically Engineered Fish: Potential Impacts on Aquaculture, Biodiversity, and the Environment*. pp. 241–275

Emefe, O. and U. Sorhue (2014). Gynogenesis: An effective way of controlling fish population and increasing profit in aquaculture, Conference paper/38 th Annual GSN conference/Genetics Public Awareness and

Espinosa, E., A. Josa, L. Gil, C. Malo and O. Mitjana (2013). "Comparing sex steroid levels during the annual cycles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diploid female (XX) and triploid female (XXX) genotypic sex." Reproduction in domestic animals **48**(1): 149-155.

FAO (2022). "The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation." FAO Rome.

Felip, A., S. Zanuy, M. Carrillo and F. Piferrer (2001). "Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species." Genetica **111**(1): 175-195.

- Fjelldal, P. G. and T. Hansen (2010). "Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts." Aquaculture **309**(1-4): 131-136.
- Fopp-Bayat, D. (2010). "Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt)." Aquaculture **305**(1-4): 174-177.
- Fricke, R. (2022). "Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. 2022." Acessado em **16**(03).
- Fugi, R., N. S. Hahn and A. A. Agostinho (1996). "Feeding styles of five species of bottom-feeding fishes of the high Paraná River." Environmental Biology of fishes **46**(3): 297-307.
- Fujimoto, T., G. S. Yasui, M. Hayakawa, S. Sakao, E. Yamaha and K. Arai (2010). "Reproductive capacity of neo-tetraploid loaches produced using diploid spermatozoa from a natural tetraploid male." Aquaculture **308**: S133-S139.
- Garlock, T., F. Asche, J. Anderson, T. Bjørndal, G. Kumar, K. Lorenzen, A. Ropicki, M. D. Smith and R. Tveterås (2020). "A global blue revolution: aquaculture growth across regions, species, and countries." Reviews in Fisheries Science & Aquaculture **28**(1): 107-116.
- Gert, K. R., K. Panser, J. M. Surm, B. Steinmetz, A. Schleiffer, Y. Moran, F. Kondrashov and A. Pauli (2022). "Distinct features in fish Bouncer proteins determine sperm-egg compatibility." bioRxiv: 2022.2009.2001.506233.
- Godoy, M. d. (1975). "Peixes do Brasil: subordem Characoidei. v. I-IV." Editora Franciscana, Piracicaba.
- Godwin Christopher, J., A. Murugesan and N. Sukumaran (2009). "Genetic inactivation of stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*) sperm with UV irradiation." Journal of applied aquaculture **21**(2): 128-137.
- Goswami, M., V. L. Trudeau and W. S. Lakra (2023). Biotechnology in modern aquaculture: Innovations, advancements, and challenges. Frontiers in Aquaculture Biotechnology, Elsevier: 1-13.
- Hahn, N. S. and R. Fugi (2009). "Alimentação de peixes em reservatórios brasileiros: alterações e consequências nos estágios iniciais do repesamento." Oecologia Australis **11**(4): 469-480.
- Hassanzadeh Saber, M., H. Zolgharnein, M. A. Salari Aliabadi, M. A. Yazdani Sadati and M. Yarmohammadi (2020). "Induction of gynogenesis by using inactivated heterologous sperm to produce male Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*)." Aquatics Physiology and Biotechnology **7**(4): 105-136.
- Helfman, G., B. B. Collette, D. E. Facey and B. W. Bowen (2009). The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology, John Wiley & Sons.

ICMBIO, J. (2018). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, ICMBio/MMA Brasília.

Johnstone, R. and R. Stet (1995). "The production of gynogenetic Atlantic salmon, *Salmo salar* L." Theoretical and Applied Genetics **90**(6): 819-826.

Komal, W., S. Munir, Q. Minahal and S. Fatima (2020). "Gynogenesis: Successful method for sex reversal."

Komen, H. and G. H. Thorgaard (2007). "Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review." Aquaculture **269**(1-4): 150-173.

Li, L., Z. Lian, W. Xiao, L. Xing, Y. Liu, Q. Sai, Z. Yu, Y. Tian, Y. Wang and Z. Liu (2022). "Induction of meiotic gynogenesis in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*) with heterologous sperm and evidence for female homogamety." Aquaculture Research.

Lobon-Cervia, J. and S. Bennemann (2000). "Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in Rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil)." Archiv für Hydrobiologie **149**(2): 285-306.

Lowe-McConnell, R. H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais: 534-534.

Luckenbach, J. A., J. Godwin, H. V. Daniels, J. M. Beasley, C. V. Sullivan and R. J. Borski (2004). "Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm." Aquaculture **237**(1-4): 499-516.

Lutz, C. G. (2008). Practical genetics for aquaculture, John Wiley & Sons.
Malabarba, L. R. and M. C. Malabarba (2020). Phylogeny and classification of Neotropical fish. Biology and physiology of freshwater neotropical fish, Elsevier: 1-19.

Malison, J. A., J. A. Held, L. S. Weil, T. B. Kayes and G. H. Thorgaard (2001). "Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock." North American Journal of Aquaculture **63**(1): 17-24.

Malison, J. A., L. S. Procarione, J. A. Held, T. B. Kayes and C. H. Amundson (1993). "The influence of triploidy and heat and hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)." Aquaculture **116**(2-3): 121-133.

Manan, H., A. N. Hidayati, N. A. Lyana, A. Amin-Safwan, H. Ma, N. A. Kasan and M. Ikhwanuddin (2020). "A review of gynogenesis manipulation in aquatic animals." Aquaculture and Fisheries.

Marreta, M.E., Faldoni, F.L.C., Parise-Maltempi, P.P., 2012. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. *Journal of Fish Biology* 80, 630–637.

- Mees, G. F. (1974). The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi), Brill.
- Myers, J. M., W. K. Hershberger and R. N. Iwamoto (1986). "The induction of tetraploidy in salmonids." Journal of the World Aquaculture Society **17**(1-4): 1-7.
- Nam, Y. K. and D. S. Kim (2004). "Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*)." Aquaculture **236**(1-4): 575-582.
- Nelson, J. S., T. C. Grande and M. V. Wilson (2016). Fishes of the World, John Wiley & Sons.
- Okomoda, V., S. Olufeagba, G. Ataguba, S. Solomon, S. Oladimeji, A. Hassan and A. Abol-Munafi (2021). "Tetraploid induction in *Clarias gariepinus* using cold shock protocol." Aquaculture **545**: 737178.
- Okutsu, T., K. Suzuki, Y. Takeuchi, T. Takeuchi and G. Yoshizaki (2006). "Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(8): 2725-2729.
- Opstad, I., P. G. Fjelldal, Ø. Karlsen, A. Thorsen, T. J. Hansen and G. L. Taranger (2013). "The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on survival, growth and deformities during early life stages." Aquaculture **388**: 54-59.
- Özdemir, R. C. and A. Ekici (2022). "Improved induction of meiotic gynogenesis in Coruh trout, *Salmo coruhensis*." Aquaculture Research **53**(12): 4327-4337.
- Pan, Z. J., C. K. Zhu, H. Wang, G. L. Chang, H. Y. Ding, X. G. Qiang and X. S. Yu (2017). "Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety." Aquaculture Research **48**(11): 5659-5665.
- Peixe, B. (2022). "Anuário Peixe BR da Piscicultura." Associação Brasileira de Piscicultura from <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>. Accessed 20.
- Piferrer, F., A. Beaumont, J.-C. Falguière, M. Flajšhans, P. Haffray and L. Colombo (2009). "Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment." Aquaculture **293**(3): 125-156.
- Quillet, E. and J. Gaignon (1990). "Thermal induction of gynogenesis and triploidy in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their potential interest for aquaculture." Aquaculture **89**(3-4): 351-364.
- Ramos, I. P. (2009). "Aspectos da biologia populacional de *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Siluiformes), sob a influência de sistemas de piscicultura em tanques-rede."

- Reis, R., J. Albert, F. Di Dario, M. Mincarone, P. Petry and L. Rocha (2016). "Fish biodiversity and conservation in South America." Journal of Fish Biology **89**(1): 12-47.
- Ribeiro, F. R., C. A. Lucena and P. H. Lucinda (2008). "Three new *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio Tocantins drainage, Brazil." Neotropical Ichthyology **6**(3): 455-464.
- Ros, A. E., S. Sverlij, F. Amestoy and M. Spinetti (1998). "Migration pattern of the sábalo *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) tagged in the lower Uruguay River." Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen **26**(5): 2234-2236.
- Sakao, S., T. Fujimoto, S. Kimura, E. Yamaha and K. Arai (2006). "Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*." Aquaculture **252**(2-4): 147-160.
- Samonte-Padilla, I. E., C. Eizaguirre, J. P. Scharsack, T. L. Lenz and M. Milinski (2011). "Induction of diploid gynogenesis in an evolutionary model organism, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)." BMC developmental biology **11**(1): 55.
- Silva, E. L. d., R. Fugui and N. Segatti Hahn (2007). "Variações temporais e ontogenéticas na dieta de um peixe onívoro em ambiente impactado (reservatório) e em ambiente natural (baía) da bacia do rio Cuiabá." Acta Scientiarum. Biological Sciences **29**(4).
- Sahoo, P.K., Paul, A., 2023. Opportunities and challenges in aquaculture biotechnology, *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*.
- Suzuki, R., Oshiro, T., Nakanishi, T., 1985. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* **48**, 45–55.
- Takeuchi, Y., T. Yatabe, H. Yoshikawa, Y. Ino, N. Kabeya, R. Yazawa and G. Yoshizaki (2018). "Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock." Aquaculture **494**: 45-56.
- Tiway, B. K., R. Kirubakaran and A. K. Ray (2004). "The biology of triploid fish." Reviews in Fish Biology and Fisheries **14**(4): 391-402.
- Weber, G. M., M. A. Hostuttler, K. J. Semmens and B. A. Beers (2015). "Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*)." Canadian journal of fisheries and aquatic sciences **72**(10): 1443-1449.
- Whitehead, J. A., T. J. Benfey and D. J. Martin-Robichaud (2012). "Ovarian development and sex ratio of gynogenetic Atlantic cod (*Gadus morhua*)." Aquaculture **324**: 174-181.

Yamamoto, Y., Hattori, R.S., Patiño, R., Strüssmann, C.A., 2019. Environmental regulation of sex determination in fishes: Insights from Atheriniformes. *Current Topics in Developmental*.

Yasui, G. S., T. Fujimoto and K. Arai (2010). "Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis." *Aquaculture* **308**: S140-S144.

Yasui, G. S., L. S. O. Nakaghi, P. S. Monzani, N. F. d. Nascimento, M. Pereira dos Santos, C. A. G. Goes, F. Porto-Foresti and J. A. Senhorini (2020). "Triploidization in the streaked prochilod *Prochilodus lineatus* inferred by flow cytometry, blood smears and karyological approaches." *Journal of Applied Ichthyology* **36**(3): 336-341.

Yasui, G. S., J. A. Senhorini, E. Shimoda, M. Pereira-Santos, L. S. O. Nakaghi, T. Fujimoto, L. Arias-Rodriguez and L. A. Silva (2015). "Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish." *animal* **9**(3): 464-470.

Yoshizaki, G., M. Ichikawa, M. Hayashi, Y. Iwasaki, M. Miwa, S. Shikina and T. Okutsu (2010). "Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout." *Development* **137**(8): 1227-1230.

Zhang, W., J. Fan, X. Wen, X. Fan, Y. Liang, J. He, Y. Li, S. Chen, M. Chen and G. Wu (2021). "Induction of gynogenesis by heterogenous sperm and cold shock treatment in *Epinephelus fuscoguttatus*." *Reproduction and Breeding* **1**(3): 174-181.

Zhang, X. and H. Onozato (2004). "Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one." *Aquaculture* **240**(1-4): 101-113.

Zheng, G., C. Wang, D. Guo, X. Jiang and S. Zou (2017). "Ploidy level and performance in meiotic gynogenetic offsprings of grass carp using UV-irradiated blunt snout bream sperm." *Aquaculture and Fisheries* **2**(5): 213-219.

CAPÍTULO I: Indução de mandi *Pimelodus maculatus* tetraploides utilizando choque térmico

Neste primeiro capítulo, o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo eficaz de indução à tetraploidização na espécie *Pimelodus maculatus* através de choques térmicos em diferentes tempos para impedir a primeira divisão celular.

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, situado no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), na cidade de Pirassununga/SP, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #10/2015) e SISBIO 55725-1.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Origem dos parentais, indução hormonal e fertilização in vitro

Foram utilizados casais da espécie *Pimelodus maculatus* capturados no Rio Mogi Guaçu no município de Pirassununga-SP (21° 55 '45" S, 47° 22' 21" O). As fêmeas foram selecionadas identificando características como papila urogenital avermelhada e ventre abaulado e juntamente com os machos foram mantidas em caixas circulares de fibra de vidro de 200L, com renovação constante da água na taxa de 5 x por hora, temperatura entre 25°C e 29°C.

Nas fêmeas, a indução hormonal foi feita em duas doses com hipófise desidratada de carpa (HDC), sendo a primeira dosagem de 0,5 mg kg⁻¹ e a segunda, aplicada seis horas depois, de 5 mg kg⁻¹. Nos machos foi aplicada apenas uma dose de 5 mg kg⁻¹, junto a segunda indução das fêmeas (Bertolini, Lopez et al. 2020).

Os gametas foram coletados cerca de 6-8 horas após a indução hormonal. Para isso, as fêmeas foram anestesiadas com Eugenol (200 mg L⁻¹) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) e os oócitos extrusados em recipientes de vidro secos, evitando a hidratação dos mesmos. Devido a morfologia das gônadas, o que impossibilita a coleta dos gametas através de pressão manual na cavidade celomática, os machos foram eutanasiados com Eugenol (400 mg L⁻¹) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) para excisão das gônadas, as quais foram maceradas em solução de MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma-Aldrich #SLB 5132, St. Louis, USA) para imobilização dos espermatozoides. Para a fertilização, o sêmen diluído em solução de MEM foi adicionado à massa de ovos e os gametas ativados pela adição de água.

1.2 Tetraploidização através de choque de temperatura

Para cada repetição (n = 3), a massa de ovos fertilizados foi dividida em seis incubadoras flutuantes (recipientes plásticos com fundo de malha de nylon de 100 µm) com temperatura controlada a 26°C, sendo uma incubadora para cada tratamento experimental. O grupo controle diploide permaneceu na temperatura de 26°C durante todo o desenvolvimento embrionário e os outros cinco grupos foram submetidos ao choque térmico de 38°C em diferentes minutos pós-fertilização (mpf). Os choques foram iniciados com 11, 13, 15, 17 e 19 mpf com duração de 2 minutos e posteriormente incubados a 26°C até a eclosão. A temperatura de 38°C utilizada no procedimento foi baseada no trabalho desenvolvido por Bertolini, Lopez et al. (2020).

1.3 Desenvolvimento e sobrevivência das larvas

Foram calculadas as porcentagens de sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário até a eclosão e de larvas normais e anormais resultantes de todos os

tratamentos experimentais. Para isso, de cada tratamento, uma pequena alíquota de embriões foi coletada e mantida em placas de Petri de diâmetro de 100 mm dentro de uma incubadora do tipo B.O.D. com temperatura ajustada para 26°C até a eclosão. Os tratamentos foram monitorados através de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão) nos estágios de 2-células, blástula, gástrula, somito, e eclosão. Os embriões mortos foram retirados a cada estágio para não prejudicar a qualidade da água e após a eclosão foram contabilizados os números de larvas normais e anormais resultantes de cada tratamento. Imagens digitais foram obtidas utilizando uma câmera CCD (Ds-F1, Nikon, Tóquio, Japão) acoplada ao estereomicroscópio e capturadas através do software (Nis-Ar Elements, Nikon, Tokyo, Japão).

1.4 Avaliação da ploidia através de Citometria de Fluxo

A análise de citometria de fluxo para a confirmação da ploidia foi realizada em larvas recém-eclodidas, para avaliar o melhor tratamento para tetraploidização de *P. maculatus*. Um total de três repetições foram avaliadas. Vinte larvas foram coletadas aleatoriamente de cada tratamento e analisadas de acordo com o protocolo desenvolvido por Xavier, Senhorini et al. (2017). As amostras foram colocadas separadamente em microtubos de 1.5 ml (Corning axygen, #010921V2, Brasil) contendo 120 µL solução para enucleação (9,53 mM MgSO₄.7 H₂O; 47,67 mM KCl; 15 mM Tris; 74 mM de Sacarose e 0,6% de Triton X-100) e posteriormente, para coloração dos núcleos, foi adicionado 800 µL de solução de 0,01% de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride (DAPI). As amostras foram filtradas em telas de nylon de 30 µm e o conteúdo de DNA foi então medido em citômetro de fluxo (CyFlow Ploidy Analyzer, Partec, GmbH, Alemanha). A ploidia de todas as amostras foi confirmada por

comparação com um controle haploide (espermatozoides de machos diploides da espécie *Astyanax altiparanae*).

1.5 Confirmação da ploidia através da citogenética

A citogenética foi realizada em embriões seguindo o protocolo descrito por (Sato, Jorge et al. 2020). Inicialmente, foram feitos *pools* contendo três embriões de *P. maculatus* de cada um dos três tratamentos que apresentaram maiores porcentagens de descendentes tetraploides e incubados em solução de colchicina 0,007% durante 4 horas. Posteriormente, as amostras foram dissociadas em placas de Petri, contendo 7 ml de solução hipotônica de KCl (0,075 M). O material foi transferido para tubos de centrífuga e em estufa a 37°C por 21 min e submetido ao processamento de rotina em citogenética através da coloração com Giemsa (5%) (Foresti, Oliveira et al. 1993). As lâminas foram visualizadas em microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japan) por meio do software Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão), sendo as imagens geradas utilizadas para contagem dos cromossomos.

1.6 Análise estatística

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

2 RESULTADOS

2.1 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência

Os dados de desenvolvimento embrionário dos tratamentos submetidos a choques de temperatura para tetraploidização de *P. maculatus* estão descritos na Tabela 1. Não foram observadas diferenças na sobrevivência dos tratamentos nas fases de fertilização ($P = 0,9888$), 2 células ($P = 0,9884$) e blástula ($P = 0,9655$). No estágio de gástrula foi observada diferença significativa, onde os tratamentos 17' e 19' apresentaram queda nas taxas de sobrevivência ($47,7 \pm 11,4\%$ e $25,5 \pm 7,0\%$) quando comparados com os demais grupos (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados nas fases de somito e eclosão, com porcentagens de sobrevivência menores para os tratamentos 17' ($14,2 \pm 9,4\%$ e $10,6 \pm 9,5\%$) e 19' mpf ($12,4 \pm 4,3\%$ e $11,0 \pm 4,8\%$) respectivamente. Após a eclosão também foi observada diferença significativa, onde o grupo controle e os tratamentos de 11', 13' e 19' mpf apresentaram maiores porcentagens de larvas normais ($92,8 \pm 5,7\%$; $95,9 \pm 2,7\%$; $83,4 \pm 2,5\%$; $78,2 \pm 12,9\%$), e menor sobrevivência de larvas normais nos tratamentos 15' e 17' mpf ($63,2 \pm 12,7\%$ e $33,3 \pm 0,0\%$). Em todos os tratamentos foram observadas porcentagens de larvas anormais, inclusive no tratamento controle, porém sem diferença significativa (Tabela 1).

2.2 Análise da ploidia por citometria de fluxo

Para análise de citometria de fluxo, o conteúdo médio de DNA dos grupos controle diploide e dos grupos tratados com choque de temperatura, foram comparados com o do sêmen de *A. altiparanae* (utilizado como controle haploide). Na Figura 1, é ilustrado um histograma de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodida de *P. maculatus* do grupo controle diploide (Figura 1A) e do grupo tetraploide (Figura 1B).

A análise da ploidia através da citometria de fluxo mostrou que dos cinco grupos tratados com choque de temperatura, quatro (13', 15', 17' e 19' mpf) apresentaram descendentes tetraploides (Tabela 2). Os menores percentuais de indivíduos tetraploides foram observados nos tratamentos 13' (41,6%), 17' (31,6%) e 19' (3,3%) mpf. O tratamento que proporcionou a maior porcentagem de tetraploides foi o de 15' mpf (73,3%).

2.3 Confirmação da ploidia através da citogenética

Os resultados da citogenética mostraram que peixes diploides (Figura 2A) apresentaram 56 cromossomos metafásicos. Por outro lado, no grupo submetido a choque de temperatura, foram observados 112 cromossomos, confirmando que os mesmos são tetraploides (Figura 2B).

Tabela 1. Desenvolvimento e sobrevivência do Mandi, *Pimelodus maculatus*, após tratamentos com choque térmico para indução a tetraploidia¹.

Tratamentos (mpf)	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle	3,1 ± 2,7 ^a	96,8 ± 2,8 ^a	96,2 ± 3,4 ^a	95,3 ± 2,9 ^a	88,6 ± 4,5 ^{ab}	76,1 ± 14,0 ^a	92,8 ± 5,7 ^a	7,2 ± 5,7 ^a	344
11'	2,6 ± 1,8 ^a	97,4 ± 1,8 ^a	97,1 ± 2,1 ^a	95,4 ± 1,3 ^a	92,2 ± 2,3 ^a	88,3 ± 7,5 ^a	95,9 ± 2,7 ^a	4,1 ± 4,6 ^a	336
13'	3,0 ± 1,3 ^a	97,0 ± 1,3 ^a	97,0 ± 1,3 ^a	94,3 ± 0,8 ^a	85,3 ± 4,6 ^{ab}	80,3 ± 3,2 ^a	83,4 ± 2,5 ^a	16,6 ± 2,5 ^a	349
15'	4,3 ± 2,2 ^a	95,6 ± 2,2 ^a	95,6 ± 2,2 ^a	87,7 ± 4,3 ^a	64,7 ± 6,5 ^b	55,9 ± 3,4 ^a	63,2 ± 12,7 ^{ab}	36,8 ± 12,7 ^a	342
17'	4,7 ± 4,3 ^a	95,3 ± 4,3 ^a	93,8 ± 4,2 ^a	47,7 ± 11,4 ^b	14,2 ± 9,4 ^c	10,6 ± 9,5 ^b	33,3 ± 0,0 ^b	66,7 ± 0,0 ^a	356
19'	3,1 ± 2,3 ^a	96,9 ± 2,3 ^a	95,8 ± 3,0 ^a	25,5 ± 7,0 ^b	12,4 ± 4,3 ^c	11,0 ± 4,8 ^b	78,2 ± 12,9 ^a	27,2 ± 12,9 ^a	367
<i>P - VALOR</i>	<i>0,9888</i>	<i>0,9884</i>	<i>0,9655</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0000</i>	<i>0,0009</i>	<i>0,1836</i>	

¹Ovócitos recém-fertilizados submetidos a choques térmicos 11, 13, 15, 17 e 19 mpf a 38° por 2 min. Após o tratamento, os ovos foram incubados a 26°C. O grupo de controle indica ovos intactos mantidos a 26°C (sem tratamento). As porcentagens e o número de ovos resultam de três repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$). mpf: minutos pós-fertilização.

Tabela 2. Porcentagens de indivíduos tetraploides de *Pimelodus maculatus* analisados através de citometria de fluxo, resultantes de tratamentos de choque de temperatura 11', 13', 15', 17' e 19' mpf¹.

Tratamentos	Ploidia		tetraploides (%)
	2n	4n	
Controle	60	0	0,0%
11'	51	9	15,0%
13'	35	25	41,6%
15'	16	44	73,3%
17'	21	19	31,6%
19'	58	2	3,3%

¹Análise realizada em larvas recém-eclodidas dos tratamentos testados. O grupo de controle indica ovos intactos mantidos a 26°C (sem tratamento). As porcentagens resultam de três repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. mpf: minutos pós-fertilização.

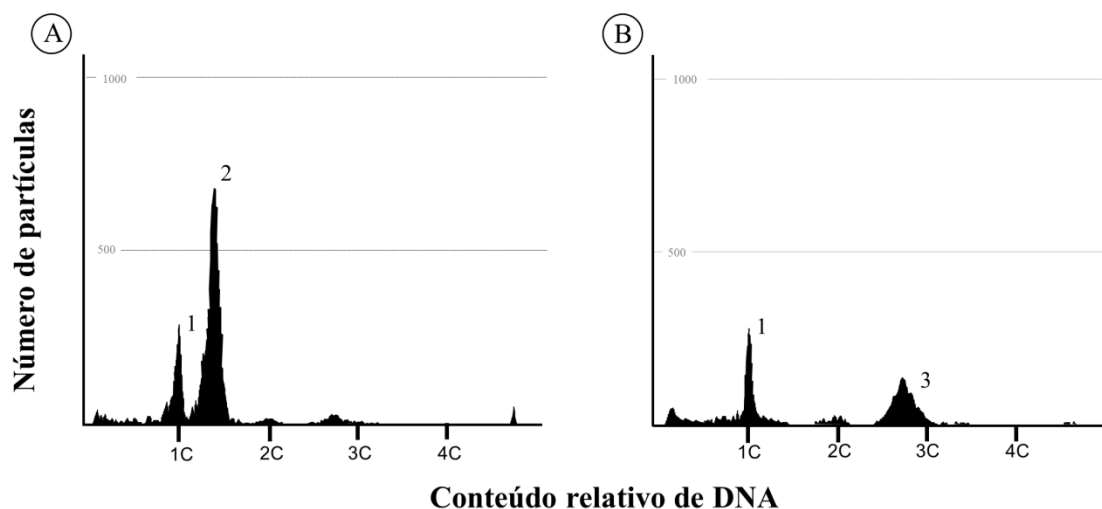


Figura 1. Histograma ilustrativo de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodida de *Pimelodus maculatus* do grupo controle diploide (A) e do grupo tetraploide (B). 1: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 2: grupo controle diploide. 3: grupo tetraploide.

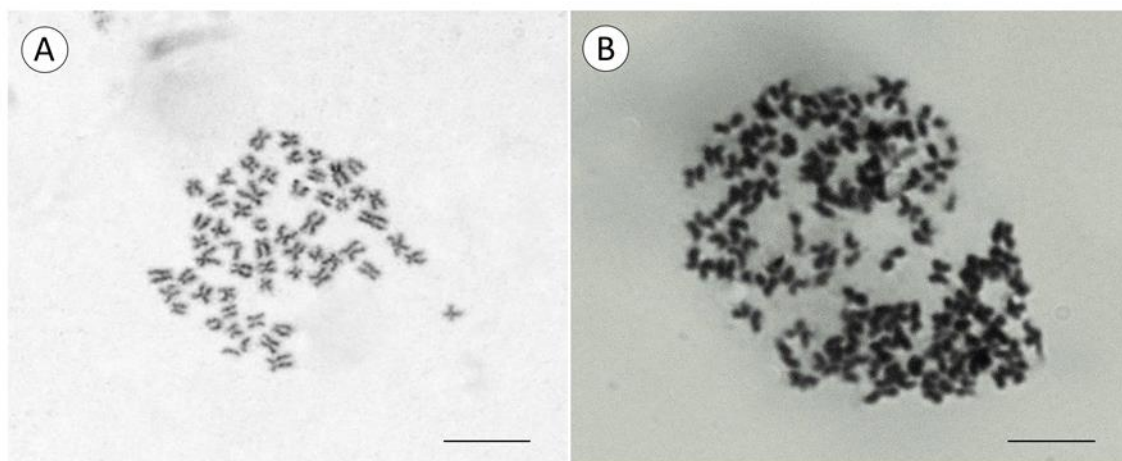


Figura 2. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Pimelodus maculatus*. A. Controle diploide com 56 cromossomos. B. Descendentes tetraploides com 112 cromossomos. Escala: 10 µm.

3 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi desenvolvido um protocolo para produção de indivíduos tetraplóides de *P. maculatus* utilizando choque de temperatura impedindo a segunda divisão celular. Este resultado é muito interessante para aquicultura, já que peixes tetraploides podem ser utilizados como fonte de gametas diploides (Piferrer, Beaumont et al. 2009) para a produção em massa de triploides estéreis ou ginogênese (Liu, Zhang et al. 2022), sem os efeitos prejudiciais do choque térmico, o qual reduz a sobrevivência (Lebeda and Flajshans 2015, García, Yasui et al. 2017, Carman, Hartami et al. 2022). Estudo prévio mostrou que fêmeas triploides da espécie *P. maculatus* são estéreis e apresentam maior rendimento de carcaça (Bertolini et al, *no prelo*), fato que confirma a importância de se obter tetraploides para produção em massa de triploides nesta espécie.

O trabalho realizado por Arashiro, Yasui et al. (2018) sobre desenvolvimento embrionário de *P. maculatus* mostraram que a primeira clivagem ocorre 30 min após a fertilização (a 26°C). Sendo assim, o tempo para início do choque térmico foi padronizado com base na unidade tau (t_0) que é a duração em minutos de um ciclo

mitótico durante a clivagem embrionária síncrona (Shelton, Mims et al. 1997, Gomelsky 2003). Portanto, os choques de temperatura foram calculados próximos a pró-metáfase da primeira clivagem, relatado como momento ideal para indução de tetraploides (Sakao, Fujimoto et al. 2006, Fujimoto, Sakao et al. 2013). Ademais, a temperatura do choque térmico utilizada foi a mesma descrita por (Bertolini, Lopez et al. 2020) para triploidização de *P. maculatus* (38 °C por 2 min), tal procedimento resultou no percentual de 96,7% descendentes triploides. A combinação de informações deram suporte para o desenvolvimento da metodologia e subseqüentes resultados do presente estudo.

A maior porcentagem de indivíduos tetraploides alcançada foi de 73,3% com tempo de choque de 15 mpf. No entanto, foi observada sobrevivência das larvas até no máximo dois dias após a eclosão. A baixa sobrevivência de indivíduos tetraploides é comumente relatada em outras espécies (Sakao, Fujimoto et al. 2006) e pode estar relacionada ao mosaicismo, aneuploidia, desenvolvimento assincrônico ou alta homozigose (Zhang and Onozato 2004, Fujimoto, Sakao et al. 2013). Similar ao observado neste trabalho, outros estudos também relataram que, apesar da eclosão de larvas tetraploides, estas não apresentaram potencial de sobrevivência e morreram logo após a eclosão, primeira alimentação ou ainda antes de atingirem a maturação sexual, *Stizostedion vitreum* (Malison, Held et al. 2001), *Oncorhynchus masou* (Sakao, Fujimoto et al. 2003, Sakao, Fujimoto et al. 2006), *Heteropneustes fossilis* (Haniffa, Sridhar et al. 2004), *Rhodeus uyekii* (Gil, Kong et al. 2016), *Scophthalmus maximus* (Meng, Liu et al. 2021). De acordo com (Sakao, Fujimoto et al. 2006) esses resultados sugerem que a mortalidade de embriões tetraploides não é um efeito colateral do choque aplicado, mas resultado da própria elevação do status de ploidia, de diploidia para tetraploidia.

Outros estudos apontam possíveis efeitos deletérios no metabolismo celular resultante da elevação da ploidia, como redução da área de superfície (Pandian and Koteeswaran 1998). O aumento do conteúdo de DNA celular resultante da poliploidização leva ao concomitante crescimento do tamanho nuclear e celular, mas redução do número de células em alguns órgãos, o que pode limitar inclusive o sistema imunológico. No caso da triploidia, essas alterações afetam características biológicas e fisiológicas causando efeitos como deterioração do crescimento (Benfey and Sutterlin 1984, Solar, Donaldson et al. 1984), reduções do número de células em cada órgão (Swarup 1959), número de eritrócitos (Sezaki, Watabe et al. 1983), concentração de células sanguíneas circulantes (Sadler, Wells et al. 2000), a quantidade total de hemoglobina no sangue (Benfey and Sutterlin 1984, Graham, Fletcher et al. 1985), capacidade de transporte de oxigênio (Graham, Fletcher et al. 1985, Sadler, Wells et al. 2000) e metabolismo celular (Virtanen, Forsman et al. 1990). Em relação aos tetraploides tem sido relatada alta anormalidade nas larvas, morfologia anormal, incluindo flexão do corpo, edema, sistema vascular deficiente e outras condições que certamente deram origem a distúrbios fisiológicos letais (Sakao, Fujimoto et al. 2003, Sakao, Fujimoto et al. 2006).

Em Salmonídeos, assim como em outras espécies como *Scophthalmus maximus*, demonstram ter baixa tolerância a alteração da ploidia (diploidia para tetraploidia) e a sobrevivência dos descendentes mostraram não depender apenas dos efeitos colaterais da indução a tetraploidia (Sakao, Fujimoto et al. 2006, Meng et al., 2021). Variáveis, como qualidade dos gametas também podem dificultar a indução a tetraploidização podendo ser decisivas para obter um protocolo efetivo (Hershberger and Hostuttler 2007; Piferrer et al. 2009).

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a tetraploidia pode ser induzida, porém não origina indivíduos adultos e reprodutores viáveis, sendo tal procedimento, até o momento, letal na espécie *P. maculatus*. Desse modo, futuros estudos são necessários para esclarecer a causa desta mortalidade e buscar possíveis soluções para produção de tetraploides em *P. maculatus*.

4 REFERÊNCIAS

- Arashiro, D. R., G. S. Yasui, L. L. Calado, N. F. do Nascimento, M. P. Dos Santos, S. C. A. do Santos, N. Levy-Pereira, P. S. Monzani, D. H. Siqueira-Silva and J. A. Senhorini (2018). "Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation." *Zygote* **26**(2): 135-148.
- Benfey, T. and A. Sutterlin (1984). "The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo solar* L." *Journal of Fish Biology* **24**(3): 333-338.
- Bertolini, R. M., L. S. Lopez, N. F. do Nascimento, D. R. Arashiro, D. H. de Siqueira Silva, S. C. A. dos Santos, J. A. Senhorini and G. S. Yasui (2020). "Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*." *Aquaculture International* **28**(1): 127-137.
- Carman, O., P. Hartami, Y. Ibrahim, H. Nasrullah, D. T. Soelistyowati and M. Zairin Jr (2022). "Reproduction, growth, fillet proportion and proximate analysis of tetraploid X diploid derived striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) triploid." *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* **15**(2): 744-757.
- Foresti, F., C. Oliveira and L. F. de Almeida-Toledo (1993). "A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine." *Experientia* **49**(9): 810-813.
- Fujimoto, T., S. Sakao, K. Oshima, E. Yamaha and K. Arai (2013). "Heat-shock-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic in pond loach, *Misgurnus anguillicaudatus*." *Aquaculture international* **21**(4): 769-781.
- García, S., G. S. Yasui, J. J. Bernardes-Júnior, B. Corrêa da Silva, H. Amaral-Júnior and E. Zaniboni-Filho (2017). "Induction of triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) by double-temperature shock." *Latin american journal of aquatic research* **45**(1): 209-212.

- Gil, H. W., H. J. Kong, C. M. An, B.-S. Kim, S.-G. Lim and I.-S. Park (2016). "Cytogenetic study of diploid and induced tetraploid in Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii*." SpringerPlus **5**(1): 1-10.
- Gomelsky, B. (2003). "Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review." Aquatic Living Resources **16**(5): 408-415.
- Graham, M. S., G. L. Fletcher and T. J. Benfey (1985). "Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon." Aquaculture **50**(1-2): 133-139.
- Haniffa, M. A., S. Sridhar and M. Nagarajan (2004). "Induction of triploidy and tetraploidy in stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using heat shock." Aquaculture research **35**(10): 937-942.
- Hershberger, W. K. and M. A. Hostuttler (2007). "Protocols for more effective induction of tetraploid rainbow trout." North American Journal of Aquaculture **69**(4): 367-372.
- Lebeda, I. and M. Flajshans (2015). "Production of tetraploid sturgeons." Journal of animal science **93**(8): 3759-3764.
- Liu, S., C. Zhang, Y. Zhou, S. Wang, Z. Mao, D. Gong, L. Han and X. Gao (2022). The Gynogenesis and Androgenesis of the Diploid Gametes Derived from the Allotetraploid Fish. Fish Distant Hybridization, Springer: 103-143.
- Malison, J. A., J. A. Held, L. S. Weil, T. B. Kayes and G. H. Thorgaard (2001). "Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock." North American Journal of Aquaculture **63**(1): 17-24.
- Meng, Z., X. Liu, Y. Jia, B. Liu, Z. Yang and H. Zhang (2021). "Optimization of hydrostatic pressure, timing, and duration parameters for the induction of tetraploidy in turbot, *Scophthalmus maximus*." Aquaculture International **29**(6): 2575-2589.
- Pandian, T. a. and R. Koteeswaran (1998). "Ploidy induction and sex control in fish." Hydrobiologia **384**(1): 167-243.
- Piferrer, F., A. Beaumont, J.-C. Falguière, M. Flajšhans, P. Haffray and L. Colombo (2009). "Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment." Aquaculture **293**(3): 125-156.
- Sadler, J., R. M. Wells, P. M. Pankhurst and N. W. Pankhurst (2000). "Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*." Aquaculture **184**(3-4): 349-361.
- Sakao, S., T. Fujimoto, S. Kimura, E. Yamaha and K. Arai (2006). "Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*." Aquaculture **252**(2-4): 147-160.

Sakao, S., T. Fujimoto, M. Tanaka, E. Yamaha and K. Arai (2003). "Aberrant and arrested embryos from masu salmon eggs treated for tetraploidization by inhibition of the first cleavage." Nippon Suisan Gakkaishi **69**(5): 738-748.

Sato, L., P. Jorge, V. Mastrochirico-Filho, M. Hata, S. Batlouni, R. Kuradomi, F. Porto-Foresti, F. Foresti and D. Hashimoto (2020). "Triploidy in tambaqui *Colossoma macropomum* identified by chromosomes of fish larvae." Journal of Aquaculture & Marine Biology **9**(3): 65-69.

Sezaki, K., S. Watabe and K. Hashimoto (1983). A comparison of chemical composition between diploids and triploids of ginbuna *Carassius auratus langsdorfi*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan).

Shelton, W. L., S. D. Mims, J. A. Clark, A. E. Hiott and C. Wang (1997). "A temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in paddlefish and shovelnose sturgeon." The Progressive Fish-Culturist **59**(3): 229-234.

Solar, I. I., E. M. Donaldson and G. A. Hunter (1984). "Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth." Aquaculture **42**(1): 57-67.

Swarup, H. (1959). "Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L)." Journal of Genetics **56**(2): 143-155.

Virtanen, E., L. Forsman and A. Sundby (1990). "Triploidy decreases the aerobic swimming capacity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology **96**(1): 117-121.

Xavier, P. L. P., J. A. Senhorini, M. Pereira-Santos, T. Fujimoto, E. Shimoda, L. A. Silva, S. A. Dos Santos and G. S. Yasui (2017). "A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*." Front Genet **8**: 131.

Zhang, X. and H. Onozato (2004). "Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one." Aquaculture **240**(1-4): 101-113.

CAPÍTULO II: Indução de mandi *Pimelodus maculatus* ginogenéticos

O segundo capítulo teve como objeto elaborar um protocolo eficaz de indução à ginogênese na espécie *Pimelodus maculatus* utilizando gametas heterólogos.

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, situado no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), na cidade de Pirassununga/SP, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #10/2015) e SISBIO 55725-1.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Origem dos peixes parentais

Foram utilizados quatro casais da espécie *P. maculatus* (mandi) capturados no Rio Mogi Guaçu na cidade de Pirassununga-SP (21°55'45" S, 47°22'21" O) e machos da espécie *A. altiparanae* (lambari do rabo amarelo) provenientes do plantel existente no CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brasil (21°55'58" S, 47°22'31" O), mantidos em viveiros de 350 m².

1.2 Indução hormonal, coleta de gametas heterólogos e indução à ginogênese

Para indução à ginogênese na espécie *P. maculatus*, foram utilizados gametas heterólogos, oócitos de Mandi *P. maculatus* e espermatozoides geneticamente inativados de lambari do rabo amarelo *Astyanax altiparanae*. A captura, manejo, indução hormonal dos reprodutores e coleta de gametas de *P. maculatus* foram realizadas conforme descrito no item 1.1 do Capítulo I. O sêmen de *Astyanax*

altiparanae foi obtido de acordo com o protocolo desenvolvido por Yasui, Senhorini et al. (2015). Para isso, os machos foram induzidos hormonalmente com dose única de hipófise desidratada de carpa (HDC) na concentração de 3 mg kg^{-1} . Dez horas depois, os peixes foram anestesiados com Eugenol (200 mg L^{-1}) (Biodinâmica, Ibioporã, Brasil) e o sêmen coletado com auxílio de pipeta de $1000 \text{ }\mu\text{L}$ (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e imediatamente transferido para um tubo de $1,5 \text{ mL}$ contendo $400 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de Ringer (128.3 mM NaCl , 23.6 mM KCl , 3.6 mM CaCl_2 , 2.1 mM MgCl_2) a fim de imobilizar os espermatozoides. A motilidade espermática foi avaliada de acordo com protocolos anteriores (Yasui, Senhorini et al. 2015) e as amostras com motilidade superior a 80% foram mantidas a $2,5 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior irradiação. Para irradiação, foi utilizado um *pool* de sêmen coletado de dois machos e geneticamente inativados em luz UV (254 nm) a 80 mJ/cm^2 (do Nascimento, Monzani et al. 2020a) (Figura 1A). Os tratamentos realizados foram: 1) Oócitos de *P. maculatus* fertilizados com sêmen da mesma espécie (controle diploide); 2) Oócitos de *P. maculatus* fertilizados com sêmen de lambari *A. altiparanae* inativado (grupo haploide); 3) Oócitos de *P. maculatus* e sêmen de lambari inativado e submetido a choque de temperatura (2 min após fertilização, durante 2 min, 38°C) (Figura 1C), dando origem a uma prole de ginogenéticos diploides (Figura 1D). Os procedimentos acima foram realizados separadamente utilizando gametas de reprodutores diferentes, o que resultou em quatro repetições.

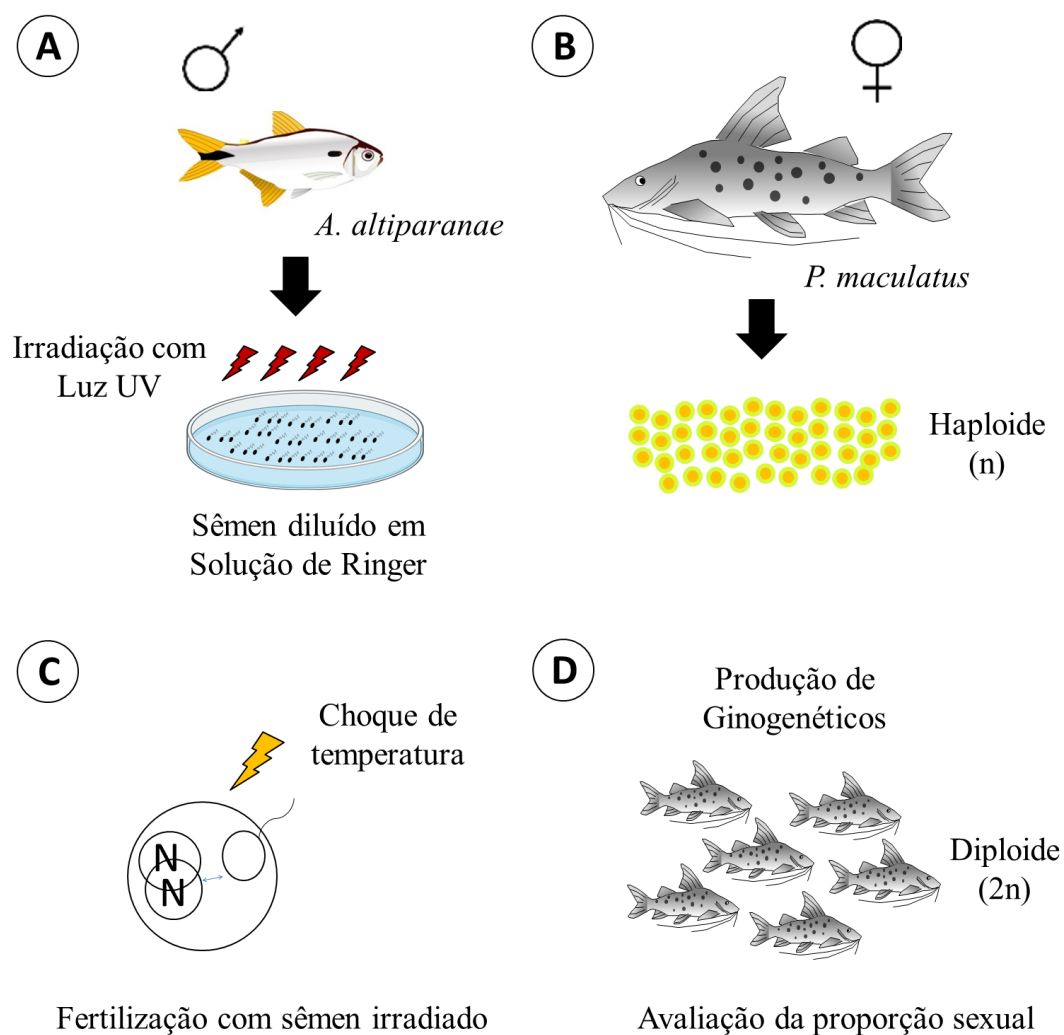


Figura 1. Desenho esquemático das etapas de produção de peixes ginogenéticos. Espermatozoides heterólogos de *Astyanax altiparanae* irradiados (A) são utilizados para fertilizar oócitos de fêmeas de *Pimelodus maculatus* (B), seguido pelo choque de temperatura para inibir a liberação do segundo corpúsculo polar (C) e produção de prole ginogenética 2n (D).

1.3 Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia através de citometria de fluxo

Para o cálculo das porcentagens de sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário até a eclosão e de larvas normais e anormais resultantes de todos os tratamentos experimentais, os procedimentos foram os mesmos descritos no item 1.3 do Capítulo I.

A verificação da ploidia foi realizada através de citometria de fluxo seguindo o protocolo publicado por Xavier, Senhorini et al. (2017) conforme descrito no item 1.4 do Capítulo I.

1.4 Confirmação da ploidia através da citogenética

Juvenis dos grupos controle e ginogonético diploide foram injetados com fermento biológico, e posteriormente o rim cranial foi retirado para processamento de rotina em citogenética através da coloração com Giemsa (5%) (Foresti, Oliveira et al. 1993). As lâminas foram visualizadas em microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japan) por meio do software Nis-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão), sendo as imagens geradas utilizadas para contagem dos cromossomos.

No grupo com descendentes haploides, devido às anormalidades que causam a morte das larvas antes ou logo após a eclosão, a citogenética foi realizada em embriões na fase de somito seguindo o protocolo descrito por (Sato, Jorge et al. 2020) com algumas modificações. Inicialmente, foram feitos três *pools* contendo cinco embriões de *P. maculatus* haploides cada e incubados em solução de colchicina 0,007% durante 4 horas. Após o período de incubação, o córion foi removido utilizando solução de enzima pronase 0,03% (Sigma[®], #P8811) diluído em solução de Ringer (128.30 mM NaCl, 2.60 mM KCl, 1.80 mM CaCl₂) durante 30 segundos. Posteriormente, os embriões foram sacrificados e dissociados em placas de Petri, contendo 7 ml de solução hipotônica de KCl (0,075 M). O material foi transferido para tubos de centrifuga e colocados na estufa a 37°C por 21 min. Os passos seguintes foram os mesmos realizados nos juvenis, processamento de rotina em citogenética através da coloração com Giemsa (5%) (Foresti, Oliveira et al. 1993).

1.5 Confirmação da ginogênese por genotipagem

A confirmação da paternidade (herança materna para ginogenéticos) foi realizada através de genotipagem. Após a coleta dos gametas (oócitos e espermatozoides), uma pequena amostra de nadadeira dos parentais foi coletada, identificada e congelada a -80°C até a extração do DNA genômico. Para extração do DNA genômico dos descendentes dos grupos controle e ginogenéticos diploide foram coletadas e utilizadas amostras frescas de nadadeiras.

Para os testes de paternidade foram utilizados “primers” específicos para a amplificação de regiões de microssatélites desenhados para o lambari *A. altiparanae* (Zaganini, Hashimoto et al. 2014) e para o mandi *P. maculatus* (Paiva and Kalapothakis 2008). As sequências genéticas dos primers utilizados estão expressas na tabela abaixo (Tabela 1). Para tal, o DNA foi extraído dos parentais (mandi macho e fêmea) e de dois machos de lambari, assim como de oito exemplares de cada tratamento (controle e ginogenético); utilizando o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA #A1120, Madison, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado através de um espectrofotômetro QIAxpert (Quiagen, Hilden, Alemanha). Foi montada uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando 200 ng de DNA de cada amostra. A PCR foi realizada nas seguintes condições de ciclagem: inicialmente a reação foi incubada por 5 minutos a 94°C e seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C por 30 segundos) e extensão 72°C por 10 minutos, utilizando termociclador (Multigene Gradient, Labnet International, Edison, EUA). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em duble gel de poliacrilamida a 4% e 12%, e corados com 5 µL SYBER Safe (Invitrogen #S33102, São Paulo, Brasil) durante 3 minutos, visualizadas em transluminador de ultravioleta (ENDUROTTM GDS, Labnet

International, Inc). Posteriormente, as imagens foram digitalizadas com o sistema de foto digitalização (EnduroTM GDS, Labnet internacional, Inc). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram verificados pela comparação com o marcador de 50-pb (Gold Biotechnology#D100-500, EUA) e 1Kb DNA ladder (Invitrogen#10787018, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Primers de microssatélite utilizados na amplificação DNA do mandi (*Pimelodus maculatus*) e o lambari (*Astyanax altiparanae*).

Loci	Primers (5'–3')	Tamanho (pb)
Mandi 07	F: 5'-TGAGGCTTTCTGGAGGAGAC-3' R: 5'-CCTCAGCCTTGGTTGTGATT-3'	127–182
Asty 23	F: 5'-TCAATGGAACCTATGGACAAC-3' R: 5'-GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA-3'	160

1.6 Proporção sexual

A proporção sexual dos descendentes ginogenéticos foi realizada através de visualização macroscópica das gônadas. Devido à diferença morfológica entre gônadas de machos e fêmeas, torna-se possível realizar a confirmação do sexo sem necessidade de análise histológica (Figura 2).

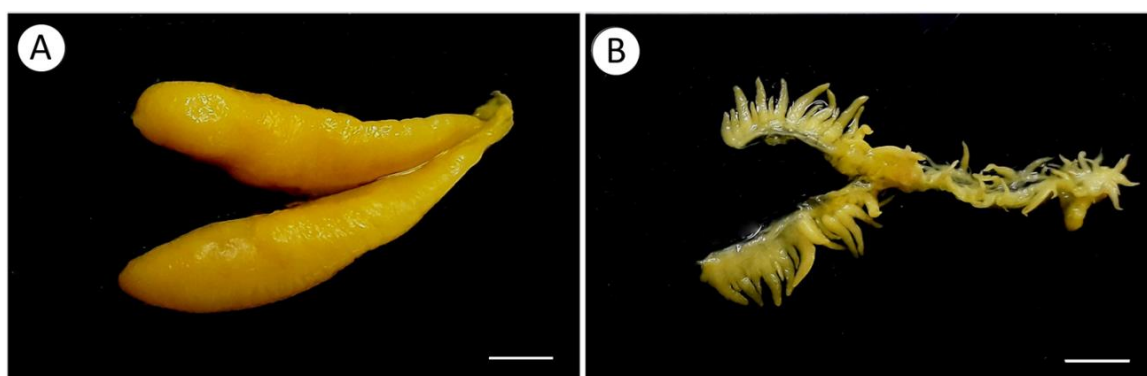


Figura 2. Visualização macroscópica das gônadas de mandi, *Pimelodus maculatus*, fêmea (A) e macho (B). Escala: 1000 μ m.

1.7 Análise estatística

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

2. RESULTADOS

2.1 Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia

Os dados dos estágios de desenvolvimento embrionário dos tratamentos descritos para indução a ginogênese em *P. maculatus* estão descritos na Tabela 2. Não foi observada diferença significativa entre o grupo haploide e o ginogenético para porcentagem de oócitos não fertilizados ($P = 0,9995$), em estágio de 2-células ($P = 0,9995$), blástula ($P = 0,9890$), gástrula ($P = 0,9819$) e somito ($P = 0,2956$), por outro lado, o tratamento controle apresentou porcentagens de sobrevivência mais altas para os mesmos estágios. A sobrevivência do grupo controle foi significativamente maior ($85,2 \pm 4,2\%$), quando comparada aos demais tratamentos, ginogenético ($15,4 \pm 1,7\%$) e haploide ($3,4 \pm 4,1\%$). Na eclosão, o grupo controle apresentou a maior porcentagem de larvas normais ($94,7 \pm 0,4\%$) (Figura 2A) em relação ao tratamento ginogenético ($53,9 \pm 9,5\%$). Para larvas anormais, não houve diferença entre os tratamentos ($P = 0,2652$).

2.2 Avaliação da ploidia através de citometria de fluxo

Conforme esperado, os resultados mostraram que todos os indivíduos do grupo fertilizado com sêmen irradiado (sem choque) eram haploides (Figura 3A). O conteúdo médio de DNA do grupo controle (Figura 3B) foi semelhante ao observado para indivíduos do grupo ginogenéticos (Figura 3C). Além disso, a avaliação da ploidia dos grupos através de citogenética mostraram indivíduos dos grupos controle e ginogenéticos com 56 cromossomos (Figura 4A e 4B), e indivíduos do grupo haploide com 28 cromossomos (Figura 4C).

2.3 Confirmação da ginogênese por genotipagem

Para o primers *Asty 23*, descrito para o lambari (*A. altiparanae*), foram visualizadas somente amplificações de DNA dos parentais da mesma espécie (L1 e L2♂) (Figura 5). No entanto, o DNA dos parentais de *P. maculatus* (macho e fêmea), assim como o grupo controle e ginogenéticos, não foram visualizadas amplificações para primer o *Asty 23* (Figura 5).

Para o primers *mandi 07*, não foi observada amplificação de DNA dos parentais de lambari (*A. altiparanae*) (L1 e L2♂) (Figura 7). Para os parentais da mesma espécie (*P. maculatus*) e para os descendentes ginogenéticos, assim como o grupo controle, foram observadas amplificações do DNA. No entanto, foi observada uma diferença no tamanho da amplificação da banda entre os parentais de *P. maculatus* (macho e fêmea), onde os exemplares do grupo ginogenético amplificaram somente a altura da banda da fêmea, diferente do grupo controle que amplificou a banda de ambos parentais (Figura 6). Confirmando assim a herança exclusivamente materna dos descendentes.

2.4 Proporção sexual

Conforme demonstrado na Tabela 3, a proporção sexual dos indivíduos ginogenéticos de R1, R2 e R3 foi feminina. Surpreendentemente, na R4 foram observados no grupo ginogenético, dois exemplares do sexo masculino.

Tabela 2. Desenvolvimento e sobrevivência de *Mandi*, *Pimelodus maculatus*, após tratamento com choque térmico para indução da ginogênese¹.

Tratamentos	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle	5,6 ± 3,4 ^a	94,4 ± 3,4 ^a	92,5 ± 4,4 ^a	90,4 ± 3,8 ^a	87,6 ± 4,7 ^a	85,2 ± 4,2 ^a	94,7 ± 0,4 ^a	5,3 ± 0,3 ^a	461
Haploide	47,5 ± 10,6 ^b	52,5 ± 10,6 ^b	51,4 ± 10,5 ^b	39,8 ± 12,2 ^b	31,8 ± 10,9 ^b	3,4 ± 4,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^a	466
Ginogenético	47,9 ± 11,0 ^b	52,1 ± 11,0 ^b	49,8 ± 10,8 ^b	37,8 ± 10,3 ^b	19,1 ± 2,9 ^b	15,4 ± 1,7 ^c	53,9 ± 9,5 ^b	46,1 ± 9,5 ^a	467
<i>P</i> - valor	0,0102	0,0102	0,0066	0,0011	0,0000	0,0000	0,0014	0,2652	

¹ Ovócitos *P. maculatus* recém-fertilizados com sêmen da mesma espécie (Controle), com sêmen de *A. altiparanae* irradiado com luz UV (Haploide) e com sêmen de *A. Altiparanae* irradiado e diploidizado com choque de temperatura à 38° por 2 min (Ginogenético). Após o tratamento, os ovos foram incubados a 26°C. As porcentagens e o número de ovos resultam de quatro repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; *P* < 0,05)

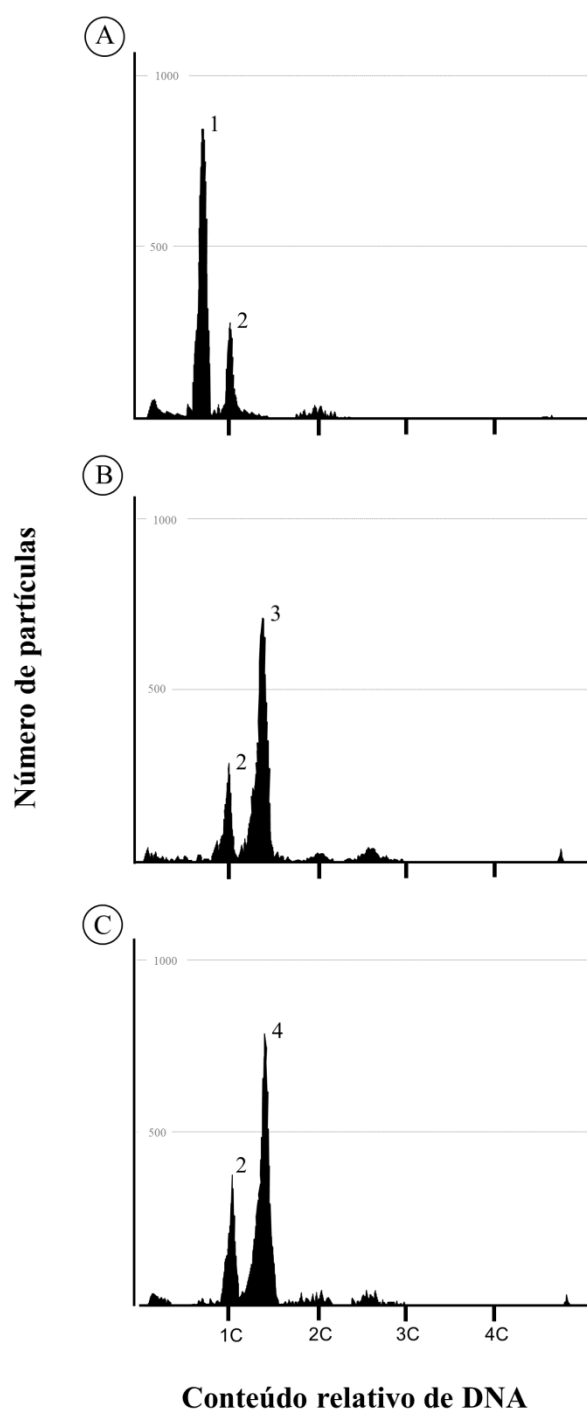


Figura 3. Histograma de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodidas de *Pimelodus maculatus* do grupo haploide (A), do grupo controle diploide (B) e do grupo ginogenéticos (C). 1: grupo haploide. 2: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 3: grupo controle diploide. 4: grupo ginogenéticos diploide.

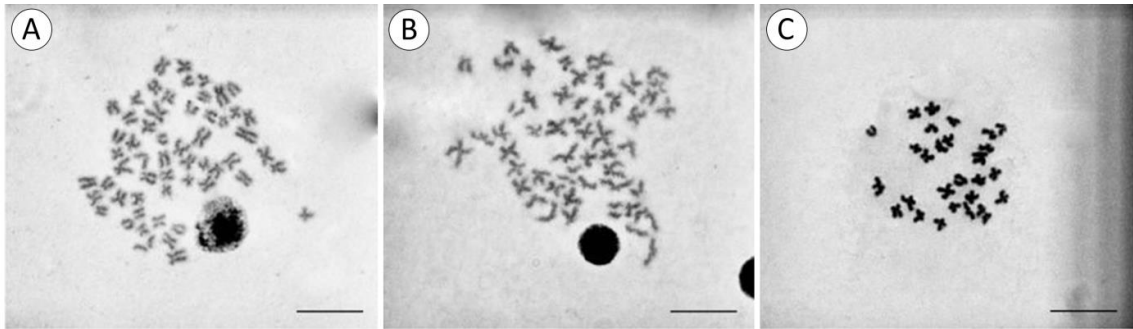


Figura 4. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Pimelodus maculatus*. A. Controle diploide com 56 cromossomos. B. Diploides ginogenéticos com 56 cromossomos. C. Haploides com 28 cromossomos. Escala: 10 μm.

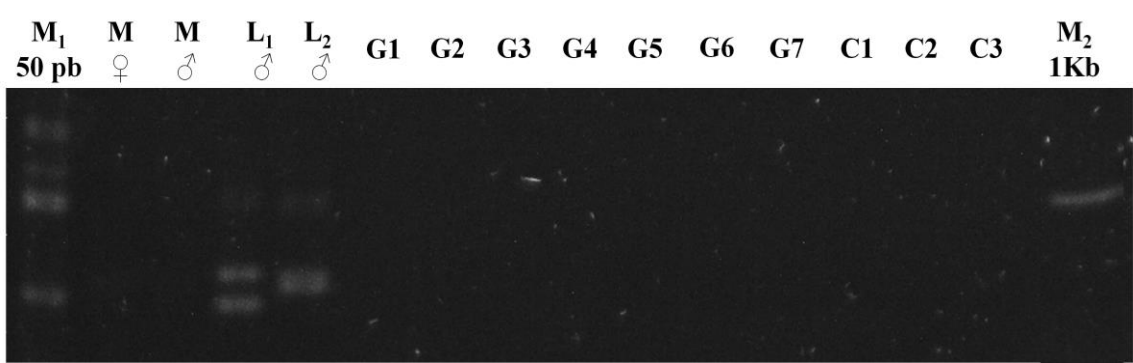


Figura 5. Visualização dos produtos amplificados de *Pimelodus maculatus* ginogenéticos induzido por espermatozoide de *Astyanax altiparanae* irradiados com luz UV e choque térmico. M₁: Marcador 50 pb; M♀: Mandi *P. maculatus* fêmea; M♂: Mandi *P. maculatus* macho; L₁♂: Lambari *A. altiparanae* macho ; L₂♂: Lambari *A. altiparanae* macho; G1-G7: Descendentes do grupo ginogenético; C1-C7: Descendentes do grupo controle; M₂: Marcador 1Kb. Amostras de descendentes da Repetição 1 (Seção 1.1) utilizando primers Asty 26 (160 pb) (Zaganini et al., 2014).

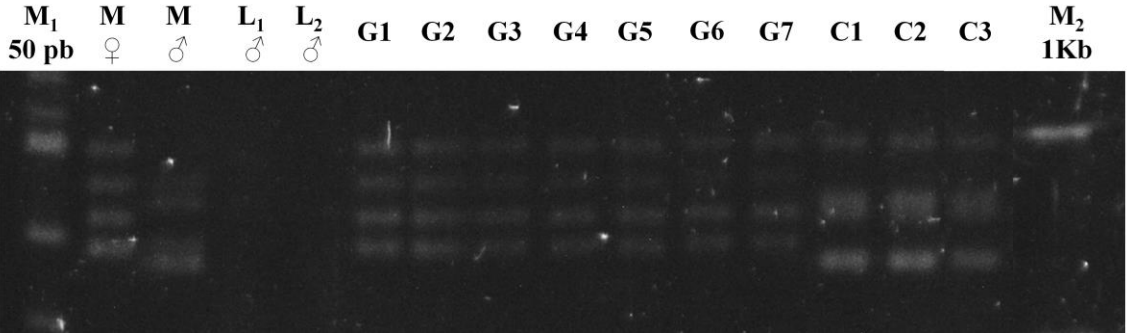


Figura 6. Visualização dos produtos amplificados de *Pimelodus maculatus* ginogenéticos induzido por espermatozoide de *Astyanax altiparanae* irradiados com luz UV e choque térmico. M₁: Marcador 50 pb; M♀: Mandi *P. maculatus* fêmea; M♂: Mandi *P. maculatus* macho; L₁♂: Lambari *A. altiparanae* macho ; L₂♂: Lambari *A. altiparanae* macho; G1-G7: Descendentes do grupo ginogenético; C1-C7: Descendentes do grupo controle; M₂: Marcador 1Kb. Amostras de descendentes da Repetição 1 (Seção 1.1) utilizando primers Mandi 07 (127–182 pb) (Paiva and Kalapothakis 2008).

Tabela 3. Proporção sexual de controle diploide e ginogenético diploide de *Pimelodus maculatus*.

Repetições	Sexo			
	Controle 2n		Ginogenético 2n	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
R1	7	12	8	0
R2	4	16	7	0
R3	10	10	13	0
R4	12	8	20	2

3 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi desenvolvido pela primeira vez um protocolo para indução à ginogênese utilizando-se espermatozoides heterólogos para fertilização de oócitos do mandi amarelo (*P. maculatus*). Os espermatozoides heterólogos do lambari do rabo amarelo (*A. altiparanae*) foram irradiados com luz UV e posteriormente o estado diploide dos descendentes foi restaurado através de choque de temperatura, obtendo proles 100% ginogenéticas.

A otimização da irradiação com luz UV é a primeira e indispensável etapa para a indução da ginogênese (Piferrer, Beaumont et al. 2009). A inativação dos espermatozoides de *A. altiparanae* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por (do Nascimento, Monzani et al. 2020a) sendo irradiado com luz UV (254 nm) a 80 mJ/cm². Tal procedimento requer a inativação do genoma dos espermatozoides sem comprometer a capacidade de fertilização (Dietrich, Szpyrka et al. 2005). Nos espermatozoides, a irradiação causa a fragmentação do DNA (Dietrich, Szpyrka et al. 2005), o que deve levar a nenhuma contribuição genética paterna nos descendentes.

A inativação do genoma paterno sem restaurar o estado diploide resulta em descendentes haploides e anormais, o que indica que a inativação dos espermatozoides foi eficiente. A condição haploide é conhecida como “síndrome haploide” (Suzuki, Oshiro, et al 1985), na qual as larvas apresentam diversas anormalidades e morrem durante o desenvolvimento embrionário, antes ou logo após a eclosão (Tvedt, Benfey et al. 2006, Pan, Zhu et al. 2017). Como esperado, as larvas do tratamento haploide do presente trabalho morreram durante o desenvolvimento embrionário ou logo após eclosão, confirmando a eficiente inativação dos espermatozoides. Desse modo, para a indução à ginogênese, o estado diploide deve ser restaurado pelo emprego de choques térmicos, ou de pressão (Komen and Thorgaard 2007, Manan, Hidayati et al. 2020).

No presente estudo, para diploidização, foi aplicado o mesmo choque (38°C; 2 min) descrito por (Bertolini, Lopez et al. 2020) para indução de triploides na espécie *P. maculatus*. Assim, os indivíduos ginogenéticos meióticos foram obtidos pela retenção do segundo corpúsculo polar. A ginogênese meiótica é uma ferramenta interessante para produção de homozigotos em peixes, uma vez que apresenta maior sobrevivência do que a ginogênese mitótica (Komen and Thorgaard 2007), como demonstrado em outros estudos (Arai 2001, Jiang, Liu et al. 2017).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a indução à ginogênese na espécie *P. maculatus* utilizando espermatozoides heterólogos é vantajosa, pois não foram identificados híbridos entre a prole descendente, obtendo uma prole 100% ginogenética. Em algumas espécies como peixe de coral (*Epinephelus fuscoguttatus*) e carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) onde foram utilizados espermatozoides heterólogos os diploides/triploides híbridos produzidos foram diferentes morfológicamente dos diploides ginogenéticos, obtendo-se proles ginogenéticas com 52.1% e 54.2% respectivamente (Zheng, Wang et al. 2017, Zhang, Yi et al. 2023).

A ginogênese é uma técnica de manipulação cromossômica que também pode ser utilizada para investigar o sistema de determinação do sexo (Komen and Thorgaard 2007). Dessa forma, também é conhecida na aquicultura por possibilitar a produção de lotes femininos em diferentes espécies de peixes (Emefe and Sorhue 2014), como observado em lambari *Astyanax altiparanae* (do Nascimento, Monzani et al. 2020a), *Siniperca chuatsi* (Cheng, Yu et al. 2019), *Silurus lanzhouensis* (Li, Lian et al. 2022) e *Salmo coruhensis* (Özdemir and Ekici 2022). No presente estudo, três repetições tiveram proporções sexuais de 100% fêmeas. No entanto, uma quarta repetição apresentou dois descendentes do sexo masculino, referente a 10% da prole. Os resultados evidenciam que *P. maculatus* é uma espécie com predominância de homogamia feminina (fêmea XX, macho XY). Resultados similares foram encontrados no bagre (*Pseudobagrus ussuriensis*), apresentando-se três machos entre os descendentes (Pan, Zhu et al. 2017) ou em lambari (*A. altiparanae*) onde foram encontrados machos ginogenéticos com capacidade de fertilização (Lázaro, Rocha et al. 2021).

Entre as possíveis razões que podem influenciar a presença de machos ginogenéticos são os fatores ambientais, como temperatura, pH, densidade, fotoperíodo ou a presença de loci autossômicos ou poligênicos que participam na determinação e diferenciação do sexo (Pan, Zhu et al. 2017, Fernandino and Hattori 2019, Martinez-Bengochea, Doretto et al. 2020). Embora todos os exemplares tenham sido mantidos nas mesmas condições.

A indução à ginogênese na espécie *P. maculatus* também foi confirmada por genotipagem através de microssatélites. Este tipo de análise mais precisa, foi utilizada para confirmar a ginogênese em outras espécies, *Astyanax altiparanae* (do Nascimento, Monzani et al. 2020a), *Siniperca chuatsi* (Cheng, Yu et al. 2019) e *Silurus lanzhouensis*

(Li, Lian et al. 2022). A seleção de primers específicos para cada espécie foi importante para garantir diferentes tamanhos de bandas e os resultados mostraram que os indivíduos ginogenéticos analisados herdaram somente alelos maternos, sugerindo que a herança genética foi totalmente materna.

Na análise citogenética foi observada a presença de 56 cromossomos nos exemplares ginogenéticos resultantes, a mesma quantidade encontrada nos exemplares do grupo controle, confirmando os dados da citometria de fluxo, de que os ginogenéticos são diploides. Sendo assim, os três métodos de avaliação da técnica combinados (citometria de fluxo, citogenética e genotipagem), cada um com uma vantagem particular, confirmam a eficácia do protocolo estudado.

Por fim, neste estudo foi estabelecido um protocolo eficiente para indução da ginogênese meiótica no mandi *P. maculatus*, utilizando espermatozoides heterólogos do lambari do rabo amarelo *A. altiparanae* irradiado com luz UV (254 nm) a 80 mJ/cm² e diploidização utilizando choque de temperatura de (38°C; 2 min) 2 minutos pós fertilização. A aplicação do protocolo resultou em descendentes ginogenéticos com predominância de fêmeas, sugerindo um sistema de determinação do sexo XX-XY. Esse foi o primeiro protocolo de ginogênese em um siluriforme Neotropical. Além disso, o protocolo estabelecido poderá ser aplicado na geração de linhagens monossexuais e clonais para ciências básicas e aplicadas.

4- REFERÊNCIAS

- Arai, K. (2001). "Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan." Aquaculture **197**(1-4): 205-228.
- Bertolini, R. M., L. S. Lopez, N. F. do Nascimento, D. R. Arashiro, D. H. de Siqueira Silva, S. C. A. dos Santos, J. A. Senhorini and G. S. Yasui (2020). "Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*." Aquaculture International **28**(1): 127-137.
- Cheng, W., X. Yu, K. Yang, J. Tong, S. Zhu, Q. Wang, R. Xia, B. Li, B. Fu and G. Deng (2019). "Meiotic gynogenesis with heterologous sperm in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* and evidence for female homogamety." Aquaculture Research **50**(11): 3286-3294.
- Dietrich, G., A. Szpyrka, M. Wojtczak, S. Dobosz, K. Goryczko and A. Ciereszko (2005). "Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa." Theriogenology **64**(8): 1809-1822.
- do Nascimento, N. F., P. S. Monzani, M. Pereira-Santos, D. Niedzielski, J. A. Senhorini, L. A. Silva, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2020a). "The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism." Aquaculture **514**: 734432.
- Emefe, O. and U. Sorhue (2014). Gynogenesis: An effective way of controlling fish population and increasing profit in aquaculture, Conference paper/38 th Annual GSN conference/Genetics Public Awareness and
- Fernandino, J. I. and R. S. Hattori (2019). "Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment." General and Comparative Endocrinology **273**: 172-183.
- Foresti, F., C. Oliveira and L. F. de Almeida-Toledo (1993). "A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine." Experientia **49**(9): 810-813.
- Jiang, H., H. Liu, G. Wang, X. Zhang, J. Bao and L. Jiang (2017). "Fast development of genetically uniform strains by gynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)." Aquaculture Research **48**(5): 2032-2038.
- Komen, H. and G. H. Thorgaard (2007). "Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review." Aquaculture **269**(1-4): 150-173.
- Lázaro, T. M., N. R. d. A. Rocha, P. S. Monzani, L. S. O. Nakaghi, J. A. Senhorini, G. S. Yasui and N. F. d. Nascimento (2021). "Sperm quality of spontaneously occurring gynogenetic males in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*." Journal of Applied Ichthyology **37**(6): 909-915.

- Li, L., Z. Lian, W. Xiao, L. Xing, Y. Liu, Q. Sai, Z. Yu, Y. Tian, Y. Wang and Z. Liu (2022). "Induction of meiotic gynogenesis in Lanzhou catfish (*Silurus lanzhouensis*) with heterologous sperm and evidence for female homogamety." Aquaculture Research.
- Manan, H., A. N. Hidayati, N. A. Lyana, A. Amin-Safwan, H. Ma, N. A. Kasan and M. Ikhwanuddin (2020). "A review of gynogenesis manipulation in aquatic animals." Aquaculture and Fisheries.
- Martinez-Bengochea, A., L. Doretto, I. Rosa, M. Oliveira, C. Silva, D. Silva, G. Santos, J. Santos, M. Avelar and L. Silva (2020). "Effects of 17 β -estradiol on early gonadal development and expression of genes implicated in sexual differentiation of a South American teleost, *Astyanax altiparanae*." Comparative Biochemistry and Physiology Part b: Biochemistry and Molecular Biology **248**: 110467.
- Özdemir, R. C. and A. Ekici (2022). "Improved induction of meiotic gynogenesis in Coruh trout, *Salmo coruhensis*." Aquaculture Research **53**(12): 4327-4337.
- Paiva, A. L. B. and E. Kalapothakis (2008). "Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae)." Molecular ecology resources **8**(5): 1078-1080.
- Pan, Z. J., C. K. Zhu, H. Wang, G. L. Chang, H. Y. Ding, X. G. Qiang and X. S. Yu (2017). "Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety." Aquaculture Research **48**(11): 5659-5665.
- Piferrer, F., A. Beaumont, J.-C. Falguière, M. Flajšhans, P. Haffray and L. Colombo (2009). "Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment." Aquaculture **293**(3): 125-156.
- Sato, L., P. Jorge, V. Mastrochirico-Filho, M. Hata, S. Batlouni, R. Kuradomi, F. Porto-Foresti, F. Foresti and D. Hashimoto (2020). "Triploidy in tambaqui *Colossoma macropomum* identified by chromosomes of fish larvae." Journal of Aquaculture & Marine Biology **9**(3): 65-69.
- Suzuki, R., Oshiro, T., Nakanishi, T., 1985. Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Aquaculture **48**, 45–55.
- Tvedt, H. B., T. J. Benfey, D. J. Martin-Robichaud, C. McGowan and M. Reith (2006). "Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)." Aquaculture **252**(2-4): 573-583.
- Xavier, P. L. P., J. A. Senhorini, M. Pereira-Santos, T. Fujimoto, E. Shimoda, L. A. Silva, S. A. Dos Santos and G. S. Yasui (2017). "A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*." Front Genet **8**: 131.

Yasui, G. S., J. A. Senhorini, E. Shimoda, M. Pereira-Santos, L. S. O. Nakaghi, T. Fujimoto, L. Arias-Rodriguez and L. A. Silva (2015). "Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish." animal **9**(3): 464-470.

Zaganini, R. L., D. T. Hashimoto, L. H. G. Pereira, C. Oliveira, F. F. Mendonca, F. Foresti and F. Porto-Foresti (2014). "Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification." Journal of genetics **93**(1): 24-27.

Zhang, Z., H. Yi, Y. Su, C. Huang, X. Wei, Q. Chen, J. Chen, H. Li, S. Bi and H. Lai (2023). "Hydrostatic pressure shock induced diploid/tetraploid mosaic in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), with the observation of embryo development and change in body spots." Aquaculture **563**: 738989.

Zheng, G., C. Wang, D. Guo, X. Jiang and S. Zou (2017). "Ploidy level and performance in meiotic gynogenetic offsprings of grass carp using UV-irradiated blunt snout bream sperm." Aquaculture and Fisheries **2**(5): 213-219.

Capítulo III: Indução à tetraploidização do curimbatá (*Prochilodus lineatus*)

Neste terceiro capítulo, o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo eficaz de indução à tetraploidização no curimbatá (*Prochilodus lineatus*) através de choque térmico em diferentes tempos a fim de inibir a primeira divisão celular.

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, localizado na Instituição anteriormente mencionada (CEPTA/ICMBio), na cidade de Pirassununga/SP, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #10/2015) e SISBIO 31836-9.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Origem dos peixes parentais

Para indução a tetraploidização foram utilizados dois lotes de peixes da espécie *Prochilodus lineatus* (curimbatá). O primeiro lote (Lote 1), composto por três casais provenientes do plantel existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (ICMBio/CEPTA), Pirassununga, São Paulo, Brasil (21°55'58" S, 47°22'31" O) mantidos em tanques de alvenaria (20 x 20m). O segundo lote (Lote 2) de peixes, também composto por três casais, foram capturados no Rio Mogi Guaçu, município de Pirassununga-SP (21°55'45" S, 47°22'21" O), entre os meses de outubro e dezembro de 2022, utilizando-se tarrafas de nylon de malha de 5 cm entre nós.

1.2 Seleção dos reprodutores, indução hormonal e fertilização *in vitro*

A seleção dos reprodutores foi feita através de características como papila urogenital avermelhada e ventre abaulado nas fêmeas e nos machos, liberação de sêmen sob leve pressão abdominal e emissão de sons reprodutivos. Durante o período de indução hormonal, os peixes dos dois lotes foram acondicionados em tanques de alvenaria com capacidade para 3000 L de água, com renovação constante, vazão aproximada de 20 litros por minuto e temperatura entre 25°C e 29°C.

Nas fêmeas provenientes do Cepta/ICMBio (Lote 1), a indução hormonal foi feita em duas doses com hipófise desidratada de carpa (HDC), sendo a primeira dosagem de 0,5 mg kg⁻¹ e a segunda, aplicada seis horas depois, de 5 mg kg⁻¹. Nos machos, foi aplicada dose única de 5 mg kg⁻¹, juntamente com a segunda indução das fêmeas. Nos peixes (fêmeas e machos) provenientes do Rio Mogi Guaçu (Lote 2), foi aplicada uma única dose de 5 mg kg⁻¹, já que estavam bem aptos para a reprodução e estavam respondendo melhor à indução com este procedimento.

Os gametas foram coletados cerca de 6 - 8 horas após a indução hormonal (Lote 1- após a segunda dose e Lote 2- após a dose única). Para isso, as fêmeas foram anestesiadas com Eugenol (200 mg L⁻¹) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) e os oócitos extrusados em recipientes secos, evitando a hidratação dos mesmos. O sêmen foi coletado após leve pressão manual na cavidade celomática, no sentido crânio-caudal, com auxílio de uma micropipeta de 1000 µL (Eppendorf, Alemanha), transferido para um tubo Tubo de centrífuga 15 mL (Ciencor Scientific #352096, Tamaulipas, México) e imediatamente alocado dentro de uma caixa de isopor contendo gelo (~5°C). Para a fertilização *in vitro*, o sêmen foi adicionado à massa de ovos e os gametas ativados pela adição de água.

1.3 Tetraploidização através de choque de temperatura

Para indução de tetraplóides na espécie *P. lineatus* foi realizado o mesmo procedimento nos Lotes 1 e 2. Cada desova foi realizada separadamente, resultando em três repetições para cada lote de peixes. (Lote 1- Cepta / ICMBio e Lote 2- Rio Mogi Guaçu).

Para cada repetição, a massa de ovos fertilizados foi dividida em oito incubadoras flutuantes (recipientes plásticos com fundo de malha de náilon de 100 µm) com temperatura controlada a 26°C, sendo uma incubadora para cada tratamento. O grupo controle diploide permaneceu na temperatura de 26°C durante todo o desenvolvimento embrionário e os outros sete grupos foram submetidos ao choque térmico de 40°C em diferentes minutos pós-fertilização (mpf). Os choques foram iniciados com 26, 28, 30, 32, 34, 36 e 38 mpf com duração de 2 minutos e posteriormente incubados a 26°C até a eclosão. A temperatura de 40°C utilizada no procedimento foi baseada no trabalho desenvolvido por Yasui, Nakaghi et al. (2020).

1.4 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência

Foram calculadas as porcentagens de sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário até a eclosão e de larvas normais e anormais resultantes de todos os tratamentos experimentais. Para isso, de cada tratamento, pequenas alíquotas de embriões foram coletadas e transferidas para incubadoras flutuantes de 100 µm de diâmetro, identificadas e mantidas em aquários de 60L de água com recirculação constante, oxigenação e temperatura controlada (26°C). Os tratamentos foram

monitorados através de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japão) nos estágios de 2-células, blástula, gástrula, somito, e eclosão. Os embriões mortos foram retirados a cada estágio para não prejudicar a qualidade da água e após a eclosão foram contabilizados os números de larvas normais e anormais resultantes de cada tratamento.

1.5 Avaliação da ploidia através de Citometria de Fluxo e Citogenética

A análise de citometria de fluxo foi realizada em larvas recém-eclodidas, para identificar o melhor tempo de choque de temperatura após fertilização para indução a tetraploidização entre os sete tratamentos testados. Para isso, o procedimento foi realizado seguindo o protocolo publicado por (Xavier, Senhorini et al. 2017) descrito no item 1.4 do Capítulo I.

A citogenética foi realizada em larvas recém eclodidas seguindo o protocolo descrito por Sato, Jorge et al. (2020) e Foresti, Oliveira et al. (1993) conforme descrito no item 1.5 do Capítulo I.

1.6 Análise estatística

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

2 RESULTADOS

2.1 Desenvolvimento embrionário e sobrevivência

Os dados de desenvolvimento embrionário dos tratamentos de choques de temperatura para tetraploidização, realizado com reprodutores provenientes do CEPTA/ICMBio (Lote 1) estão descritos na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nas fases de 2 células ($P = 0,6341$), blástula ($P = 0,9760$), gástrula ($P = 0,2280$). No entanto, foi observada menor sobrevivência dos descendentes resultantes dos tratamentos submetidos ao choque de temperatura nas fases de somito ($P = 0,000112$) e eclosão ($P = 0,0000$), apresentando diferença significativa quando comparados com o grupo controle.

Com exceção dos tratamentos 26' e 28', que apresentaram baixa porcentagem ou nenhuma sobrevivência, $0,0 \pm 0,0$ e $0,3 \pm 0,3$ respectivamente, todos os demais tratamentos apresentaram descendência de larvas anormais, inclusive no tratamento controle ($25,6 \pm 4,7$), porém sem diferença significativa (Tabela 1).

Os dados de desenvolvimento embrionário dos tratamentos de choques de temperatura para tetraploidização, realizado com reprodutores provenientes do Rio Mogi Guaçu (Lote 2) estão descritos na Tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas na sobrevivência dos tratamentos nas fases de 2 células ($P = 0,5232$), blástula ($P = 0,9960$) e gástrula ($P = 0,4780$). Ao atingirem a fase de somito, todos os tratamentos submetidos ao choque de temperatura apresentaram uma menor sobrevivência, significativamente diferente ($P = 0,0030$) quando comparados com o grupo controle. Nos tratamentos de 26' e 28' foi observada sobrevivência superior $36,0 \pm 12,9$ e $35,0 \pm 14,9$ quando comparadas com os demais tratamentos de 30', 32', 34, 36' e 38'. Resultados semelhantes foram observados na fase de eclosão, com porcentagem

de sobrevivência significativamente maior no grupo controle ($71,2 \pm 3,2\%$) quando comparado com os tratamentos submetidos ao choque de temperatura ($P = 0,0000$). Embora o grupo controle tenha apresentado maior porcentagem de larvas normais resultantes ($92,6 \pm 2,1\%$), não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. A descendência de larvas anormais foi observada em todos os tratamentos, porém sem diferença significativa ($P = 0,2758$) (Tabela 2).

2.2 Análise da ploidia por citometria de fluxo e citogenética

Para análise de citometria de fluxo, o conteúdo relativo de DNA dos grupos controle diploide e dos grupos tratados com choque de temperatura, foram comparados com o do sêmen de *A. altiparanae* (utilizado como controle haploide).

A análise mostrou que todos os descendentes submetidos a choque térmico provenientes de reprodutores do CEPTA/ICMBio (lote 1) resultaram em larvas diploides. No entanto, resultados diferentes foram observados quando reprodutores do Rio Mogi Guaçu foram utilizados (Lote 2). Em todos os tratamentos, com exceção do choque aos 38' mpf, apresentaram descendentes tetraploides (Tabela 3). Os tratamentos de 26', 28' e 30' mpf apresentaram porcentagens maiores de larvas tetraploides, com 52%, 72% e 50%, respectivamente. Além de descendentes tetraploides, foi observado, em todos os tratamentos, a presença de mosaicismo ($2n/4n$), sendo a maior porcentagem encontrada no tratamento 34' mpf (30%).

Na Figura 1, é ilustrado um histograma de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodida de *P. lineatus* do grupo controle diplóide (Figura. 1A), do grupo tetraploide (Figura. 1B) e dos mosaicos diploide/tetraploide (Figura. 1C).

Os resultados da citogenética mostraram que os peixes diploides (Figura. 2A) apresentaram 54 cromossomos metafásicos. Por outro lado, no grupo submetido a choque de temperatura, foram observados 108 cromossomos, confirmando que os mesmos são tetraploides (Figura. 2B).

Tabela 1. Desenvolvimento e sobrevivência de *Prochilodus lineatus* descendente de reprodutores provenientes do CEPTA/ICMBio (Lote 1), após tratamentos com choque térmico para indução a tetraploidia¹.

Tratamentos (mpf)	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle	0,5 ± 0,3	99,5 ± 0,3	91,1 ± 1,7	67,9 ± 10,9	51,1 ± 10,2 ^a	42,1 ± 7,7 ^a	74,4 ± 4,7	25,6 ± 4,7	372
26'	2,5 ± 1,6	97,5 ± 1,6	87,3 ± 4,5	18,3 ± 15,7	0,3 ± 0,3 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	373
28'	2,3 ± 1,6	97,7 ± 1,6	91,3 ± 5,4	25,7 ± 13,1	1,2 ± 0,4 ^b	0,3 ± 0,3 ^b	33,3 ± 33,3	0,0 ± 0,0	362
30'	4,8 ± 2,5	95,2 ± 2,5	86,4 ± 6,2	28,6 ± 11,4	6,5 ± 3,4 ^b	3,6 ± 2,3 ^b	68,5 ± 15,8	31,5 ± 15,8	346
32'	6,3 ± 3,1	93,7 ± 3,1	86,4 ± 6,2	38,4 ± 15,0	15,2 ± 8,5 ^b	3,0 ± 1,7 ^b	65,1 ± 20,6	34,9 ± 20,6	398
34'	6,4 ± 3,8	93,6 ± 3,8	90,3 ± 4,8	26,1 ± 14,2	4,5 ± 3,8 ^b	2,3 ± 2,3 ^b	8,3 ± 8,3	25,0 ± 25,0	403
36'	6,9 ± 3,3	93,1 ± 3,3	87,1 ± 4,8	26,9 ± 14,7	9,1 ± 5,5 ^b	2,2 ± 1,3 ^b	22,2 ± 22,2	44,4 ± 29,4	387
38'	5,7 ± 3,5	94,3 ± 3,5	91,1 ± 3,1	20,0 ± 4,6	3,3 ± 1,7 ^b	0,7 ± 0,7 ^b	0,0 ± 0,0	33,3 ± 33,3	394
P-valor	0,6336	0,6341	0,9760	0,2280	0,0001	0,0000	0,1051	0,7204	

¹Ovócitos de *Prochilodus lineatus* recém-fertilizados e submetidos a choques térmicos aos 26, 28, 30, 32, 34, 36 e 38 mpf a 40° por 2 min. Após o tratamento, os ovos foram incubados a 26°C. O grupo de controle indica ovos intactos mantidos a 26°C (sem tratamento). As porcentagens e o número de ovos resultam de três repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$). mpf: minutos pós-fertilização.

Tabela 2. Desenvolvimento e sobrevivência de *Prochilodus lineatus* descendente de reprodutores provenientes do rio Mogi Guaçu (Lote 2), após tratamentos com choque térmico para indução a tetraploidia¹.

Tratamentos (mpf)	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle	6,6 ± 2,3	93,4 ± 2,3	85,8 ± 5,5	84,3 ± 5,2	80,8 ± 6,0 ^a	71,2 ± 3,2 ^a	92,6 ± 2,1	7,4 ± 2,1	377
26'	5,8 ± 1,5	94,2 ± 1,5	83,3 ± 9,3	75,2 ± 6,9	36,0 ± 12,9 ^{ab}	10,4 ± 10,9 ^b	17,3 ± 10,9	82,7 ± 18,9	349
28'	4,6 ± 1,0	95,4 ± 1,0	85,8 ± 5,8	80,9 ± 7,1	35,0 ± 14,9 ^{ab}	9,7 ± 1,5 ^b	32,8 ± 12,6	67,2 ± 12,6	397
30'	7,8 ± 2,5	92,2 ± 2,5	84,9 ± 6,5	63,7 ± 16,9	26,9 ± 13,6 ^b	9,9 ± 5,1 ^b	31,9 ± 20,7	34,8 ± 21,8	371
32'	9,9 ± 2,4	90,1 ± 2,4	82,5 ± 4,7	62,5 ± 12,7	23,7 ± 8,2 ^b	11,6 ± 6,2 ^b	23,9 ± 16,3	42,7 ± 24,1	428
34'	12,3 ± 4,2	85,6 ± 5,8	78,9 ± 6,8	59,0 ± 11,0	20,3 ± 3,9 ^b	6,0 ± 3,2 ^b	32,5 ± 19,3	34,2 ± 20,0	407
36'	10,1 ± 4,0	89,9 ± 4,0	84,1 ± 5,9	69,4 ± 7,1	18,6 ± 7,3 ^b	9,5 ± 8,3 ^b	25,8 ± 13,3	40,8 ± 20,7	357
38'	6,7 ± 3,8	93,3 ± 3,8	85,3 ± 8,3	49,8 ± 18,9	6,8 ± 3,4 ^b	3,0 ± 2,7 ^b	36,4 ± 31,9	30,3 ± 30,3	403
P-valor	0,6249	0,5232	0,9960	0,4780	0,0030	0,0000	0,1725	0,2758	

¹Ovócitos de *Prochilodus lineatus* recém-fertilizados e submetidos a choques térmicos aos 26, 28, 30, 32, 34, 36 e 38 mpf a 40° por 2 min. Após o tratamento, os ovos foram incubados a 26°C. O grupo de controle indica ovos intactos mantidos a 26°C (sem tratamento). As porcentagens resultam de três repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$). mpf: minutos pós-fertilização.

Tabela 3. Porcentagens de indivíduos tetraploides de *Prochilodus lineatus* analisados através de citometria de fluxo, resultantes de tratamentos de choque de temperatura a 26', 28', 30', 32', 34', 36' e 38 mpf¹.

Tratamentos	Ploidia			tetraploides (%)	mosaico 2n/4n (%)
	2n	4n	mosaico 2n/4n		
Controle	45	0	0	0%	0%
26'	5	13	7	52%	28%
28'	7	28	4	72%	10%
30'	11	15	4	50%	13%
32'	19	12	9	30%	23%
34'	20	1	9	3%	30%
36'	22	3	8	9%	24%
38'	13	0	2	0%	13%

1 Análise realizada em larvas recém-eclodidas dos tratamentos testados. O grupo de controle indica ovos intactos mantidos a 26°C (sem tratamento). As porcentagens resultam de três repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. mpf: minutos pós-fertilização.

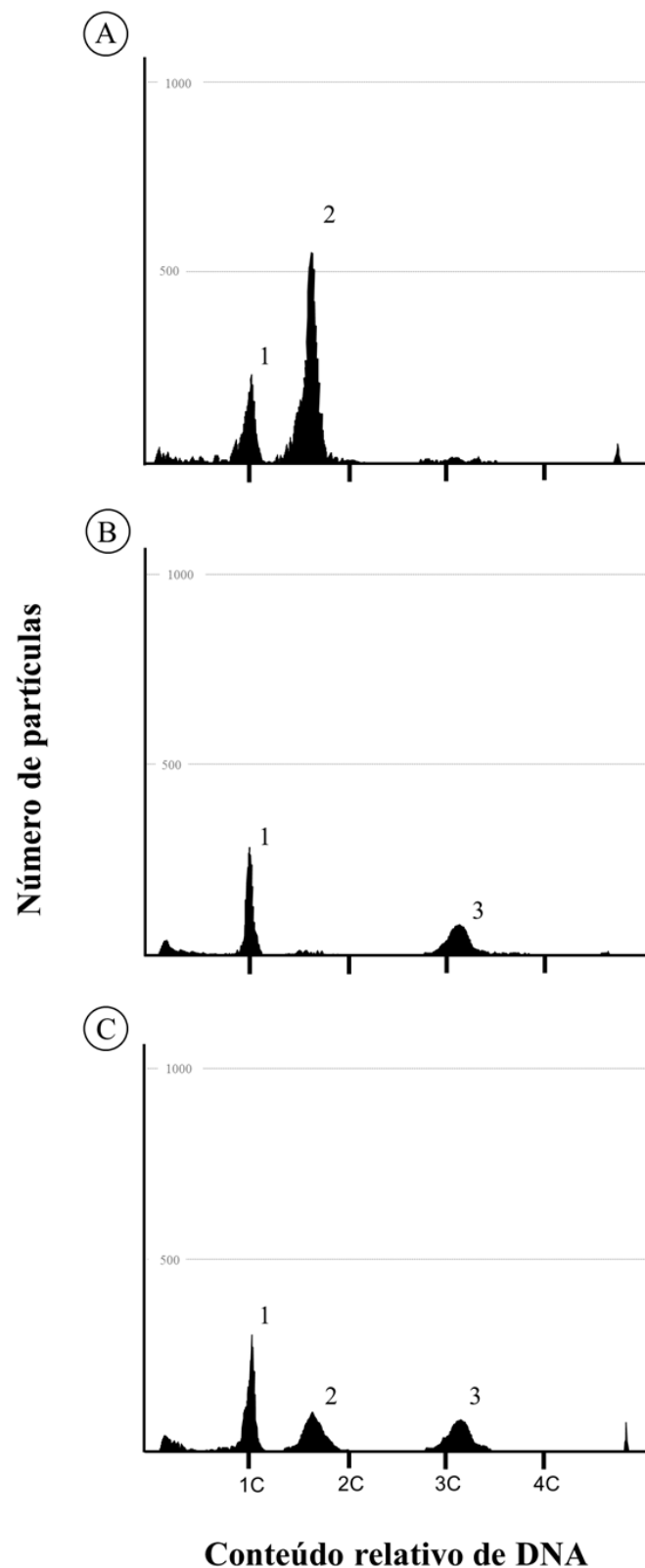


Figura 1. Histograma ilustrativo de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodida de *Prochilodus lineatus* do grupo controle diploide (A), do grupo tetraploide (B) e mosaicos diploide/tetraploide (C). 1: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 2: grupo controle diploide. 3: grupo tetraploide.

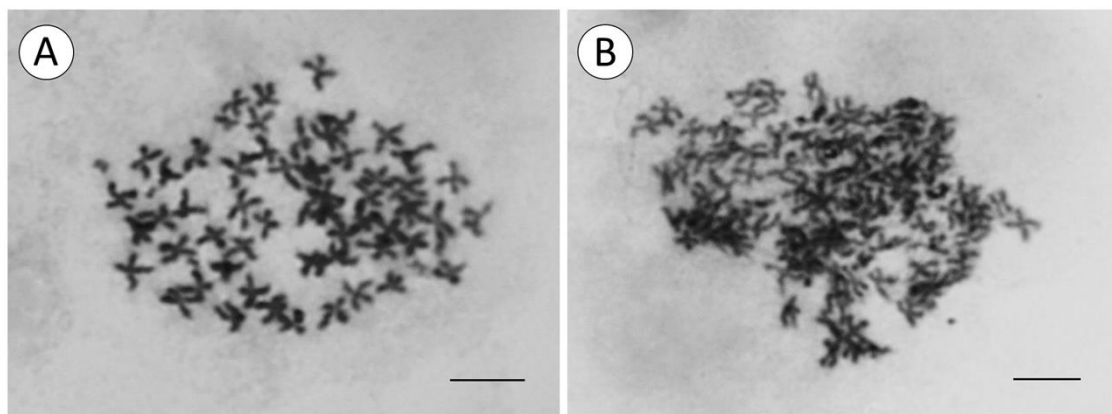


Figura 2. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Prochilodus lineatus*. A. Controle diploide com 54 cromossomos. B. Descendentes tetraploides com 108 cromossomos. Escala: 10 µm.

3 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi estabelecido um protocolo de tetraploidização no curimatá (*Pimelodus lineatus*) através de choque de temperatura impedindo a segunda divisão celular. Em reprodutores provenientes do plantel existente no CEPTA/ICMBio, não foi possível obter descendentes tetraploides. No entanto, quando os mesmos procedimentos foram aplicados em reprodutores provenientes do Rio Mogi Guaçu, foi observada descendência de larvas tetraploides em maiores porcentagens nos tratamentos de 26', 28' e 30' mpf, assim como uma alta porcentagem de mosaicismo ($2n/4n$) em todos os tratamentos.

Peixes tetraploides são interessantes para pesquisa básica e aplicada, pois permitem a manipulação da ploidia de uma espécie. Caso produzam gametas diploides funcionais, é possível produzir triploides em larga escala (Alves, Yasui et al. 2022) ou ainda induzir peixes ginogenéticos de uma espécie (Arai and Fujimoto 2018), sem a necessidade de aplicar choques de temperatura ou pressão para indução a triploidização ou para restaurar diploidia. Tais características têm tornado os peixes tetraploides um modelo interessante na aquicultura devido às vantagens apresentadas em indivíduos

triploides, como esterilidade e maior rendimento de carcaça (do Nascimento, de Siqueira-Silva et al. 2017) ou no caso dos animais ginogenéticos, a produção de lotes monosexuais (Pan, Zhu et al. 2017, Cheng, Yu et al. 2019, do Nascimento, Monzani et al. 2020a).

Em peixes neotropicais, protocolos de indução a tetraploidização são escassos, sendo conhecido apenas em algumas espécies, como jundiá (*Rhamdia quelen*) (Garcia, Silva et al. 2017) e o lambari de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), onde foi possível coletar gametas diploides funcionais e produzir proles 100% triploides (2017, do Nascimento, Pereira-Santos et al. 2020b, Alves, Yasui et al. 2022). Um problema muito comum em protocolos de tetraploidização é a baixa sobrevivência. Em muitas espécies, as larvas morrem logo após ou dias após a eclosão (Malison, Held et al. 2001, Sakao, Fujimoto et al. 2003, Sakao, Fujimoto et al. 2006, Gil, Kong et al. 2016), na primeira alimentação (Haniffa, Sridhar et al. 2004) ou ainda antes de atingirem a maturação sexual (Meng, Liu et al. 2021). De acordo com (Sakao, Fujimoto et al. 2006), esses resultados sugerem que a mortalidade de embriões tetraploides não é um efeito colateral do choque aplicado, mas resultado da própria elevação do status de ploidia.

Indivíduos mosaicos ($2n/4n$), caso sejam férteis, também podem ser uma fonte de gametas diploides funcionais, sendo assim uma alternativa viável caso peixes tetraploides férteis sejam difíceis de obter (Fujimoto, Sakao et al. 2013, Fujimoto, Fujimoto et al. 2020). O mosaicismo pode ocorrer de forma espontânea em populações de peixes cultivadas e selvagens (Nomura, Takeda et al. 2013, Fujimoto, Fujimoto et al. 2020, Zhang, Yi et al. 2023), isto acontece devido a uma mitose anormal durante o desenvolvimento embrionário inicial. Em alguns embriões o centríolo filho em um dos dois pólos é imaturo e no outro pólo maduro, nesse o caso, o centríolo filho imaturo em um dos polos seria desmontado e o centríolo filho maduro no outro polo não seria

afetado ocasionando diferentes respostas após aplicar o choque de temperatura ou pressão (Zhang and Onozato 2004). Perante os resultados obtidos neste trabalho, com alta porcentagem de mosaicismo ($2n/4n$) em todos os tratamentos, características como sobrevivência, maturação sexual e produção de gametas se tornaram interessantes para a espécie.

A qualidade dos gametas é um fator que também precisa ser considerado, por ser um tratamento muito agressivo, gametas de baixa qualidade podem dificultar a indução a tetraploidização. Alguns fatores que afetam a qualidade dos gametas podem ser 1) nutrição (Butts, Hilmarisdóttir et al. 2020, Yıldız, Ofori-Mensah et al. 2021), 2) fatores ambientais como estresse, pH, temperatura e fotoperíodo (Schreck, Contreras-Sanchez et al. 2001, Bobe and Labbé 2010), ou 3) endogamia, a qual geralmente leva a uma diminuição na qualidade do espermatozoide ou oócito (Waters, Hard et al. 2020) e 4) fatores biológicos que podem ser o status social e a idade do peixe (Ciereszko, Judycka et al. 2020). Os processos mencionados anteriormente comumente acontecem em peixes criados em cativeiro, onde a variabilidade genética é reduzida (Lopera Barrero 2007, Rodriguez-Rodriguez, Lopera-Barrero et al. 2010).

Neste contexto, por ser considerada uma das espécies migratórias de maiores distâncias da região neotropical, o curimatá (*P. lineatus*) tem sido amplamente utilizado em programas de repovoamento dos rios, tornando-se uma espécie modelo para estudos de diversidade genética em populações silvestres e de cativeiro, demonstrando que os animais criados em cativeiro apresentam uma menor diversidade genética e altas taxas de endogamia (Lopera-Barrero, Santos et al. 2016, Iwersen, LAZOSKI et al. 2019). Tal fator pode explicar os resultados obtidos com a aplicação da técnica em reprodutores provenientes do CEPTA/ICMBio, peixes de cativeiro. Além da indução a tetraploidização ineficaz, foi observada uma menor porcentagem de eclosão

do tratamento controle ($42,1 \pm 7,7\%$) quando comparado com a eclosão do controle ($71,2 \pm 3,2\%$) resultante de reprodutores do Rio Mogi Guaçu, peixes silvestres. Dessa forma, a endogamia poderia ser o fator que esteja afetando a qualidade dos gametas e consequentemente provocando uma baixa sobrevivência, larvas mais sensíveis ou com malformações, dificultando a aplicação de estratégias biotecnológicas como é o caso da manipulação cromossômica.

Em suma, diversos fatores genéticos e não genéticos, sobretudo as de efeito materno, como a qualidade do oócito, vitelo, córion, e outros fatores não genéticos de efeito materno (non-genetic maternal effects – NGM) podem estar influenciando nos resultados ora obtidos. Embora a causa da diferença entre lotes selvagens e domesticados tenham propiciado resultados diferentes, com a aplicação da técnica em peixes proveniente do Rio Mogi Guaçu, peixes silvestres, um protocolo de tetraploidização foi estabelecido na espécie *P. lineatus*. A maior porcentagem de indivíduos tetraploides alcançada foi de 72,0% com tempo de choque de 28 mpf. Porém, futuramente serão realizados estudos para avaliar a sobrevivência e viabilidade dos gametas dos peixes tetraploides.

4 REFERÊNCIAS

- Alves, A. C., G. S. Yasui, N. F. do Nascimento, P. S. Monzani, J. A. Senhorini and M. P. Dos Santos (2022). "All-triploid offspring in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski 2000 (Teleostei, Characidae) derived from female tetraploid× male diploid crosses." *Zygote*: 1-6.
- Arai, K. and T. Fujimoto (2018). "Chromosome manipulation techniques and applications to aquaculture." *Sex control in Aquaculture*: 137-162.
- Bobé, J. and C. Labbé (2010). "Egg and sperm quality in fish." *General and comparative endocrinology* **165**(3): 535-548.
- Butts, I. A. E., G. S. Hilmarisdóttir, V. Zadmajid, V. Gallego, J. G. Støttrup, C. Jacobsen, M. Krüger-Johnsen, S. N. Politis, J. F. Asturiano and L. K. Holst (2020). "Dietary amino acids impact sperm performance traits for a catadromous fish, *Anguilla anguilla* reared in captivity." *Aquaculture* **518**: 734602.
- Cheng, W., X. Yu, K. Yang, J. Tong, S. Zhu, Q. Wang, R. Xia, B. Li, B. Fu and G. Deng (2019). "Meiotic gynogenesis with heterologous sperm in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* and evidence for female homogamety." *Aquaculture Research* **50**(11): 3286-3294.
- Ciereszko, A., S. Judycka, J. Nynca, M. Słowińska and M. A. Dietrich (2020). "Factors influencing milt quality in fishes and its usefulness to cryopreservation." *Cryopreservation of fish gametes*: 25-67.
- do Nascimento, N. F., D. H. de Siqueira-Silva, M. Pereira-Santos, T. Fujimoto, J. A. Senhorini, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2017). "Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions." *Zygote* **25**(4): 537-544.
- do Nascimento, N. F., P. S. Monzani, M. Pereira-Santos, D. Niedzielski, J. A. Senhorini, L. A. Silva, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2020a). "The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism." *Aquaculture* **514**: 734432.
- do Nascimento, N. F., M. Pereira-Santos, N. Levy-Pereira, P. S. Monzani, D. Niedzielski, T. Fujimoto, J. A. Senhorini, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2020b). "High percentages of larval tetraploids in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* induced by heat-shock: The first case in Neotropical characins." *Aquaculture* **520**: 734938.
- Foresti, F., C. Oliveira and L. F. de Almeida-Toledo (1993). "A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine." *Experientia* **49**(9): 810-813.
- Fujimoto, T., S. Fujimoto, M. Murakami, E. Yamaha and K. Arai (2020). "Ploidy Manipulation Using Diploid Sperm of a Wild Tetraploid Ginbuna (Japanese Silver

Crucian Carp, *Carassius auratus langsdorfii*)." 北海道大学水産科学研究彙報 **70**(1): 103-111.

Fujimoto, T., S. Sakao, K. Oshima, E. Yamaha and K. Arai (2013). "Heat-shock-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic in pond loach, *Misgurnus anguillicaudatus*." Aquaculture international **21**(4): 769-781.

Garcia, S., B. C. Silva, G. S. Yasui, J. J. Bernardes Júnior, H. Amaral Júnior and E. Zaniboni Filho (2017). "Triploid induction in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) by double temperature shocking." Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research **45**(1).

Gil, H. W., H. J. Kong, C. M. An, B.-S. Kim, S.-G. Lim and I.-S. Park (2016). "Cytogenetic study of diploid and induced tetraploid in Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii*." SpringerPlus **5**(1): 1-10.

Haniffa, M. A., S. Sridhar and M. Nagarajan (2004). "Induction of triploidy and tetraploidy in stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using heat shock." Aquaculture research **35**(10): 937-942.

Iwersen, L. H. L., C. LAZOSKI, E. Zaniboni-FILHO and J. RIBOLLI (2019). "GENETIC IMPLICATIONS OF RESTOCKING PROGRAMS ON WILD POPULATIONS OF STREAKED PROCHILODUS" *Prochilodus lineatus*." Boletim do Instituto de Pesca **45**(3).

Lopera-Barrero, N., S. Santos, E. Goes, P. Castro, F. Souza, A. Poveda-Parra, J. Casseta, B. Pontillo and R. Ribeiro (2016). "Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia **68**: 1621-1628.

Lopera Barrero, N. M. (2007). "Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural."

Malison, J. A., J. A. Held, L. S. Weil, T. B. Kayes and G. H. Thorgaard (2001). "Manipulation of ploidy in walleyes by heat shock and hydrostatic pressure shock." North American Journal of Aquaculture **63**(1): 17-24.

Meng, Z., X. Liu, Y. Jia, B. Liu, Z. Yang and H. Zhang (2021). "Optimization of hydrostatic pressure, timing, and duration parameters for the induction of tetraploidy in turbot, *Scophthalmus maximus*." Aquaculture International **29**(6): 2575-2589.

Nomura, K., Y. Takeda, T. Unuma, K. Morishima, H. Tanaka, K. Arai and H. Ohta (2013). "Post-ovulatory oocyte aging induces spontaneous occurrence of polyploids and mosaics in artificial fertilization of Japanese eel, *Anguilla japonica*." Aquaculture **404**: 15-21.

Pan, Z. J., C. K. Zhu, H. Wang, G. L. Chang, H. Y. Ding, X. G. Qiang and X. S. Yu (2017). "Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety." Aquaculture Research **48**(11): 5659-5665.

- Rodriguez-Rodriguez, M. d. P., N. M. Lopera-Barrero, R. P. Ribeiro, J. A. Povh, L. Vargas, R. N. Sirol and C. B. Jacometo (2010). "Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites." Pesquisa Agropecuária Brasileira **45**: 56-63.
- Sakao, S., T. Fujimoto, S. Kimura, E. Yamaha and K. Arai (2006). "Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*." Aquaculture **252**(2-4): 147-160.
- Sakao, S., T. Fujimoto, M. Tanaka, E. Yamaha and K. Arai (2003). "Aberrant and arrested embryos from masu salmon eggs treated for tetraploidization by inhibition of the first cleavage." Nippon Suisan Gakkaishi **69**(5): 738-748.
- Sato, L., P. Jorge, V. Mastrochirico-Filho, M. Hata, S. Batlouni, R. Kuradomi, F. Porto-Foresti, F. Foresti and D. Hashimoto (2020). "Triploidy in tambaqui *Colossoma macropomum* identified by chromosomes of fish larvae." Journal of Aquaculture & Marine Biology **9**(3): 65-69.
- Schreck, C. B., W. Contreras-Sanchez and M. S. Fitzpatrick (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Reproductive biotechnology in Finfish aquaculture, Elsevier: 3-24.
- Waters, C. D., J. J. Hard, D. E. Fast, C. M. Knudsen, W. J. Bosch and K. A. Naish (2020). "Genomic and phenotypic effects of inbreeding across two different hatchery management regimes in Chinook salmon." Molecular Ecology **29**(4): 658-672.
- Xavier, P. L. P., J. A. Senhorini, M. Pereira-Santos, T. Fujimoto, E. Shimoda, L. A. Silva, S. A. Dos Santos and G. S. Yasui (2017). "A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*." Front Genet **8**: 131.
- Yasui, G. S., L. S. O. Nakaghi, P. S. Monzani, N. F. d. Nascimento, M. Pereira dos Santos, C. A. G. Goes, F. Porto-Foresti and J. A. Senhorini (2020). "Triploidization in the streaked prochilod *Prochilodus lineatus* inferred by flow cytometry, blood smears and karyological approaches." Journal of Applied Ichthyology **36**(3): 336-341.
- Yıldız, M., S. Ofori-Mensah, M. Arslan, G. Yamaner, A. Ekici, M. A. Baltacı, F. Korkmaz and Ş. Tacer-Tanas (2021). "Effects of different dietary lipid resources on sperm quality and reproductive success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)."
Aquaculture Research **52**(8): 3804-3814.
- Zhang, X., Onozato, H., 2004. Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one. *Aquaculture* **240**, 101–113.
- Zhang, Z., H. Yi, Y. Su, C. Huang, X. Wei, Q. Chen, J. Chen, H. Li, S. Bi and H. Lai (2023). "Hydrostatic pressure shock induced diploid/tetraploid mosaic in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), with the observation of embryo development and change in body spots." Aquaculture **563**: 738989.

Capítulo IV: Estocagem de sêmen e indução a ginogênese no curimatá (*Prochilodus lineatus*)

O quarto capítulo teve como objetivo estabelecer um protocolo eficaz de indução à ginogênese na espécie *Prochilodus lineatus* utilizando gametas homólogos. Para isso, foram realizados três experimentos: 1) Avaliação da melhor solução de estocagem de sêmen para a espécie; 2) Avaliação da fertilização de oócitos com sêmen diluído em diferentes soluções de estocagem; 3) Indução a ginogênese fertilizando oócitos com sêmen irradiado com luz UV em diferentes dosagens e choque térmico para reconstituição da ploidia.

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Peixes, localizado na Instituição anteriormente mencionada (CEPTA/ICMBio), na cidade de Pirassununga/SP, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do CEPTA (CEUA/Cepta, #10/2015) e SISBIO 31836-9.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Experimento 1: Avaliação da melhor solução de estocagem de sêmen de curimatá, *Prochilodus lineatus*

1.1.1 Coleta de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)

Para avaliação da melhor solução de estocagem de sêmen para a espécie *P. lineatus*, foram utilizados três machos provenientes do plantel existente no CEPTA/ICMBio. A seleção dos exemplares foi realizada no tanque de alvenaria (20 x

20 m) onde os mesmos são mantidos, identificando liberação de sêmen sob leve pressão abdominal e a emissão de sons reprodutivos. Posteriormente, os exemplares foram acondicionados em caixas d'água com capacidade para 1000L, com aeração constante e temperatura controlada de 26°C. A indução hormonal foi realizada com apenas uma dose com hipófise desidratada de carpa (HDC) na concentração de 5 mg kg⁻¹.

Após 8 horas, o sêmen foi coletado conforme descrito no *item 1.2* do Capítulo III e avaliado através de um microscópio (Nikon, Tokyo, Japão) com a finalidade de verificar se o sêmen ativo, contaminado por urina ou água, pois os espermatozoides no plasma seminal são imóveis. As amostras com bom volume, isenta de contaminação e com boas características de motilidade foram selecionadas para a próxima série de experimentos.

1.1.2 Ajuste da osmolaridade das soluções de estocagem

Para estocagem do sêmen de *P. lineatus* sem ativação da motilidade, inicialmente foram testadas concentrações de 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 e 1,4% de NaCl. Para isso, 5 µL de sêmen foram diluídos em 1.995 µL de cada solução (concentração de $7,3 \times 10^7$ espermatozoides) com diferentes concentrações de NaCl. Posteriormente, ao identificar que a concentração 1,2% de NaCl imobilizou 100% dos espermatozoides, a osmolaridade da solução foi medida utilizando-se um osmômetro PZL1000 (PZL, Londrina-PR, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante.

Após identificar a osmolaridade de 380 mOsm da solução de NaCl 1,2%, todas as soluções de estocagem que seriam testadas foram modificadas para ficarem com a mesma osmolaridade. Para isto, inicialmente foi medida a osmolaridade das soluções de estocagem e posteriormente foi acrescentado NaCl até atingir 380 mOsm. As soluções

de estocagem utilizadas foram: Cloreto de sódio (NaCl) a 1,2% (Sigma-Aldrich #SLCC8083, St. Louis, USA), Ringer (NaCl; KCl; CaCl₂; MgCl₂), D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (Sigma-Aldrich #SLCK6135, St. Louis, USA), MEM (Minimum Essential Medium) (Sigma-Aldrich #SLBW5132, St. Louis, USA) e RPMI (Gibco #61870036, Grand Island, USA). Com a osmolaridade de todas as soluções de estocagem ajustadas para 380 mOsm, 5 µL de sêmen foram diluídos em 1,995 µL de cada solução (Figura 1A).

1.1.3 Análise de motilidade e viabilidade do sêmen

As análises de motilidade e viabilidade espermática de todas as soluções de estocagem foram avaliadas a cada 6 horas durante 48 horas. Durante o experimento, as amostras foram mantidas em incubadora do tipo B.O.D. com temperatura ajustada para 2,5°C, sendo realizado em três repetições utilizando machos diferentes.

Para análise da motilidade, 1µL de sêmen foi colocado sobre uma lâmina, devidamente limpa e com albumina bovina sérica (BSA 0,1%) (INLAB Confiança #1870, São Paulo, Brasil), e posteriormente foi adicionado 19 µL de água destilada para ativação dos espermatozoides. Os vídeos foram gravados através de um microscópio (Nikon, Tokyo, Japão) com câmera acoplada CCD (Nikon DSRi2, Nikon, Tokyo, Japão) e software NIS-Ar Elements (Nikon, Tóquio, Japão), até finalizar a motilidade espermática. Os vídeos foram analisados utilizando o Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) no software ImageJ (National Institutes of Health, EUA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007) após a padronização para a espécie. Os parâmetros avaliados foram: motilidade (%), VCL (velocidade curvilínea), VDM (velocidade média de trajeto) e VSL (velocidade em linha reta). A análise de

motilidade foi avaliada entre 10 e 12 s após a ativação com análise de 1s. O comprimento da cabeça dos espermatozoides (μm) de cada macho ($n = 3$) também foi analisado no software image J.

Para a análise de viabilidade dos espermatozoides, foram utilizados os corantes fluorescentes SYBR-14 e iodeto de propídio (PI) (kit de viabilidade espermática vivo/morto; Eugene, OR, EUA). Para isto, foram utilizados 10 μL de sêmen de cada solução de estocagem e adicionados 0,3 μL de SYBR e 0,2 μL iodeto de propídio. Posteriormente, 10 μL de sêmen contendo os marcadores fluorescentes foram visualizados e fotografados utilizando-se um microscópio (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão) com câmera acoplada (Nikon DS Ri2, Nikon, Tóquio, Japão) (Figura 1A). O número de espermatozoides vivos foi contabilizado realizando-se a contagem dos espermatozoides vivos (EV) e espermatozoides mortos (EM). A porcentagens foi realizada seguindo a fórmula: $(EV)/(EV + EM) * 100 = EV\%$.

A concentração espermática foi realizada no início do experimento utilizando-se hemocitômetro. Para o cálculo, foram utilizadas amostras fixadas (Yasui, Arias-Rodriguez et al. 2008) na concentração de 5 μL de sêmen diluído em 1.995 μL de formol tamponado 4%. 10 μL de cada amostra fixada foi quantificada usando câmara de Neubauer e microscópio (Nikon-Eclipse Ni, Tóquio, Japão).

1.2 Experimento 2: Avaliação de fertilização de oócitos com sêmen diluído em diferentes em soluções.

Foram utilizados quatro casais da espécie *P. lineatus* provenientes do plantel existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (ICMBio/CEPTA), Pirassununga, São Paulo, Brasil (21°55'58" S, 47°22'31" O),

mantidos em tanques de alvenaria (20 x 20m). A seleção, indução hormonal dos reprodutores e a coleta dos gametas foram realizadas conforme descrito no *item 1.2* do Capítulo 3.

Para avaliação da capacidade de fertilização, novamente 5 μL de sêmen de cada macho foram diluídos em 1,995 μL de cada solução de estocagem (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM). Da massa de oócitos extrusados de fêmeas de *P. maculatus*, foram coletadas com auxílio de pipeta uma Eppendorf de 1000 μL (Eppendroff, Hamburg, Germany) seis alíquotas de 500 μL de oócitos (~600 oócitos), o que corresponde aos seis tratamentos testados. Para o primeiro tratamento (grupo controle), 5 μL de sêmen fresco foi utilizado para fertilização dos oócitos. Para os demais tratamentos, as alíquotas foram fertilizadas com 2 ml de sêmen diluído (concentração sempre padronizada em $7,3 \times 10^7$ espermatozoides/mL) nas diferentes soluções de estocagem.

Os gametas foram ativados pela adição de 10 mL de água, sendo misturados por 1 min (tempo aproximado da motilidade espermática), posteriormente foram adicionados 50 mL de água para a hidratação dos ovos. Em seguida, cada tratamento foi transferido para incubadoras flutuantes de 100 mm de diâmetro e alocadas em aquários de 60 L de água com constante recirculação e oxigenação e temperatura controlada (26°C).

Para o cálculo das porcentagens de fertilização e sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário até a eclosão e de larvas normais e anormais resultantes de todos os tratamentos experimentais, os procedimentos foram os mesmos descritos no *item 1.4* do Capítulo III (Figura 1B). Foram realizadas quatro repetições do presente experimento com diferentes reprodutores.

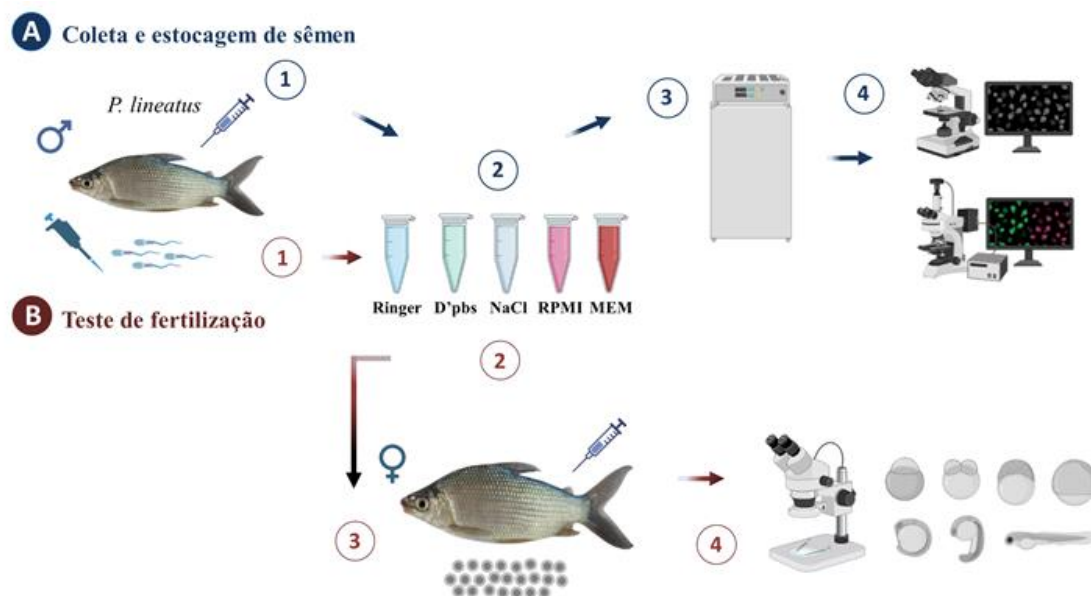


Figura 1. A) Desenho esquemático das etapas de coleta e estocagem de sêmen de *Prochilodus lineatus* em diferentes soluções. **A1)** Indução hormonal realizada com dose única de hipófise desidratada de carpa (HDC) na concentração de 5 mg kg^{-1} e coleta de sêmen com auxílio micropipeta de $1000 \text{ }\mu\text{L}$. **A2)** Utilizando uma micropipeta, $5 \text{ }\mu\text{L}$ de sêmen foi diluído em $1.995 \text{ }\mu\text{L}$ em cada uma das cinco soluções de estocagem (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM). **A3)** As amostras foram armazenadas em incubadoras BOD a $2,5^\circ\text{C}$ durante 48 horas. **A4)** A análise da motilidade e viabilidade espermática das soluções testadas foi realizada a cada 6 horas. **B)** Desenho esquemático das etapas de avaliação da capacidade de fertilização do sêmen de *P. lineatus* diluído em diferentes soluções de estocagem. **B1 e B2)** Indução hormonal, coleta de sêmen e diluição em diferentes soluções conforme descrito nos itens A1 e A2. **B3)** Indução hormonal das fêmeas realizada em duas doses de HDC, na concentração de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e 5 mg kg^{-1} , coleta dos oócitos e fertilização dos seis tratamentos testados, sendo um controle, fertilizado com sêmen puro e fresco e os outros cinco com sêmen diluídos nas soluções de estocagem. **B4)** As porcentagens de fertilização e sobrevivência dos tratamentos testados foram avaliadas através de estereomicroscópio nas fases de 2 células, blástula, gástrula, somito e eclosão.

1.3 Experimento 3: Indução a ginogênese

Foram utilizados quatro casais da espécie *P. lineatus* provenientes do Rio Mogi Guaçu e mantidos em tanques de alvenaria ($20 \times 20 \text{ m}$) no CEPTA/ICMBio. A seleção e indução hormonal dos reprodutores foram realizadas conforme descrito no item 1.2 do Capítulo 3.

Para indução à ginogênese, os gametas foram coletados separadamente. Primeiramente foi coletado o sêmen e 5 μL foi adicionado em cinco microtubos de 2 ml contendo 1.995 μL de solução de Ringer modificada (380 mOsm) para imobilização dos espermatozoides. Uma amostra foi mantida intacta (controle) e as demais foram irradiadas com luz UV (254 nm) nas intensidades de 30, 60, 90 e 120 mJ/cm^2 (Figura 1A). Para cada dose de radiação, a massa de oócitos foi dividida em dois grupos, totalizando oito tratamentos e controle, sendo então submetidas aos seguintes tratamentos: 1) Oócitos fertilizados com sêmen irradiado (grupo haploide) (Figura 1B) e 2) Oócitos fertilizados com sêmen irradiado e submetido a choque de temperatura (2 min após fertilização, durante 2 min, 40°C (Yasui, Nakaghi et al. 2020) (Figura 1C) dando origem a uma prole de ginogenéticos diploides (Figura 1D). No grupo controle, os oócitos foram fertilizados com sêmen não irradiado. Os procedimentos acima foram realizados separadamente utilizando diferentes reprodutores, resultando em quatro repetições.

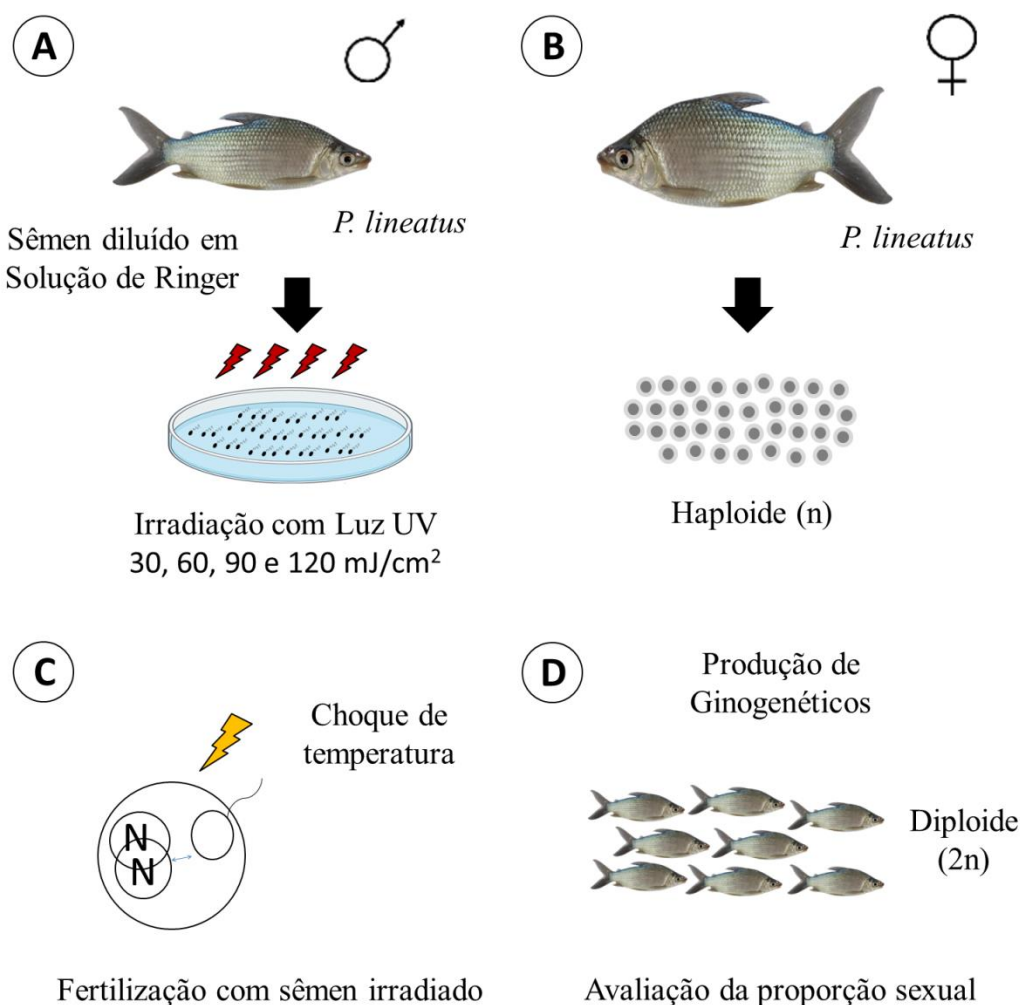


Figura 2. Desenho esquemático das etapas de produção de peixes ginogenéticos. Espermatozoides de *Prochilodus lineatus* irradiados a 30, 60, 90 e 120 mJ/cm² (A) são utilizados para fertilizar oócitos da mesma espécie (B), seguido pelo choque de temperatura para inibir a liberação do segundo corpúsculo polar (C) e produção de prole ginogenética 2n (D).

1.3.1 Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia através de citometria de fluxo e citogenética

Foram calculadas a sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário até a eclosão e de larvas normais e anormais resultantes de todos os tratamentos experimentais. Para isso, os procedimentos foram os mesmos descritos no item 1.4 do Capítulo III.

A análise em citometria de fluxo foi realizada utilizando larvas recém-eclodidas, para identificar o melhor tratamento de indução à ginogênese. Para isso, foram capturadas aleatoriamente até quinze exemplares de cada tratamento e os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo publicado por (Xavier, Senhorini et al. 2017), conforme descrito no item 1.4 do Capítulo I.

A citogenética foi realizada em larvas recém eclodidas seguindo o protocolo descrito por (Foresti, Oliveira et al. 1993, Sato, Jorge et al. 2020) conforme descrito no item 1.5 do Capítulo I.

1.3.2 Confirmação da ginogênese por genotipagem

A confirmação da paternidade (herança materna para ginogenéticos) foi realizada através de genotipagem. Após a coleta de gametas (ovócitos e sêmen), uma pequena amostra de nadadeira foi coletada dos parentais, devidamente identificada e congelada a -80°C até extração do DNA genômico. Para os descendentes dos tratamentos para indução da ginogênese na espécie *P. lineatus*, foram coletadas dez larvas recém eclodidas do grupo controle e dos tratamentos fertilizados com sêmen irradiado a 30 e 60 mJ/cm^2 . Um total de 30 amostras foram devidamente identificadas e congeladas a -80°C até a extração do DNA.

As amostras foram processadas no Laboratório de Genética de Peixes, da UNESP Bauru. Para a extração de DNA do material coletado foi utilizando o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (PROMEGA #A1120, Madison, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA presente nas amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%

corado com corante fluorescente GelRed TM 1X (Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia).

1.3.3 Amplificação dos loci através do PCR

Para confirmação de paternidade foram utilizados seis primers de microsatélites descritos por (Rueda, Sommer et al. 2011) para o curimatá (*P. lineatus*) (Tabela 1). Inicialmente, a amplificação dos primers de microsatélite foi realizada utilizando o sistema de amplificações multiplex, levando em consideração a temperatura de anelamento e o tamanho de cada primer (pb).

As reações em sistema multiplex foram realizadas contendo as seguintes condições: 1X Kit Qiagen Promega, 2 mM mix de primers, 30 ng de DNA com volume final de 15 µL. As reações foram realizadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf), inicialmente a reação foi submetida a uma desnaturação inicial de 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos que inclui desnaturação a 94°C por 30s, etapa de hibridação variando entre 52°C a 62°C por 1min e 30 s, desnaturação a 72°C por 1 min e extensão final a 60°C por 30 min.

As amplificações feitas em reações padrão foram realizadas basicamente em um volume total de 15 µl contendo as seguintes concentrações 1X Buffer, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada primer, 0,1U de Taq. Estas reações foram realizadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf). As condições foram desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturação a 94°C por 45 s, um período de hibridação variando entre 52°C a 62°C e uma desnaturação a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos, para os loci feitos em reações padrão.

Após conhecer características de cada *locus*, foi feita sistemas de sequenciamento em conjunto, levando em consideração o tamanho (pb) para cada *locus*. Seguindo as características de cada primer, cada um teve seu primer Reverse (R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PET, FAM e VIC (Tabela 2). A fluorescência para cada primer foi desenhada de forma que os loci de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo. As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) e analisados no software GeneMapper versão 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 1. Primers de microssatélite utilizados para amplificação DNA do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e posteriormente confirmação da indução a ginogênese na espécie por genotipagem.

Loci	Sequência do primer (5' - 3')	Tamanho (pb)	Ta (°C)
PL3	F: 5' -TCTGAGCTGTGAGGAATGGA-3' R: 5'-AGAGCGCTCAAGCACAAGAT-3'	185-203	50
PL14	F:5'-TGCCCAACACTGAAACTGAG-3' R: 5'-CTCATCAACCTGCCTGGAAT-3'	104-134	61
PL34	F: 5' -GAGCGGATTCTCCACATGAT-3' R: 5' -TAATGTGCTCCCTCCCACAG-3'	178-212	56
PL64	F:5'-AGAGCAACACAGGGAGGAGT-3' R: 5'-ACGCTCTGCTCAGCCATACT-3'	158-180	62
PL139	F:5'-CAGTGGCATGATGAT TAGATGG-3' R: 5'-CACCTTTTGTGTTGGCTTTTAGG-3'	169-235	53
PL190	F: 5'-GCTTGGGAGCCTATTCATCC-3' R: 5'-GGGTTTCTGCACCATACAGG-3'	197-227	62

Tabela 2. Fluorocromos utilizados para marcação dos primers do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) para confirmação de paternidade dos tratamentos de indução à ginogênese.

Loci	Tamanho (pb)	Ta (°C)	Fluorocromo	Multiplex
------	--------------	---------	-------------	-----------

PL3	185-203	50	FAM	2
PL14	104-134	61	FAM	1
PL34	178-212	56	VIC	2
PL64	158-180	62	VIC	1
PL139	169-235	53	FAM	3
PL190	197-227	62	PET	1

1.4 Análise estatística

Os dados são mostrados como média $\pm$ EP. Em relação ao número de repetições realizadas, os valores estão descritos na metodologia de cada etapa do experimento, todas com diferentes fontes de gametas. Os dados foram verificados quanto à normalidade com o teste Liliefors e em seguida comparados entre si por teste ANOVA, seguido de teste Tukey ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 10 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

2 RESULTADOS

2.1 Experimento 1: Avaliação da melhor solução de estocagem de sêmen de curimatá, *Prochilodus lineatus*

Imediatamente após a diluição de 5 μ L de sêmen de *P. lineatus* em 1.995 μ L das soluções de estocagem testadas (Ringer, D-pbs, NaCl, RPMI e MEM), foi realizada a primeira análise (0 horas) dos parâmetros avaliados. As soluções apresentaram motilidade acima de 60%, com exceção da solução de D-PBS que apresentou resultado significativamente diferente ($P = 0,0030$), atingindo menos de 50% de motilidade

(Figura 3A), sendo possível visualizar uma motilidade espermática lenta no início da ativação dos espermatozoides. Em relação à viabilidade espermática, a maior porcentagem foi observada na solução de RPMI (93,21%) (Figura 3B), significativamente diferente quando comparado com os resultados das demais soluções testadas ($P = 0,0161$).

As análises realizadas após 12 horas de estocagem, mostraram as soluções atingindo até 50% de motilidade espermática, sendo a solução de NaCl a mais baixa (5,03%) e diferente significativamente ($P = 0,0199$) das demais soluções testadas (Figura 3A). Enquanto a viabilidade espermática, foi observada diferença significativa ($P = 0,0022$), sendo a solução de NaCl com valores mais baixos (53,06%) (Figura 3B).

Após 24 horas de estocagem, todas as soluções apresentaram menos de 30% de motilidade espermática, onde as soluções de NaCl e MEM apresentaram as motilidades significativamente mais baixas ($P = 0,0052$), com 3,83 e 9,31%, respectivamente (Figura 3A). Ao mesmo tempo, foi observada menor viabilidade espermática nas soluções de NaCl e MEM, significativamente diferente ($P = 0,0005$) quando comparada com as demais soluções (Figura 3B).

As soluções de Ringer, RPMI e D-PBS mantiveram a motilidade espermática até às 48 horas de estocagem, no entanto, com baixos valores (14,69, 4,40 e 3,08%, respectivamente) (Figura 3A). Em relação à viabilidade, foi observada diferença significativa ($P = 0,0001$), sendo a solução de Ringer a que apresentou os maiores valores a (69,38%) (Figura 3B). As soluções de NaCl e MEM mantiveram a motilidade espermática somente até 30 e 36 horas de estocagem, respectivamente (Figura 3A).

Em relação aos parâmetros de velocidades (VCL, VDM e VSL), as soluções de Ringer, RPMI, MEM e NaCl apresentaram, no início da estocagem, velocidades mais altas (Figura 4A-C), quando comparadas ($P = 0,0339$) com valores observados na

solução de D-PBS. Todas as velocidades diminuíram com o decorrer do tempo de estocagem, observando-se diferença significativa quase sempre em cada uma delas (Figura 4A-C).

2.2 Experimento 2: Fertilização de oócitos com sêmen diluído em diferentes em soluções.

Os dados de desenvolvimento embrionário dos tratamentos onde a fertilização de oócitos com sêmen de *P. lineatus* diluído em diferentes soluções foram testados, estão descritos na Tabela 3. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos nos estágio de oócitos não fertilizados ($P = 0,0000$), 2-células ($P = 0,0000$), blástula ($P = 0,0000$), gástrula ($P = 0,0000$), somito ($P = 0,0000$) e eclosão ($P = 0,0000$).

O controle apresentou porcentagens de fertilização ($90,6 \pm 3,2\%$) e sobrevivência mais altas em todos os estágios avaliados até atingir a eclosão ($79,9 \pm 4,2\%$). Para os testes realizados com sêmen de *P. lineatus* diluído, as soluções de Ringer, MEM e RPMI apresentaram porcentagens mais altas de fertilização ($82,9 \pm 3,5$, $69,1 \pm 11,6$ e $58,5 \pm 7,9\%$) e eclosão ($75,3 \pm 4,7$, $61,3 \pm 12,0$ e $44,6 \pm 2,2\%$), enquanto nas soluções de NaCl e D-pbs, porcentagens mais baixas nos mesmos estágios foram observadas ($31,1 \pm 8,1$ e $11,3 \pm 5,7\%$) e ($26,2 \pm 7,2$ e $8,8 \pm 5,8\%$), respectivamente. Não foi observada diferença significativa para larvas normais ($P = 0,4714$) e anormais ($P = 0,4714$) resultantes dos tratamentos testados.

2.3 Experimento 3: Indução a ginogênese fertilizando oócitos com sêmen irradiado com luz UV em diferentes dosagens e choque térmico para reconstituição da ploidia.

2.3.1 Desenvolvimento embrionário, sobrevivência e avaliação da ploidia

Os dados de desenvolvimento embrionário dos tratamentos testados para indução da ginogênese em curimatá (*Prochilodus lineatus*) estão descritos na Tabela 4. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos em todos os estágios de desenvolvimento, oócitos não fertilizados ($P = 0,0001$), 2-células ($P = 0,0001$), blástula ($P = 0,0004$), gástrula ($P = 0,0004$), somito ($P = 0,0003$) e eclosão ($P = 0,0000$).

O grupo controle apresentou maior sobrevivência em todos os estágios de desenvolvimento, resultando em $74,7 \pm 5,7\%$ de eclosão. Juntamente com o aumento do tempo de irradiação dos espermatozoides, foi observada uma queda na porcentagem da eclosão dos tratamentos 30 mJ/cm^2 ($40,4 \pm 2,8\%$), 60 mJ/cm^2 ($35,2 \pm 2,4\%$), 90 mJ/cm^2 ($14,8 \pm 5,5\%$) e 120 mJ/cm^2 ($9,7 \pm 1,6\%$). A maior porcentagem de sobrevivência de larvas normais também foi observada no grupo controle ($85,2 \pm 2,1\%$), quando comparado aos tratamentos para indução de ginogenéticos, porém sem diferença significativa. A porcentagem de larvas normais diminui juntamente com o aumento do tempo de irradiação dos espermatozoides: 30 mJ/cm^2 ($57,0 \pm 8,0\%$), 60 mJ/cm^2 ($56,8 \pm 2,9\%$), 90 mJ/cm^2 ($45,3 \pm 8,4\%$) e 120 mJ/cm^2 ($34,2 \pm 16,8\%$). Para larvas anormais, não houve diferença entre os tratamentos ($P = 0,2165$).

Para avaliação dos tempos de irradiação para inativação dos espermatozoides, oócitos foram fertilizados com sêmen irradiado nas doses de 30, 60, 90 e 120 mJ/cm^2 , porém sem aplicação de choque de temperatura para reconstituição da diploidia. Os dados de desenvolvimento embrionário dos tratamentos potencialmente haploides estão descritos na Tabela 5.

Foi observada diferença significativa em todos estágios de desenvolvimento, oócitos não fertilizados ($P = 0,0000$), 2-células ($P = 0,0000$), blástula ($P = 0,0000$), gástrula ($P = 0,0000$), somito ($P = 0,0000$), eclosão ($P = 0,0000$) larvas normais ($P = 0,0000$) e larvas anormais ($P = 0,0000$), dos tratamentos quando comparados o controle. Maiores porcentagens de sobrevivência foram observadas em todos os estágios de desenvolvimento do grupo controle, resultando em $74,7 \pm 5,7\%$ de eclosão. Nos demais tratamentos, a eclosão observada foi: 30 mJ/cm^2 ($9,1 \pm 5,0\%$), 60 mJ/cm^2 ($16,9 \pm 4,5\%$), 90 mJ/cm^2 ($9,3 \pm 1,7\%$) e 120 mJ/cm^2 ($9,3 \pm 1,7\%$). No entanto, os tratamentos 30, 60, 90 e 120 mJ/cm^2 não apresentaram descendência de larvas normais, sendo 100% anormais (Tabela 5).

2.3.2 Avaliação da ploidia através de citometria de fluxo e citogenética

Para análise de citometria de fluxo, o conteúdo relativo de DNA dos grupos (controle, ginogenéticos e haploide), foram comparados com o do sêmen de lambari do rabo amarelo, *Astyanax altiparanae* (utilizado como controle haploide).

Os resultados mostraram que todos os descendentes avaliados dos tratamentos fertilizados com sêmen irradiado a 60, 90 e 120 mJ/cm^2 , sem aplicação do choque de temperatura, eram haploides (Figura 5A), com exceção da dose 30 mJ/cm^2 , que apresentou uma baixa quantidade de indivíduos diploides.

O conteúdo relativo de DNA do grupo controle (Figura 5B) foi semelhante ao observado nos indivíduos resultantes dos tratamentos para indução a ginogênese (Figura 5C) fertilizados com sêmen irradiado a 60, 90 e 120 mJ/cm^2 e submetidos a choque de temperatura para restauração do estado diploide. Larvas aneuploides foram observadas tratamento irradiado com 30 mJ/cm^2 .

Os resultados da citogenética mostraram indivíduos dos grupos controle e ginogenéticos com 56 cromossomos (Figura 6A-B) e indivíduos do grupo haploide com 28 cromossomos (Figura 6C).

2.3.3 Confirmação da ginogênese por genotipagem

A confirmação da ginogênese por genotipagem foi realizada em dez amostras de cada grupo, sendo eles o controle, e o sêmen irradiado a 30 e a 60 mJ/cm². No grupo controle, nove amostras atribuíram maternidade e sete paternidade (Figura 7B). No tratamento de 30 mJ/cm², oito amostras apresentaram herança materna e duas paterna (Figura 7A-B), obtendo, portanto, 80% de larvas ginogenéticas. No tratamento 60 mJ/cm², todas as amostras analisadas apresentaram herança exclusivamente materna, obtendo, portanto, larvas 100% ginogenéticas (Figura 7A).

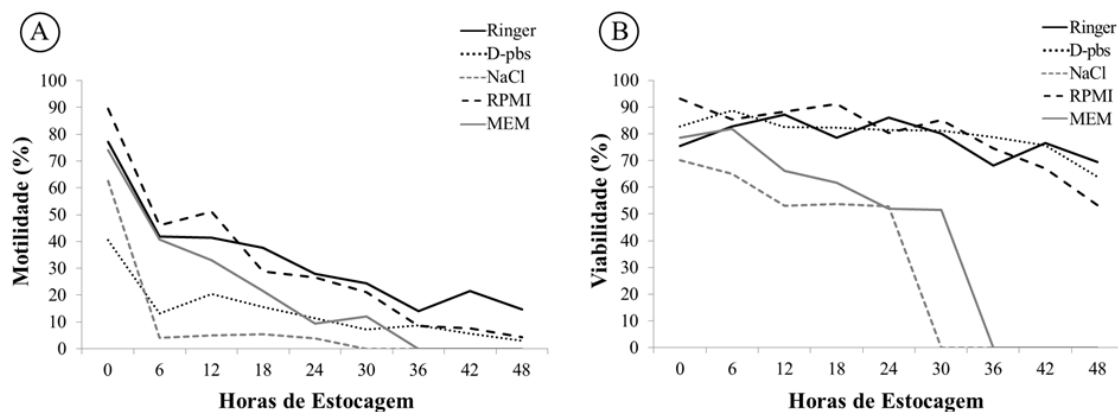


Figura 3. Avaliação da motilidade (A) e viabilidade (B) espermática de *Prochilodus lineatus* após armazenamento refrigerado. Amostras de 5 µL de sêmen foram diluídas em 1.995 µL de cinco diferentes soluções (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM) e armazenadas a 2,5°C durante 48 horas. Os parâmetros foram medidos a cada 6 horas. As porcentagens resultam de três repetições, cada uma utilizando sêmen de machos diferentes.

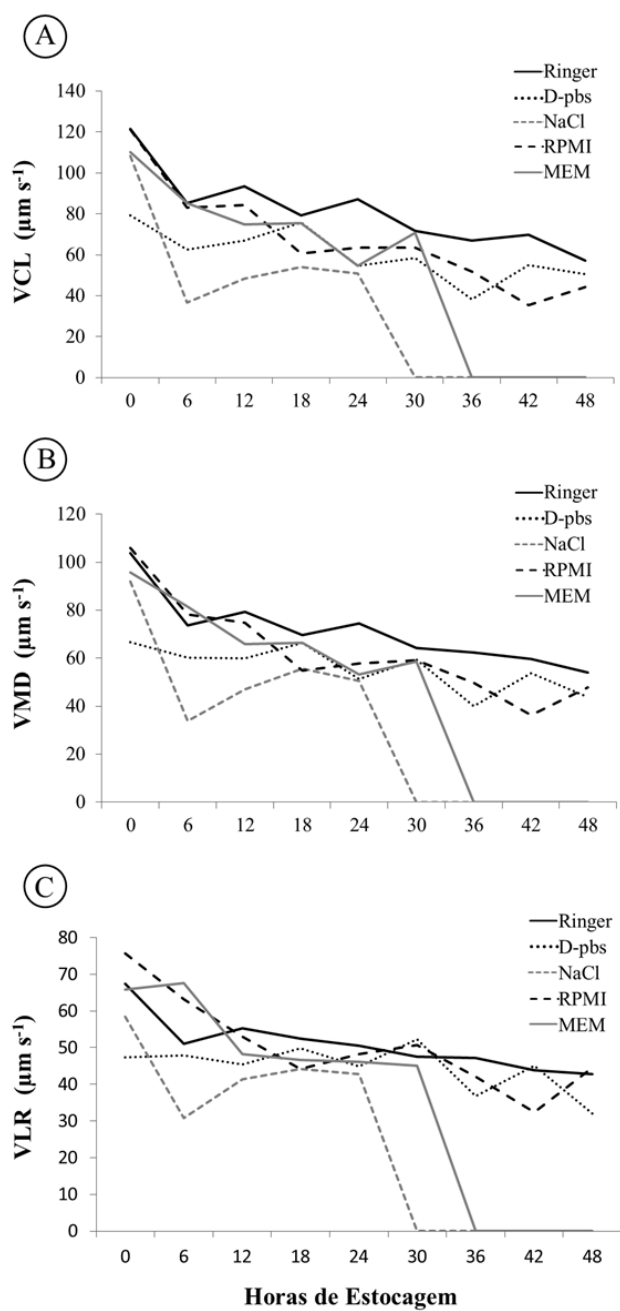


Figura 4. Avaliação dos parâmetros de VCL (velocidade curvilínea) (A), VMD (velocidade média de trajeto) (B) e VLR (velocidade em linha reta) (C) dos espermatozoides de *Prochilodus lineatus* após armazenamento refrigerado. Amostras de 5 μL de sêmen foram diluídas em 1.995 μL de cinco diferentes soluções (Ringer, D-PBS, NaCl, RPMI e MEM) e armazenadas a 2,5°C durante 48 horas. Os parâmetros foram avaliados a cada 6 horas. As porcentagens resultam de três repetições, cada uma utilizando sêmen de machos diferentes.

Tabela 3. Desenvolvimento e sobrevivência de Curimbatá, *Prochilodus lineatus*, após fertilização com sêmen diluído em diferentes em soluções de estocagem¹.

Tratamentos	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle (Sêmen fresco)	9,4 ± 3,2 ^a	90,6 ± 3,2 ^a	89,6 ± 3,0 ^a	88,9 ± 3,1 ^a	87,9 ± 2,9 ^a	79,9 ± 4,2 ^a	89,9 ± 3,0	10,1 ± 3,0	524
Ringer	17,1 ± 3,5 ^{ab}	82,9 ± 3,5 ^{ab}	81,9 ± 3,9 ^{ab}	80,0 ± 3,7 ^{ab}	78,6 ± 3,8 ^{ab}	75,3 ± 4,7 ^a	88,1 ± 3,6	11,9 ± 3,0	512
NaCl	68,9 ± 8,1 ^{cd}	31,1 ± 8,1 ^{cd}	30,5 ± 7,7 ^{cd}	30,0 ± 7,7 ^{cd}	28,5 ± 7,3 ^{cd}	26,2 ± 7,2 ^{cd}	82,5 ± 8,0	17,5 ± 8,0	502
D'PBS	88,7 ± 5,7 ^d	11,3 ± 5,7 ^c	10,9 ± 5,7 ^c	10,3 ± 5,7 ^c	9,9 ± 5,5 ^c	8,8 ± 5,8 ^b	92,8 ± 6,3	7,2 ± 6,3	520
MEM	30,8 ± 11,6 ^{ab}	69,1 ± 11,6 ^{ab}	67,4 ± 11,3 ^{ab}	65,9 ± 10,9 ^{ab}	64,2 ± 10,8 ^{ab}	61,3 ± 12,0 ^{ad}	90,9 ± 1,4	9,1 ± 1,4	522
RPMI	41,5 ± 7,9 ^{bc}	58,5 ± 7,9 ^b	57,7 ± 8,1 ^{bd}	55,8 ± 8,5 ^{bd}	53,8 ± 8,5 ^{bd}	44,6 ± 2,2 ^{cd}	84,3 ± 7,4	15,7 ± 7,4	522
P - valor	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4714	0,4714	

¹ Ovócitos *Prochilodus lineatus* recém-fertilizados com 5 µL de sêmen diluídos em 1,995 µL de cinco diferentes soluções de estocagem (Ringer, D-pbs, NaCl, RPMI e MEM). O grupo de controle indica fertilização com 5 µL sêmen fresco. Durante o desenvolvimento embrionário, os ovos foram incubados a 26°C. As porcentagens e o número de ovos resultam de repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$).

Tabela 4. Desenvolvimento e sobrevivência de Curimbatá, *Prochilodus lineatus*, após tratamento com choque térmico para indução da ginogênese¹.

Tratamentos	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle	8,9 ± 5,6 ^a	91,1 ± 5,6 ^a	90,6 ± 5,1 ^a	90,2 ± 5,3 ^a	87,4 ± 7,4 ^a	74,7 ± 5,7 ^a	85,2 ± 2,1	14,8 ± 2,1	533
30' 2n	25,6 ± 5,4 ^a	74,4 ± 5,4 ^a	70,6 ± 5,4 ^{ab}	66,8 ± 7,3 ^{ab}	56,3 ± 4,8 ^a	40,4 ± 2,8 ^a	57,0 ± 8,0	42,7 ± 8,3	524
60' 2n	35,8 ± 5,8 ^a	64,2 ± 6,3 ^a	60,6 ± 7,1 ^{ab}	59,1 ± 6,8 ^{ab}	52,6 ± 7,2 ^a	35,2 ± 2,4 ^a	56,8 ± 2,9	43,2 ± 2,9	529
90' 2n	64,2 ± 7,5 ^b	35,8 ± 7,5 ^b	34,2 ± 8,0 ^{bc}	32,4 ± 7,5 ^{bc}	26,6 ± 6,4 ^b	14,8 ± 5,5 ^b	45,3 ± 8,4	54,7 ± 8,4	523
120' 2n	74,0 ± 8,0 ^b	26,0 ± 8,0 ^b	25,1 ± 8,0 ^c	23,5 ± 7,6 ^c	19,8 ± 5,6 ^b	9,7 ± 1,6 ^b	34,2 ± 16,8	65,8 ± 16,8	510
P - valor	0,0001	0,0001	0,0004	0,0004	0,0003	0,0000	0,2176	0,2165	

¹ Ovócitos *Prochilodus lineatus* recém-fertilizados com sêmen irradiado com luz UV (254 nm) nas intensidades de 30, 60, 90 e 120 mJ/cm² e diploidizado com choque de temperatura à 40° por 2 min. Após o tratamento, os ovos foram incubados a 26°C. As porcentagens e o número de ovos resultam de quatro repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$).

Tabela 5. Desenvolvimento e sobrevivência de Curimbatá, *Prochilodus lineatus*, após fertilização com sêmen irradiado com luz UV (254 nm) nas intensidades de 30, 60, 90 e 120 mJ/cm²¹.

Tratamentos	Não-fertilizados (%)	2-células (%)	Blástula (%)	Gástrula (%)	Somito (%)	Eclosão (%)	Normal (%)	Anormal (%)	Total de ovos
Controle	8,9 ± 5,6 ^a	91,1 ± 5,6 ^a	90,6 ± 5,1 ^a	90,2 ± 5,3 ^a	87,4 ± 7,4 ^a	74,7 ± 5,7 ^a	85,2 ± 2,1 ^a	14,8 ± 2,1 ^a	533
30' 1n	33,5 ± 5,2 ^b	66,5 ± 5,2 ^b	62,8 ± 6,1 ^b	52,7 ± 9,6 ^b	39,4 ± 10,5 ^b	9,1 ± 5,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^b	500
60' 1n	35,6 ± 2,2 ^b	64,4 ± 2,2 ^b	63,7 ± 2,7 ^b	61,7 ± 3,4 ^b	45,2 ± 6,8 ^b	16,9 ± 4,5 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^b	497
90' 1n	75,1 ± 7,0 ^c	24,9 ± 7,0 ^c	24,2 ± 7,0 ^c	22,7 ± 7,6 ^c	19,0 ± 7,0 ^{ab}	9,3 ± 1,7 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^b	460
120' 1n	81,7 ± 4,7 ^c	18,2 ± 4,7 ^c	16,8 ± 3,8 ^c	15,2 ± 4,4 ^c	10,7 ± 2,2 ^c	4,1 ± 2,3 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	100,0 ± 0,0 ^b	472
P - valor	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	

¹ Ovócitos *Prochilodus lineatus* recém-fertilizados com sêmen irradiado com luz UV (254 nm) nas intensidades de 30, 60, 90 e 120 mJ/cm² para inativação genética. O grupo de controle indica fertilização com sêmen intacto (sem tratamento). Durante o desenvolvimento embrionário, os ovos foram incubados a 26°C. As porcentagens e o número de ovos resultam de quatro repetições, cada uma usando diferentes fontes de gametas. Valores com distintas letras na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA; $P < 0,05$)

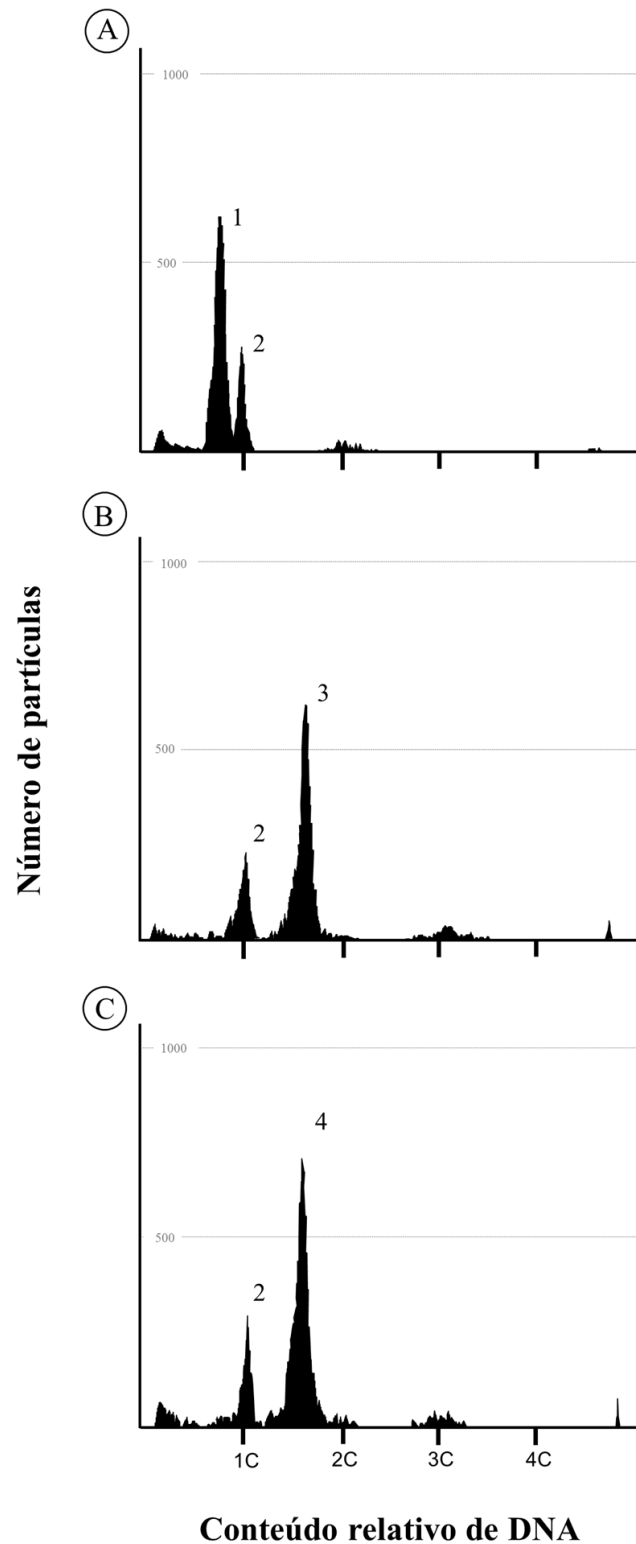


Figura 5. Histograma de citometria de fluxo mostrando o conteúdo relativo de DNA de uma larva recém-eclodidas de *Prochilodus lineatus* do grupo haploide (A), do grupo controle diploide (B) e do grupo ginogenéticos (C). 1: grupo haploide. 2: espermatozoide (haploide) de *Astyanax altiparanae*. 3: grupo controle diploide. 4: grupo ginogenéticos diploide.

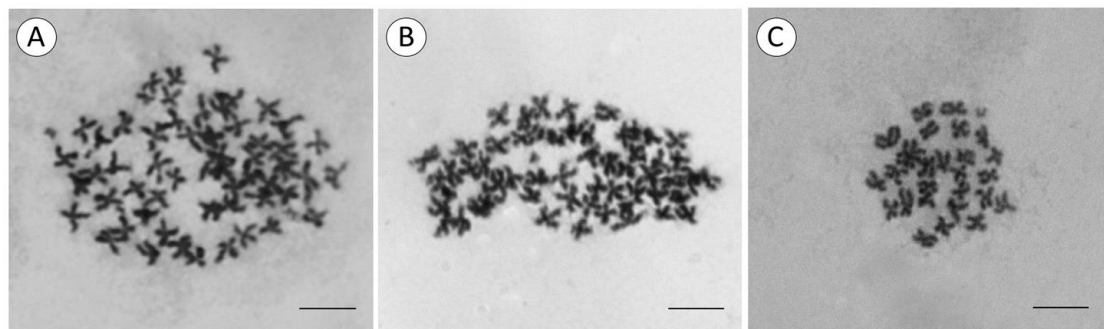


Figura 6. Cromossomos metafásicos de exemplares de espécie *Prochilodus lineatus*. **A.** Controle diploide com 54 cromossomos. **B.** Diploides ginogenéticos com 54 cromossomos. **C.** Haploides com 27 cromossomos. Escala: 10 µm.

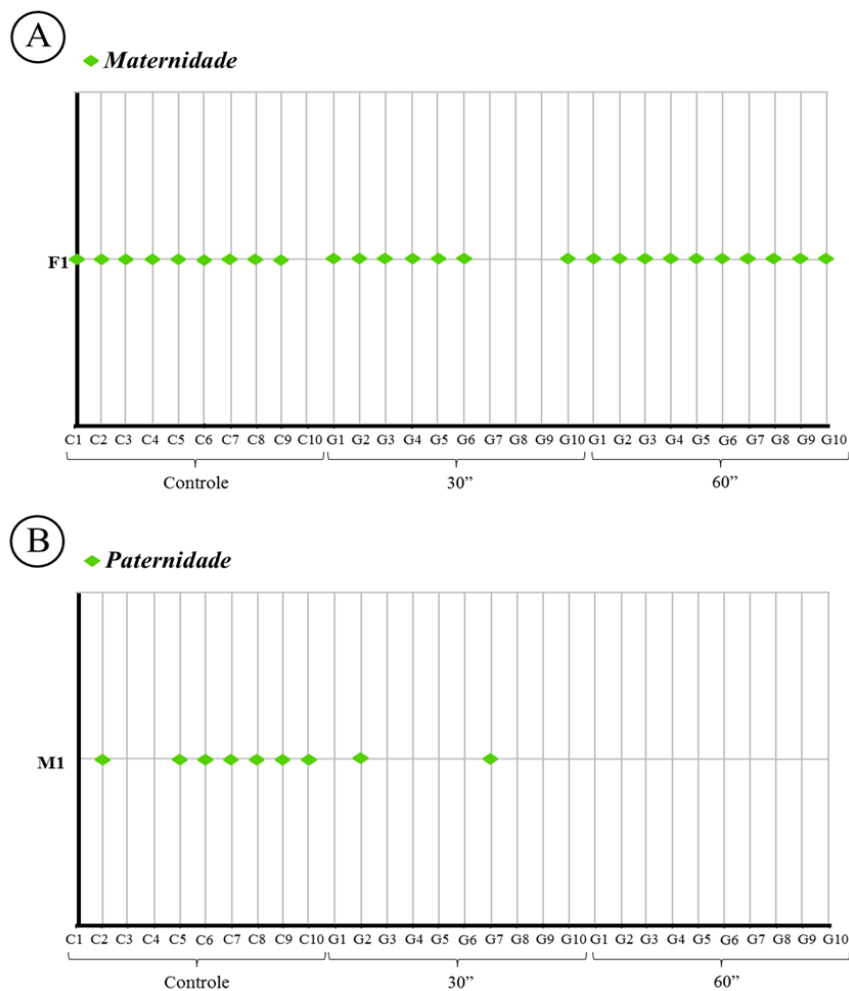


Figura 7. Confirmação de ginogênese do *Prochilodus lineatus* por genotipagem. No Grupo controle todas as amostras apresentaram herança materna **(A)** e sete herança paterna **(B)**. No tratamento de 30 mJ/cm², oito amostras apresentaram somente herança materna **(A)** e duas apresentaram herança paterna **(B)**. As amostras do tratamento 60 mJ/cm² apresentaram somente herança materna **(A)**. C: controle e G: Ginogenético.

3 DISCUSSÃO

As soluções de RPMI, Ringer e MEM apresentaram melhor motilidade e velocidade curvo linear (VCL) durante as primeiras 12 horas de estocagem. Porém, com 24 horas, a motilidade foi inferior a 30% em todas as soluções testadas e baixa ou nula com 48 horas. Estes resultados foram similares aos obtidos por (Viveiros, Taffarel et al. 2014), que utilizou as seguintes soluções: água de coco em pó® = ACP e Beltsville Thawing Solution® = BTS. Trabalhos de estocagem de sêmen de curimatá (*P. lineatus*) têm sido desenvolvidos, principalmente para estabelecer protocolos de criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) (Viveiros and Godinho 2009, Viveiros, Nascimento et al. 2010, Viveiros, Leal et al. 2016).

Os principais parâmetros avaliados durante uma análise de sêmen são: concentração, motilidade, viabilidade, potencial mitocondrial e integridade da estrutura da cromatina (Herráez, Ausió et al. 2017). Porém, a qualidade principal do espermatozoide sempre será definida por sua capacidade fecundante que, consequentemente, permitirá o desenvolvimento de um embrião normal (Bobe and Labbé 2010). Como a qualidade do espermatozoide pode ser altamente variável, a avaliação da qualidade dos gametas é um pré-requisito para os testes de fertilização (Bobe and Labbé 2010). De acordo com (Viveiros, Nascimento et al. 2010) e (Rurangwa, Kime et al. 2004) a velocidade curvo linear (VCL) está intimamente relacionada com a capacidade de fertilização do espermatozoide. Sendo assim, o objetivo do experimento 2 foi testar a capacidade de fertilização dos espermatozoides diluídos nas soluções de estocagem do experimento 1. Foi identificado que as soluções de Ringer, MEM e RPMI apresentaram a maior velocidade curvo linear (VCL) e também as maiores porcentagens de fertilização com $82,9 \pm 3,5\%$; $69,1 \pm 11,6\%$ e $58,5 \pm 7,9\%$, respectivamente.

Os resultados obtidos no experimento 1 e 2 foram essenciais para o estabelecimento de um protocolo de indução à ginogênese, pois, para a aplicação da técnica, a imobilização dos espermatozoides é fundamental, já que para inativação do DNA através de irradiação por luz UV é indispensável diluir o sêmen, garantindo que todos os espermatozoides sejam irradiados (Lebeda, Dzyuba et al. 2014, Arai and Fujimoto 2018). Sendo assim, a solução de Ringer foi utilizada para diluição de sêmen de curimatá (*P. lineatus*), pois esta solução permitiu uma alta motilidade com capacidade fecundante. Portanto, oócitos foram fertilizados com espermatozoides homólogos (da mesma espécie) irradiado com luz UV (254 nm) a 30, 60, 90 e 120 mJ/cm² e a ploidia foi reconstituída através de choque de temperatura (40°C, 2 min) 2 minutos pós-fertilização.

Raios UV podem impactar significativamente a motilidade espermática (Gallego and Asturiano 2019, do Nascimento, Monzani et al. 2020^a), o que pode afetar sua capacidade fecundante. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que quanto maior o tempo de irradiação mais baixa foi a fertilização nos tratamentos.

A eficiência da inativação do DNA dos espermatozoides foi confirmada através da identificação de proles haploides. Quando estão nesta condição, as larvas desenvolvem a chamada “síndrome haploide”, na qual apresentam diversas anormalidades e morrem durante o desenvolvimento embrionário, antes ou logo após a eclosão (Tvedt, Benfey et al. 2006, Pan, Zhu et al. 2017). A irradiação ultravioleta causa fragmentação do DNA dos espermatozoides (Dietrich, Szpyrka et al. 2005), fazendo com que não haja herança paterna para a prole. Os resultados obtidos através da citometria de fluxo mostraram que entre as dosagens avaliadas, indivíduos diploides foram observados quando sêmen foi irradiado a 30 mJ/cm² e aneuploides quando também submetidos ao choque de temperatura. Este dado sugere que esta dose foi

baixa, sendo inadequada para inativar totalmente o genoma paterno. Resultados similares foram observados no lambari do rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*) (do Nascimento, Monzani et al. 2020a). Tal resultado condiz com a análise molecular realizada, onde a ginogênese foi confirmada em 80% dos descendentes. Por outro lado, nos tratamentos de 60, 90 e 120 mJ/cm², somente larvas haploides foram encontradas quando fertilizados com sêmen irradiado e quando submetidos ao choque de temperatura, larvas diploides foram obtidas, o que confirma a eficácia da irradiação. Novamente, os resultados condizem com a análise molecular realizada nas larvas do tratamento de 60 mJ/cm², onde foi possível confirmar que a ginogênese foi 100% efetiva, com indivíduos com herança exclusivamente materna.

A indução a ginogênese utilizando espermatozoides homólogos têm sido realizada com sucesso em espécies como a farpa de prata (*Barbonymus gonionotus*) (Rahman, Sarder et al. 2021), o lambari (*Astyanax altiparanae*) (do Nascimento, Monzani et al. 2020a), o bagre (*Pseudobagrus ussuriensis*) (Pan, Zhu et al. 2017) e esturção (*Acipenser baerii*) (Lebeda, Dzyuba et al. 2014). Para cada espécie, o tempo ideal de irradiação do sêmen foi diferente, mostrando ser uma variável espécie-específica. Ademais, o uso de gametas homólogos pode ser vantajoso, pois propicia uma fertilização aparentemente maior do que quando gametas heterólogos são utilizados (Pan, Zhu et al. 2017). Entretanto, nem sempre é possível obter protocolos de irradiação 100% efetivos, devido à dificuldade de distinguir morfologicamente os descendentes normais dos ginogenéticos (Pan, Zhu et al. 2017).

Por fim, no presente trabalho, foi estabelecido um protocolo eficiente de imobilização de sêmen de curimatá *P. lineatus* em solução de Ringer a 380 mOsm e estocagem por 48 horas à 2,5 °C. A ginogênese foi obtida utilizando espermatozoides homólogos e irradiação com luz UV (254 nm) a 60 mJ/cm² e submetidos a choque de

temperatura de (40°C; 2 min) 2 minutos pós fertilização. Assim, o protocolo estabelecido poderá ser aplicado em futuros estudos para avaliar a determinação sexual da espécie *P. lineatus*, além disso, pode ser aplicada na geração de linhagens clonais para ciências básicas e aplicadas.

4 REFERÊNCIAS

- Arai, K. and T. Fujimoto (2018). "Chromosome manipulation techniques and applications to aquaculture." Sex control in Aquaculture: 137-162.
- Bobe, J. and C. Labbé (2010). "Egg and sperm quality in fish." General and comparative endocrinology **165**(3): 535-548.
- Dietrich, G., A. Szpyrka, M. Wojtczak, S. Dobosz, K. Goryczko and A. Ciereszko (2005). "Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa." Theriogenology **64**(8): 1809-1822.
- do Nascimento, N. F., P. S. Monzani, M. Pereira-Santos, D. Niedzielski, J. A. Senhorini, L. A. Silva, L. S. O. Nakaghi and G. S. Yasui (2020a). "The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism." Aquaculture **514**: 734432.
- Foresti, F., C. Oliveira and L. F. de Almeida-Toledo (1993). "A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine." Experientia **49**(9): 810-813.
- Gallego, V. and J. F. Asturiano (2019). "Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach." Reviews in Aquaculture **11**(3): 697-724.
- Herráez, M. P., J. Ausió, A. Devaux, S. González-Rojo, C. Fernández-Díez, S. Bony, N. Saperas and V. Robles (2017). "Paternal contribution to development: sperm genetic damage and repair in fish." Aquaculture **472**: 45-59.
- Lebeda, I., B. Dzyuba, M. Rodina and M. Flajshans (2014). "Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*." Aquaculture international **22**: 485-495.
- Pan, Z. J., C. K. Zhu, H. Wang, G. L. Chang, H. Y. Ding, X. G. Qiang and X. S. Yu (2017). "Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety." Aquaculture Research **48**(11): 5659-5665.
- Rahman, M. R., M. R. Sarder, A. A. Nishat, R. Islam and A. Kohinoor (2021). "Induction of meiotic and mitotic gynogenesis in silver barb (*Barbonymus gonionotus*) through cold shock treatment." Aquaculture International **29**: 2161-2179.
- Rueda, E. C., J. Sommer, P. Scarabotti, R. Markariani and G. Ortí (2011). "Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae)." Conservation Genetics Resources **3**: 681-684.

- Rurangwa, E., D. Kime, F. Ollevier and J. Nash (2004). "The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish." Aquaculture **234**(1-4): 1-28.
- Sato, L., P. Jorge, V. Mastrochirico-Filho, M. Hata, S. Batlouni, R. Kuradomi, F. Porto-Foresti, F. Foresti and D. Hashimoto (2020). "Triploidy in tambaqui *Colossoma macropomum* identified by chromosomes of fish larvae." Journal of Aquaculture & Marine Biology **9**(3): 65-69.
- Tvedt, H. B., T. J. Benfey, D. J. Martin-Robichaud, C. McGowan and M. Reith (2006). "Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)." Aquaculture **252**(2-4): 573-583.
- Viveiros, A., A. Nascimento, L. Orfão and Z. Isaú (2010). "Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water." Theriogenology **74**(4): 551-556.
- Viveiros, A., T. R. Taffarel and M. C. Leal (2014). "Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm." Neotropical Ichthyology **12**: 643-648.
- Viveiros, A. T., M. C. Leal, T. S. França, I. L. Almeida and Z. A. Isaú (2016). "Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently." Animal reproduction science **173**: 73-79.
- Viveiros, A. T. d. M. and H. P. Godinho (2009). "Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review." Fish Physiology and Biochemistry **35**: 137-150.
- Xavier, P. L. P., J. A. Senhorini, M. Pereira-Santos, T. Fujimoto, E. Shimoda, L. A. Silva, S. A. Dos Santos and G. S. Yasui (2017). "A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*." Front Genet **8**: 131.
- Yasui, G. S., L. Arias-Rodriguez, T. Fujimoto and K. Arai (2008). "Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice." CryoLetters **29**(5): 383-390.
- Yasui, G. S., L. S. O. Nakaghi, P. S. Monzani, N. F. d. Nascimento, M. Pereira dos Santos, C. A. G. Goes, F. Porto-Foresti and J. A. Senhorini (2020). "Triploidization in the streaked prochilod *Prochilodus lineatus* inferred by flow cytometry, blood smears and karyological approaches." Journal of Applied Ichthyology **36**(3): 336-341.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível estabelecer protocolos biotecnológicos promissores para a produção de triploides e lotes monossexuais em duas espécies, no mandi *Pimelodus maculatus* e no curimatá *Prochilodus lineatus*, ambas pertencentes às maiores ordens de peixes que se distribuem na região Neotropical. No mandi *P. maculatus*, os indivíduos tetraploides foram inviáveis, sendo tal procedimento até o momento, letal para a espécie. Portanto, novos estudos devem ser realizados para esclarecer a causa da mortalidade e buscar possíveis soluções para produção de descendentes tetraploides.

Para o curimatá *P. lineatus*, a indução a tetraploidização nos peixes provenientes de CEPTA/ICMBio (cativeiro) foi inviável, tornam-se necessários novos estudos para esclarecimento da inviabilidade. Contudo, com a aplicação da técnica em peixes proveniente do Rio Mogi Guaçu, (peixes selvagens), foi possível estabelecer um protocolo de tetraploidização na espécie, garantindo 72,0% de larvas tetraploides com o choque de temperatura aplicado 28 minutos pós-fertilização. Porém, realizar novos trabalhos para avaliar a sobrevivência e viabilidade dos gametas dos peixes tetraploides são necessários.

Para produção de lotes monossexuais através da ginogênese, foi obtido um protocolo eficiente no mandi *P. maculatus*, utilizando espermatozoides do lambari do rabo amarelo *A. altiparanae*. Esse procedimento é inédito na literatura, e o primeiro trabalho relatado de indução a ginogênese utilizando espermatozoides heterólogos para uma espécie da região neotropical. A aplicação do protocolo resultou em descendentes ginogenéticos com predominância de fêmeas, sugerindo um sistema de determinação do sexo XX-XY.

Diferente do procedimento realizado no mandi *P. maculatus*, para indução a ginogênese meiótica no curimatá *P. lineatus* foram utilizados espermatozoides homólogos. Portanto, foi indispensável o estabelecimento de um protocolo eficiente de imobilização de sêmen na espécie, assim como avaliação da fertilização dos espermatozoides imobilizados nas soluções testadas. Posteriormente, a indução a ginogênese foi realizada com sucesso utilizando espermatozoides irradiados com luz UV (254 nm) a 60 mJ/cm² e diploidização utilizando choque de temperatura de (40°C; 2 min), 2 minutos pós fertilização. Dessa forma, o protocolo estabelecido poderá ser aplicado em futuros trabalhos para avaliar a determinação sexual da espécie *P. lineatus*.

Finalmente, os protocolos aqui obtidos poderão servir como base para ser aplicados em outras espécies da região Neotropical e consequentemente contribuir para aumentar a produção de espécies de interesse comercial da região. Além disso, os protocolos de ginogênese obtidos poderão ser aplicados para geração de linhagens monosssexuais e clonais para ciências básicas e aplicadas.