

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO**

**Bioteχνologias Aplicadas a Reprodução de Peixes: Produção de  
Ginogenético Mitótico e Poliploides em *Astyanax altiparanae***

**Andreoli Correia Alves**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A REPRODUÇÃO DE PEIXES:  
PRODUÇÃO DE GINOGENÉTICO MITÓTICO E POLIPLOIDES EM**  
*Astyanax altiparanae*

**ANDREOLI CORREIA ALVES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Matheus Pereira dos Santos**

*Co-orientação dos professores*

**Dr. George Shigueki Yasui**

**Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração Zootecnia.

Seropédica, RJ

Agosto 2021

A474b      Alves, Andreoli Correia , 07/09/1992-  
              Biotecnologias Aplicadas a Reprodução de Peixes:  
Produção de Ginogenético Mitótico e Poliploides em  
Astyanax altiparanae / Andreoli Correia Alves. - Ji  
Paraná, 2021.  
              68 f.

              Orientador: Matheus Pereira dos Santos.  
              Coorientador: Nivaldo Ferreira do Nascimento.  
              Coorientador: George Shigueki Yasui.  
              Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal , 2021.

              1. Aquicultura. 2. Manipulação cromossômica . I. dos  
Santos, Matheus Pereira , 26/03/1989-, orient. II. do  
Nascimento, Nivaldo Ferreira , 30/06/1990-, coorient.  
III. Yasui, George Shigueki , 01/01/1979-, coorient.  
IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal . V. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de financiamento nº001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE  
JANEIRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ZOOTECNIA



TERMO Nº 80 / 2024 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.008764/2024-51

Seropédica-RJ, 23 de fevereiro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DORIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANDREOLI CORREIA ALVES

**Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Zootecnia.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/07/2021

**Matheus Pereira dos Santos. Dr. UFRRJ  
(Presidente)**

Marina Mortati Dias Barbero. Dr.<sup>a</sup> UFRRJ

Yara Aiko Tabata. Dr.<sup>a</sup> APTA

*(Assinado digitalmente em 23/02/2024 13:21 )*  
MARINA MORTATI DIAS BARBERO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR DeptG  
(12.28.01.00.00.00.50)  
Matrícula: 1051901

*(Assinado digitalmente em 26/02/2024 14:12 )*  
MATHEUS PEREIRA DOS SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DPA (12.28.01.00.00.00.63)  
Matrícula: 3067308

*(Assinado digitalmente em 28/02/2024 15:10 )*  
YARA AIKO TABATA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 621.263.428-91

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a força que me guia, a Deus pai da criação e o mestre e a rainha por me guiarem com toda a sabedoria e contribuírem para minha evolução física e espiritual.*

*A toda minha família, em especial aos meus pais Etelvina e Francisco, minhas irmãs, Franciele e Patricia e aos meus sobrinhos, Emanuela, Ana Júlia e João Vitor, por acreditarem no meu propósito, por todo amor e dedicação.*

*Ao meu orientador, Matheus Pereira dos Santos e coorientadores George Shigueki Yasui e Nivaldo Ferreira do Nascimento, por todo o ensinamento, companheirismo, amizade e pela confiança depositado no meu trabalho. É uma honra desenvolver esse trabalho incrível com vocês.*

*Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Peixes: Rafaela ManchinBertollini, Lúcia Soares Lopez, Amanda Pereira, Paulo Sérgio Monzani, Natália Greice Matheus, José Augusto Senhori.*

*Aos amigos de toda vida, Diego Simplicio, Any Kelly, Wkelian, Wáleria, Jussara, Camila Caetano, Rosimeire Braga e Vinicius Corrêa. Mesmo longe, estivemos perto durante essa longa e importante etapa em minha vida. Amo todos vocês.*

*Ao CEPTA/ICMBio e em especial ao Laboratório de Biotecnologia de Peixes, AES Tietê E CTG Brasil pelo fornecimento de infraestrutura e apoio financeiro, material biológico e apoio financeiro. A realização desse trabalho só foi possível pela contribuição e apoio das renomadas instituições.*

*Também enalteço e agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) nº 88887.596850/2021-00 pelo financiamento pessoal durante o período de desenvolvimento desse trabalho.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro UFRRJ. A cidade do Rio de Janeiro por me oferecer entretenimento durante toda essa jornada.*

*Obrigado a todos!*

## RESUMO GERAL

ALVES, Andreoli Correia. **Bioteecnologias Aplicadas a Reprodução de Peixes: Produção de Ginogênético Mitótico e Poliploide em *Astyanax altiparanae***. 2021. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Instituto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

Bioteecnologias aplicadas à reprodução são importantes ferramentas para o incremento de sistemas produtivos e estudos de conservação e manutenção de espécies ameaçadas de extinção. Os pacotes tecnológicos são constituídos por diversas técnicas, e entre elas, destaca-se a ginogênese, processo de reprodução uniparental de herança genética exclusivamente materna. Através da ginogênese, é possível obter lotes monosssexuais de 100% fêmeas em espécies com sistema de determinação sexual XY, linhagens clonais e aplicação em estudos que elucidam os mecanismos de determinação sexual em peixes. Diante disso, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de estabelecer um protocolo de ginogênese mitótica em *Astyanax altiparanae*. Para isso, foram estabelecidos quatro tratamentos: Oócitos fertilizados com sêmen normal (controle diploide), oócitos fertilizados com sêmen irradiado em câmara UV para inativação do material genético paterno sem aplicação de choque térmico (ginogênético haploide), oócitos fertilizados com sêmen irradiado e com aplicação de choque 24 minutos pós fertilização (mpf) (ginogênético diploide) e oócitos fertilizados com sêmen normal com aplicação de choque térmico aos 24 mpf (tetraploide). As taxas de fertilização e sobrevivência foram verificadas nos principais estágios do desenvolvimento embrionário (clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão), assim como a porcentagem de larvas normais e anormais. As larvas recém eclodidas de cada tratamento por repetição tiveram a ploidia confirmada por citometria de fluxo e cariótipo. A irradiação e o choque térmico reduziram significativamente a sobrevivência dos embriões do tratamento presumidamente ginogênético no estágio de eclosão ( $26,50 \pm 2,50\%$ ), taxa de larvas normais ( $36,62 \pm 3,42\%$ ), aumento na taxa de larvas anormais ( $63,38 \pm 3,42\%$ ) e 98,64% do total eclodido se confirmaram larvas ginogênicas. No entanto, as análises conduzidas até o presente momento não foram conclusivas para atestar o nível de homozigose desses indivíduos. No tratamento para indução a tetraploidia, foi observada uma taxa de eclosão de  $17,8 \pm 4,11\%$  com  $50,08 \pm 4,27\%$  de larvas normais e  $49,92 \pm 2,52\%$  de larvas anormais, sendo 37,25% do total de larvas eclodidas tetraploides.

**Palavras-chaves:** Aquicultura, manipulação cromossômica, herança materna

## GENERAL ABSTRACT

ALVES, Andreoli Correia. **Biotechnologies Applied to Fish Reproduction: Production of Mitotic Gynogenetics and Polyploid in *Astyanax Altiparanae***. 2021. 68 p. Dissertation (Master in Animal Science). Institute of Animal Science, Graduate Program in Animal Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

Biotechnologies applied to reproduction are important tools to increase aquacultural production and support studies of conservation and maintenance of threatened species. Gynogenesis, is a uniparental reproductive process of exclusively maternal genetic inheritance, that may be induced in order to provide monosex population with increased performance, clonal lineages and may be used to elucidate the mechanisms of sex determination. Therefore, the objective of this study was to establish mitotic gynogenesis in *Astyanax altiparanae*, an important aquaculture and laboratory species. Four egg batches were used, each of them were divided into four treatments as follows: oocytes fertilized with normal semen (diploid control), oocytes fertilized with UV-inactivated semen without the application of thermal shock (haploid gynogenetic), oocytes fertilized with UV-inactivated semen succeeded by heat-shock (40°C, 24 minutes after fertilization -mpf) (diploid gynogenetic) and oocytes fertilized with normal semen with shock application 24 mpf (tetraploid). Fertilization and survival rates were checked in the main stages of early development (cleavage, blastula, gastrula, somite stage and hatching), as well as the percentage of normal and abnormal larvae. The newly hatched larvae (maximum of 20 samples repetition) from all treatments had ploidy status confirmed by flow cytometry and chromosome preparations. The results show that irradiation and thermal shock significantly reduced survival in the hatching stage ( $26.50 \pm 2.50\%$ ), normal larvae rate ( $36.62 \pm 3.42\%$ ) and provided increased rate of abnormal larvae ( $63.38 \pm 3.42\%$ ), increase in the rate of abnormal larvae ( $63.38 \pm 3.42\%$ ) and 98.64% of the total hatch were confirmed as gynogenetic larvae. However, the analyzes carried out to date have not been conclusive in confirming the level of homozygosity of these individuals. In the tetraploidy induction treatment, a hatching rate of  $17.8 \pm 4.11\%$  was observed with  $50.08 \pm 4.27\%$  of normal larvae and  $49.92 \pm 2.52\%$  of abnormal larvae, of which 37.25% of the total larvae hatched tetraploid.

**Key Words:** Aquaculture, chromosome manipulation, maternal inheritance

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Ilustração dos tratamentos: (1) grupo controle; (2) haploide; (3) ginogenético e (4) tetraploide em *Astyanax altiparanae*. mJ: mJ cm<sup>2</sup>; Mpf: minutos pós fertilização.....19
- Figura 2.** Desenvolvimento embrionário do grupo controle (A, B, C, D, E), ginogenético haploide (F, G, H, I, J), ginogenético diploide (K, L, M, N, O) e tetraploide (P, Q, R, S, T) de *Astyanax altiparanae*, durante os estágios de clivagem, blástula, gástrula e segmentação.....27
- Figura 3.** Larvas de *Astyanax altiparanae* do grupo controle (A), ginogenético haploide (B), ginogenético diploide (C) e tetraploide (D).....28
- Figura 4.** Histograma de citometria de fluxo de larva recém eclodida do grupo controle (A), ginogenético haploide (B), ginogenético diploide (C) e tetraploide (D) de *Astyanax altiparanae*.....29
- Figura 5.** Cariótipos indivíduos diploides do grupo controle (A), ginogenéticos diploides (B) e haploide de *Astyanax altiparanae*.....30
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado em SYBER com produtos de PCR – DNA microssatélite de parentais machos e fêmeas de *A. altiparanae*, para os primers ASTY 4, 11, 12, 13, 15, 16, 21 e 23. Seta indica diferença entre bandas de parental paterno e materno.....31
- Figura 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado em SYBER com produtos de PCR – DNA microssatélite de parentais machos e fêmeas de *A. altiparanae*, para os primers ASTY 4, 11, 12, 13, 15, 16, 21 e 23, 26 e 27.....32
- Figura 8.** Histologia ovariana (A) e testicular (B) do grupo controle e ginogenético diploide (C) de *Astyanax altiparanae*.....34
- Figura 9.** Morfologia externa de peixe do grupo controle (A) e ginogenético diploide de *Astyanax altiparanae* com 90 dias de idade.....35
- Figura 10.** Projeção radiográfica laterolateral e dorso ventral (A) de *Astyanax altiparanae* do grupo controle.....35
- Figura 11.** Projeção radiográfica laterolateral (A:B) e dorso ventral (C:D) de *Astyanax altiparanae* ginogenéticos diploides.....36

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Ilustração dos tratamentos experimentais usando fêmeas tetraploides e machos diploides de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	49
<b>Figura 2.</b> Larvas recém eclodidas do grupo controle e triploide de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	53
<b>Figura 3.</b> Histograma de citometria de fluxo de larva recém eclodida do grupo controle (A) e triploide (B) de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	54
<b>Figura 4.</b> Cariótipo de indivíduos diploides do grupo controle (A) e ginogenéticos (B) de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Descrição de loco microssatélite, temperatura de anelamento e sequência de primer de *Astyanax altiparanae*. (Adaptada, Zagananiet al., 2012).....21
- Tabela 2.** Desenvolvimento embrionário e ploidia do grupo controle (fertilização com sêmen normal sem aplicação de choque térmico), oócitos fertilizados com sêmen irradiado sem aplicação de choque térmico (haploide), oócitos fertilizados com sêmen irradiado com aplicação de choque térmico 24 mpf a 40°C durante 2 min (ginogenético) e oócitos fertilizados com sêmen normal com aplicação de choque térmico 24 mpf a 40°C durante 2 min (tetraploide).....25
- Tabela 3.** Desempenho de *Astyanax altiparanae* do grupo controle e ginogenético diploide. CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; PT: peso total; RC: rendimento de carcaça; IGS: índice gonadossomático.....32
- Tabela 4.** Proporção sexual do grupo controle e ginogenético diploide de *Astyanax altiparanae*.....33

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Desenvolvimento embrionário e ploidia do grupo controle (oócito de fêmea diploide fertilizado com sêmen de peixe diploide) e triploide (oócito de fêmea tetraploide fertilizado com sêmen de peixe diploide) de *Astyanax altiparanae*.....52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Panorama do mercado aquícola .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Caracterização da espécie <i>Astyanax altiparanae</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Biotecnologias aplicadas a produção de poliploides, androgenéticos e ginogenéticos</b>	<b>3</b>
<b>2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO I. Produção de ginogenético mitótico em <i>Astyanax altiparanae</i> Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) .....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Local e período experimental.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Reprodutores, indução hormonal e amostragem dos gametas .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Inativação do genoma espermático por Irradiação Ultravioleta.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Choque térmico, tratamentos experimentais e desenvolvimento embrionário .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Confirmação da ploidia .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Genotipagem.....</b>	<b>20</b>
<b>2.7 Desempenho produtivo .....</b>	<b>22</b>
<b>2.8 Histologia e Proporção Sexual .....</b>	<b>22</b>
<b>2.9 Morfologia externa e interna .....</b>	<b>22</b>
<b>2.10 Análise estatística .....</b>	<b>22</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Desenvolvimento embrionário, choque térmico e sobrevivência .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Confirmação da ploidia .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Análise molecular .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Desempenho produtivo .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Proporção sexual.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6 Morfologia externa e interna .....</b>	<b>34</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO II. Produção de triploides em <i>Astyanax altiparanae</i> e Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) a partir de reprodutores tetraploides.....</b>	<b>43</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>

<b>2.1 Local e Período Experimental.....</b>	<b>48</b>
<b>2.2 Reprodutores utilizados e tratamento experimental.....</b>	<b>48</b>
<b>2.3 Confirmação da ploidia .....</b>	<b>49</b>
<b>2.4 Análise estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Confirmação da ploidia .....</b>	<b>53</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Panorama do mercado aquícola

Atualmente, a aquicultura tem apresentado um crescimento acentuado ao longo dos anos. A produção de peixes em 2018 atingiu a marca de 82,1 milhões de toneladas, com crescimento médio de 5,3% ao ano no período de 2001 a 2018 (FAO, 2020).

Alguns fatores são apontados para justificar esse aumento, como a densidade demográfica mundial, que segundo projeções, em 2024 poderá ultrapassar a casa dos 8 bilhões de pessoas e ser superior a 9,5 bilhões em 2050, aumentando a demanda por alimentos de qualidade e que sejam produzidos de forma sustentável. Diante disso, o segmento Aquicultura toma maior destaque, uma vez que a pesca, embora tenha se modernizado e tornado mais efetivas as técnicas de captura, se encontra com a produção estabilizada desde a década de 1990 (FAO, 2020).

A demanda crescente por alimentos de qualidade e com alto valor nutritivo aliado ao clima propício e alta disponibilidade hídrica em terras brasileiras, faz da produção piscícola um grande destaque entre as proteínas de origem animal. Embora as potencialidades supramencionadas, a cadeia produtiva de peixes ainda enfrenta grandes dificuldades relacionadas ao desenvolvimento de tecnologias, manejo e alimentação, principalmente no cultivo de espécies nativas. O nível tecnológico empregado no cultivo de peixes nativos apresenta relação direta com a quantidade e qualidade, quando comparado as espécies exóticas que normalmente tem programas nutricionais consistentes e tecnologias reprodutivas bem estabelecidas, a exemplo da cadeia produtiva de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (PPM/IBGE, 2020; SIDONIO *et al.*, 2012).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), peixe nativo da bacia amazônica, por exemplo, é a espécie nativa que figurou maior volume produtivo entre as espécies endêmicas, tendo menor volume produzido (102 mil toneladas) equivalente à 20% do total produzido, quando comparado as tilápias por exemplo, que no ano de 2020 foi responsável por produzir 330 mil toneladas, totalizando 61,1 % do total produzido (PPM/IBGE, 2020).

Alguns outros fatores ainda são apontados como causas para a baixa produção de peixes nativos, entre eles a escassez de programas de estímulo ao consumo e a falta de tecnificação da cadeia produtiva, fatores que configuram entraves para a consolidação da produção e a popularização das espécies nativas como as principais produzidas e consumidas (OSTRENSKY, BORGHETTI e SOTO 2008).

Diante da necessidade do desenvolvimento de pacotes tecnológicos para alavancar a produção de peixes nativos, foram desenvolvidos estudos de reprodução *in vitro* (YASUI *et al.*, 2014) que possibilitar a elucidar eventos da biologia básica e reprodutiva de espécies, como o caracádeo *Astyanax altiparanae* (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2016 e 2017).

Com isso, recentemente foram desenvolvidos pacotes tecnológicos de manipulação cromossômica em *A. altiparanae*, como a triploidização (ADAMOV *et al.*, 2017, DO NASCIMENTO *et al.*, 2017), tetraploidização (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020), ginogênese (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020) e o estabelecimento do primeiro plano de alimentação de larvicultura da espécie em condições laboratoriais (BERTOLINI *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de pacotes biotecnológicos aplicados a reprodução de peixes nativos é de grande relevância e alta versatilidade, uma vez que atende demandas ecológicas, como a produção de peixes estéreis (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017), eliminando impactos ambientais como a introgressão genética (PIFERRER *et al.*, 2009).

Além disso, podem ser uma importante ferramenta no incremento produtivo, como aumento do rendimento de carcaça, gerando produtos de melhor qualidade (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017), produzindo organismos mais resistentes as doenças, diminuindo o uso de medicamentos e produtos químicos que são nocivos à saúde humana (ELASWAD e DUNHAM, 2017).

## 1.2 Caracterização da espécie *Astyanax altiparanae*

O Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) é um caracídeo nativo do Brasil, pertencente ao gênero *Astyanax* e uma das espécies mais importantes da cadeia alimentar nos rios da América do Sul (PRIOLI *et al.*, 2002). O gênero apresenta grande variedade cariotípica, com o número de cromossomos variando de  $2n= 36$  (*A. shubarti*) a  $2n= 50$  (*A. scabripinis* e *A. altiparanae*) (MORELLI *et al.*, 1983).

Dentre as espécies de lambari existentes, o *Astyanax altiparanae* se destaca pelo rápido crescimento e rusticidade. A espécie ainda apresenta grande capacidade de adaptação aos mais diversos tipos de alimentos, uma vez que sua dieta em sistemas naturais é regida pela sazonalidade. Tamaña plasticidade alimentar é uma importante característica que contribui para expansão da produção da espécie (PORTO-FOREST; CASTILHO-ALMEIDA e FORESTI, 2005).

Quanto aos aspectos reprodutivos, as fêmeas apresentam sua primeira maturação sexual próximo de 69,00 mm ou aproximadamente aos quatro meses de idade, sua desova é parcelada, ocorrendo geralmente entre os meses de setembro e março. A espécie apresenta estratégia reprodutiva do tipo sedentária (RIZZO *et al.*, 2002; DE CARVALHO *et al.*, 2009) e suas desovas apresentam picos que são diretamente influenciados pela temperatura e índices pluviométricos (DE CARVALHO *et al.*, 2009).

A estrutura gonadal da espécie é composta por ovários do tipo cistovariano, onde o lúmen ovariano se estende até o oviduto. As gônadas representam órgãos pares, alongados e foliáceos (MELO *et al.*, 2005). O tipo de desenvolvimento ovocitário é assincrônico, com presença de oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Já nos machos, os testículos estão localizados nos dois lados da cavidade abdominal, onde se conectam ao poro genital. A espécie apresenta testículo do tipo tubular anastomosado com porções responsáveis pela espermatogênese e pela secreção (COSTA, 2011).

Outros aspectos ligados à sua reprodução também facilitam a perpetuação em ambientes diversificados, a destacar a alta taxa de fecundidade, ovos pequenos com rápido desenvolvimento (AGOSTINHO *et al.*, 1999) e dose inseminante de 2.390 espermatozoides por mL<sup>-1</sup>, uma das menores entre os peixes teleósteos (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2016).

Diante do desenvolvimento de protocolos de fertilização *in vitro* (YASUI *et al.*, 2015) e atributos da sua biologia reprodutiva e zootécnica, o lambari se torna uma espécie modelo com grande potencial para aplicação de tecnologias e padronização de protocolos, que

posteriormente podem ser aplicados em sua produção ou em outras espécies nativas, justificando o sucesso de suas estratégias reprodutivas e do seu emprego na criação de pacotes tecnológicos de manipulação cromossômica em espécies nativas (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2016).

### 1.3 Biotecnologias aplicadas a produção de poliploides, androgenéticos e ginogenéticos

Atualmente, os avanços no desenvolvimento das biotecnologias forneceram ferramentas necessárias para a manipulação artificial de genes e cromossomos em animais (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2007), o que viabilizou a produção de peixes poliploides, ginogenéticos meióticos e mitóticos e androgenéticos (ARAI, 2001).

Os indivíduos poliploides são organismos que possuem mais de um conjunto cromossômico com relação ao número mais frequente encontrado na natureza para uma dada espécie (LUTZ, 2003; DUNHAM, 2004). Dentre os poliploides, os peixes triploides, indivíduos geralmente estéreis, atuam como ferramentas indispensáveis para o incremento produtivo da aquicultura (FELIP *et al.*, 1999).

A condição estéril dos peixes triploides elimina efeitos deletérios relacionados à maturação sexual precoce, favorecendo o crescimento e ganho de peso. Além disso, a esterilidade pode incrementar importantes índices produtivos como maior sobrevivência, atribuída a menor agressividade (LUTZ, 2013) e rendimento de carcaça, como observado em *Astyanax altiparanae* (NASCIMENTO *et al.*, 2017b; DO NASCIMENTO *et al.*, 2017) e em *Rhamdia quelen* (MORÓN-ALCAIN *et al.*, 2017).

Os maiores índices produtivos de indivíduos triploides estéreis são atribuídos ao crescimento diferencial das gônadas (em alguns casos), pois a redistribuição de energia inicialmente utilizada para o desenvolvimento gonadal, processo naturalmente observado em peixes diploides, em triploides, é direcionada para os tecidos somáticos, bem como os demais processos metabólicos (ARAI; FUJIMOTO, 2018). No entanto, nem sempre é observado um maior desempenho zootécnico em indivíduos triploides, como descrito em *L. Salmosalar* (CARTER *et al.*, 1994), *Salvelinus fontinalis* e *Oncorhynchus mykiss* (BENFEY; BIRON, 2000), indicando uma resposta espécie-específica.

Além dessas vantagens, a triploidização é uma ferramenta indispensável no processo de conservação de espécies, uma vez que peixes triploides estéreis também podem ser empregados em outras tecnologias, como quimerismo, atuando como receptores de células germinativas primordiais (CGPs) e, dessa forma, garantindo a produção de gametas a partir das CGPs das espécies doadoras (de SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2015).

Os peixes triploides estéreis aplicados a aquicultura colaboram para conservação da variabilidade genética das espécies, uma vez que caso haja escapes de peixes dos sistemas produtivos para ambientes naturais, eliminam os riscos de introgressão genética, automaticamente diminuindo os riscos de extinção de espécies nativas da ictiofauna local (DUNHAM, 2004), problema historicamente observado com a expansão da produção de peixes híbridos, por exemplo (ALLENDORF *et al.*, 2001). Destaca-se que a introdução de peixes exóticos é a segunda maior causa de extinção de espécies nativas (MACHADO, 2008), o que enfatiza a importância do cultivo de peixes estéreis.

Triploides naturais já foram relatados para a espécie *Astyanax scabripinnis* (MAISTRO *et al.*, 1994). No entanto, essa condição pode ser induzida através de choques de temperatura (quente ou frio), inclusive em espécies nativas, como observado em *Astyanax altiparanae* (ADAMOV *et al.*, 2017) (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017a), em *Pimelodus maculatus* (BERTOLINI *et al.*, 2018) e em matrinxã (*Brycon amazonicus*) (DO NASCIMENTO *et al.*, 2021). A triploidização também pode ser alcançada através de métodos químicos (citocalasina B, cafeína, colchicina, óxido nítrico) ou por choque de pressão (ARAI, 2001, PIFERRER *et al.*, 2009). No entanto, os choques térmicos representam um modo eficiente de produção de poliploides, devido seu baixo custo e facilidade de execução (ARAI, 2018).

O sucesso da triploidização e de outras tecnologias de manipulação cromossômica e micromanipulação está condicionado a uma série de eventos cronológicos durante a fertilização, incluindo o tempo de extrusão do segundo corpúsculo polar e o tempo de fusão dos pronúcleos (FELIP *et al.*, 2009) que em *Astyanax altiparanae*, espécie adotada como modelo para o presente estudo, ocorre de 4-6 e 8-10 minutos pós fertilização, respectivamente (PEREIRA- SANTOS *et al.*, 2016). Com essas informações torna-se viável a aplicação outros pacotes tecnológicos na reprodução de peixes, a exemplo a ginogênese. A ginogênese é um processo de reprodução uniparental ou de descendência partenogenética derivada exclusivamente do genoma materno (ARAI e FUJIMOTO, 2018) e quando derivado exclusivamente do genoma paterno, é comumente conhecida como androgênese (KOMEM e THORGAARD, 2007).

A reprodução uniparental via ginogênese é uma tecnologia que pode ser induzida na reprodução de peixes teleósteos. Todo o processo para obtenção de um peixe ginogenético é baseado em duas importantes etapas, sendo imprescindível, primeiramente, a ativação da embriogênese por um espermatozoide com material genético inativado, e posteriormente a restauração do estado diploide pela retenção do segundo corpúsculo polar ou supressão da primeira clivagem mitótica, resultando em indivíduos ginogenéticos meióticos e mitóticos, respectivamente (KOMEM e THORGAARD, 2007).

A primeira etapa do processo de indução a ginogênese é inativação do genoma paterno, o qual pode ocorrer através de diferentes métodos de irradiação utilizando radiação ionizante (raios gama e raios-X) e a radiação não ionizante (UV) (KOMEM e THORGAARD, 2007). A inativação dos espermatozoides com raios UV é o método comumente utilizado devido seu baixo custo, segurança e simples configuração de uso. Geralmente, são utilizadas lâmpadas germicidas (254nm) as quais causam danos ao DNA, inviabilizando a transmissão do genoma paterno para os descendentes (LEBEDA *et al.*, 2014).

Entretanto, os espermatozoides inativados apresentam redução da mobilidade, o que também ocasiona maiores taxas de mortalidade, especialmente durante os primeiros estágios da embriogênese (FOPP-BAYAT *et al.*, 2010). Contudo, mesmo com a sua motilidade reduzida, os espermatozoides ainda são capazes de ativar o desenvolvimento embrionário como observado em *Gadus morhua* (WHITEHEAD *et al.*, 2012), em *Oncorhynchus mykiss* (DIETRICH *et al.*, 2005) e em *Astyanax altiparanae* (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020).

A segunda etapa para o processo de indução a ginogênese é a duplicação do material genético materno, conhecida como diploidização. A restauração do estado diploide do oócito é necessária para viabilizar a produção com melhor sobrevivência, haja vista que a condição haploide em peixes resulta em mortalidade nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário ou uma série de anomalias que caracterizam a “Síndrome Haploide” (PAN *et al.*, 2017).

O restabelecimento da ploidia pode ser alcançado através da aplicação de choques térmicos, impedindo a extrusão do segundo corpúsculo polar, dessa forma produzindo um indivíduo ginogenético meiótico. Quando a diploidização do oócito ocorre com a aplicação de choques tardios, suprimindo a primeira divisão mitótica, o resultado será a produção de indivíduos ginogenéticos mitóticos (ARAI; FUJIMOTO, 2018; DUNHAM, 2004 e PAN 2017).

Os ginogenéticos de um modo geral possuem como principal característica o nível elevado de homozigose (quando comparados aos diploides) e a alta semelhança genética entre os descendentes, sendo um método eficaz para estabelecer linhagens consanguíneas em peixes (ZHANG; ONOZATO, 2004).

No entanto, problemas relacionados a alta taxa de consanguinidade principalmente em indivíduos ginogenéticos mitóticos os quais têm homozigose completa, diminuem consideravelmente a porcentagem de eclosão, como observado em *Paralichthys olivaceus* com 2,34% (YAMAMOTO, 1999) e a porcentagem de sobrevivência, como relatado em *Brachydanio rerio*, com 4 a 20% de sobrevivência (HÖRSTGENSCHWARK, 1993) e em *Rhodeus ocellatus ocellatus* com 5,5% de sobrevivência da eclosão aos 30 primeiros dias de vida (KAWAMURA, 1998).

Apesar da baixa viabilidade e sobrevivência dos protocolos de indução a ginogênese, a técnica apresenta um destacado viés econômico, pois viabiliza a produção de a) populações monosssexuais em espécies com sistema de determinação sexual XY b) estabelecer linhagens puras e clonais aplicadas em programas de melhoramento genético em peixes e c) produzir espécies onde as fêmeas possuem melhores índices produtivos e maior valor econômico (HOU; LIU, 2018).

Além disso, indivíduos ginogenéticos são amplamente utilizados em estudos para elucidação dos mecanismos de determinação sexual (WANG; CAI, 2018), principalmente em peixes com sistemas de determinação XY (machos heterogaméticos e fêmeas homogaméticas), onde é esperado que 100% dos descendentes sejam fêmeas, como observado em *Gasterosteus aculeatus* (SAMONTE-PADILLA *et al.*, 2011).

No entanto, esse comportamento não é observado em sistemas de determinação onde as fêmeas sejam heterogaméticas (ZW), nesses casos, os descendentes, podem ter proporção sexual alternada entre machos e fêmeas, como observado em *Acipenser baeri Brandt* (FOPP-BAYAT *et al.*, 2010).

Protocolos eficientes de indução a ginogênese foram estabelecidos em *Scophthalmus maximus* (MENG *et al.*, 2016), *Ictalurus punctatus* (GOUDIE *et al.*, 1995) e *Pleuronectes lineatus* (YAMAMOTO, 1999), mostrando que a irradiação UV e choques para o restabelecimento da ploidia são extremamente espécie específicos.

Estudos de indução a ginogênese em espécies da região neotropical ainda são escassos, sendo que o primeiro trabalho de indução a ginogênese meiótica foi desenvolvido por Do Nascimento *et al.* (2020), em *A. altiparanae*. Diante do número reduzido de estudos sobre ginogênese em espécies nativas, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo de indução a ginogênese mitótica e tetraploidia em *Astyanax altiparanae*.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOV, N.S. *et al.* Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: **Tools for Conservation and Aquaculture**. v.48, n. 5, p. 741-750, 2017.
- AGOSTINHO, A. A. *et al.* Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognosis on aging. In: Tundisi, J. G. & M. Straskraba (Eds.). *Theoretical Reservoir Ecology and its Applications*. São Carlos, **International Institute of Ecology (IIE)**; Leiden, Netherlands, Backhuys Publishers, P. 227-265.
- ALLENDORF, F. W. *et al.* The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology e Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.
- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture*, v.197, n. 1, p. 205–228, 2001.
- ARAI, K.; FUJIMOTO, T. Chromosome Manipulation Techniques and Applications to Aquaculture. Sex Control in **Aquaculture**, v. I, p. 137–162, 2018.
- BENFEY, T. J.; BIRON, M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, v. 184, n. 1–2, p. 167–176, 2000.
- BERTOLINI, R. M. *et al.* First feeding of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: An initial stage for application in laboratory studies. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, p. 68-74, 2018.
- BERTOLINI, R. M. *et al.* Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*. *Aquaculture International*. **Springer**, 12, v. 28, n. 1, p. 127-137, 2019.
- CARTER, C. G. *et al.* Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 4, p. 609–617, 1994.
- COSTA, F. G. **Testículo de *Astyanax altiparanae*. Estudo morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico**, USP, São Paulo, 84p. (Tese Doutorado), 2011.
- DE CARVALHO, P. A. *et al.* Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, n. 3, p. 306–313, 2009.
- DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. *et al.* The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033–1042, 2015.
- DIETRICH, G.J. *et al.* Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, n. 8, p.1809-1822, 2005.
- DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v. 514, p. 734-432, 2020.

- DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471. 163-171, 2017.
- DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. **Zygote**, v.25, n.4, p. 537-544, 2017b.
- DO NASCIMENTO, N.F. *et al.* Heat-induced triploids in *Brycon amazonicus*: A strategic fish species for aquaculture and conservation. **Zygote**, p.1-5. 2021.
- DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Oxford: GABI Publishing, 2004.
- ELASWAD, A. e DUNHAM, R. Disease reduction in aquaculture with genetic and genomic technology: current and future approaches. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p.876-898, 2017.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2020**. Rome: FAO 2020.
- FELIP, A. *et al.* Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during the first two years of age. **Aquaculture**, v. 173, n. 1-4, p. 389-399, 1999.
- FOPP-BAYAT, D. Meiotic gynogenesis revealed not homogametic female sex determination system in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). **Aquaculture**, v. 305, n. 1, p. 174-177, 2010.
- GOUDIE, C.A *et al.* Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. **Aquaculture**, v133, p.185-198,1995.
- HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Aquaculture**, V.112, n. 1, p. 25-37, 1993.
- HOU, J.L.; LIU, H.J. Gynogenesis and Sex Control in Japanese Flounder. **Sex Control in Aquaculture**, v. 2, p. 603-619, 2018.
- KAWAMURA, K. Sex determination system of the rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 7, p. 52, p.251-260.1998.
- KOMEN, H. e THORGAARD, G. H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 150-173, 2007.
- LEBEDA, I. *et al.* Optimization of sperm irradiation protocol for induced gynogenesis in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. **Aquaculture international**, v. 22, n. 2, p. 485-495, 2014.
- LUTZ, C. G. **Practical Genetics for Aquaculture**. London: Blackwell, 2003.
- MACHADO, A. B. M. *et al.* **Livro da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 157 p.
- MAISTRO, E. L. *et al.* Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) and simultaneous occurrence of macro-B-chromosomes. **Caryologia**, v. 47, n. 3-4, p. 233-239, 1994.
- MELO, F. C. S. A. *et al.* Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata *Astyanax scabripinnis* (Characidae: Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, v.52, n. 304, p. 811-829, 2005.
- MENG, Z.*et al.* Induction of mitotic gynogenesis in *turbot**Scophthalmus maximus*. **Aquaculture**, v. 451, p. 429-435, 2016.

- MORELLI, S. *et al.* Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235–244, 1983.
- MORÓN-ALCAIN, E. *et al.* Effects of heat and cold shock-induced triploidy on productive parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) late-hatched in the reproductive season. **Aquaculture**, v. 473, p. 303–309, 2017.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, p. 276, 2008.
- PAN, Z. J. *et al.* Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5659–5665, 2017.
- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote** (Cambridge, England), v. 24, n. 6, p. 795–807, 2016.
- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Grooves surrounding the micropyle decrease the inseminating dose in fish. **Zygote**, v. 25, n. 6, p. 731–739, 2017.
- PIFERRER, F. *et al.* Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, n. 3–4, p. 125–156, 2009.
- PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldissotto B, Gomes LC, editores. Espécies nativas para piscicultura. Santa Maria: UFMS; 2005. p. 105–120.
- PRIOLI, S. M. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 421–430, 2002.
- Produção de Pecuária Municipal PPM**, IBGE. Ministerio da Agricultura, Rio de Janeiro, 2020.
- RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Biotechnology in aquaculture: Transgenics and polyploidy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, n. 1, p. 2–16, 2007.
- RIZZO, E. *et al.* Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 3, p. 615–632, 2002.
- SAMONTE-PADILLA, I. E. *et al.* Induction of diploid gynogenesis in an evolutionary model organism, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Bmc Developmental Biology**, v. 11, n.55, 2011.
- SATO, Y. *et al.* Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p.267–273, 2006.
- SIDONIO, L. *et al.* **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES Setorial. V. 35, p. 421–463, 2012.
- WANG, Z.Y.; CAI, M.Y. Artificial Gynogenesis and Sex Control in Large Yellow Croaker. **Sex Control in Aquaculture**, v. 2, n. 4, p. 751–773, 2018.

WHITEHEAD, J. A.; BENFEY, T. J. e MARTIN-ROBICHAUD, D. J. Ovarian development and sex ratio of gynogenetic Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 324–325, n. 0, p. 174–181, 2012.

YAMAMOTO, E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (*Temminck et Schlegel*). **Aquaculture**, v. 173, p. 235–246, 1999.

YASUI, G. S. *et al.* Improvement of gamete quality and its short-term storage: An approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 39, n. 11, p. 464–470, 2015.

ZHANG, X.; ONOZATO, H. Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one. **Aquaculture**, v. 240, n. 1–4, p. 101–113, 2004.

**CAPÍTULO I. Produção de ginogenético mitótico em *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae).**

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer um protocolo de ginogênese mitótica em *Astyanax altiparanae*. Foram estabelecidos quatro tratamentos: Oócitos fecundados com sêmen fresco (controle diplóide), oócitos fecundados com sêmen irradiado em câmara UV para inativação do material genético paterno sem aplicação de choque térmico (haploide), oócitos fecundados com sêmen irradiado e com aplicação de 24 minutos choque pós-fecundação (mpf) (ginogenética diplóide) e ovócitos fecundados com sêmen normal com aplicação de choque térmico a 24 mpf (tetraplóide). Foram verificadas as taxas de fecundação e sobrevivência nas principais fases do desenvolvimento embrionário (clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão), bem como a porcentagem de larvas normais e anormais. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SE. Os experimentos foram realizados em quatro repetições, cada uma com reprodutor diferentes. Os dados foram verificados quanto à normalidade com o teste de Liliefors e depois comparados entre si pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Larvas recém-eclodidas (máximo de 20 amostras por repetição) de todos os tratamentos tiveram ploidia confirmada por citometria de fluxo e cariótipo. Foram separadas 16 larvas, oito do grupo controle e oito do tratamento ginogenético mitótico para análise de marcadores microssatélites. A proporção sexual foi realizada através da identificação das gônadas. Amostras para histologia foram coletadas de 91 peixes (60 controles e 31 ginogenéticos). Os resultados mostram que o grupo controle apresentou eclosão de  $80,42 \pm 2,28\%$ , com  $96,73 \pm 2,22\%$  de larvas normais e  $3,27 \pm 1,01\%$  de larvas anormais. A irradiação e o choque térmico reduziram significativamente a sobrevivência dos nascimentos ( $26,50 \pm 2,50\%$ ,  $P > 0,05$ ), a taxa normal de larvas ( $36,62 \pm 3,42\%$ ,  $P = 0,08$ ), o aumento na taxa de larvas anormais ( $63,38 \pm 3,42\%$ ,  $P = 0,07$ ) e  $98,64\%$  do total de larvas geradas pelo tratamento de ginogênese eclodidas. No tratamento para indução de tetraploidia, foi observada taxa de eclosão de  $17,8 \pm 4,11\%$  ( $P = 0,01$ ) com  $10,64 \pm 4,27\%$  de larvas normais e  $6,74 \pm 2,52\%$  de larvas anormais, e  $37,25\%$  do total de larvas tetraploides eclodidas. Os resultados da análise citogenética mostraram que os cariótipos diplóides de *Astyanax altiparanae* do grupo controle e ginogenético diplóide e ginogenético haploide revelaram 50, 50 e 25 cromossomos, respectivamente. Não houve diferença significativa para rendimento de carcaça e índice gonadossomático entre os peixes do grupo controle e ginogenético. Entretanto, essa diferença foi observada no comprimento total e padrão e no peso total ( $P > 0,05$ ). Os resultados obtidos pela análise de marcadores microssatélites foram inconclusivos para a certificação da homozigose completa dos indivíduos obtidos, não sendo possível, portanto, concluir que o protocolo empregado no presente estudo resultou na formação de indivíduos ginogenéticos mitóticos.

## ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of establishing a mitotic gynogenesis protocol in *Astyanax altiparanae*. Four treatments were established: Oocytes fertilized with fresh semen (diploid control), oocytes fertilized with semen irradiated in a UV chamber for inactivation of the paternal genetic material without application of heat shock (haploid), oocytes fertilized with irradiated semen and with application of 24 minutes shock post fertilization (mpf) (diploid gynogenetic) and oocytes fertilized with normal semen with application of heat shock at 24 mpf (tetraploid). Fertilization and survival rates were verified in the main stages of embryonic development (cleavage, blastula, gastrula, segmentation and hatching), as well as the percentage of normal and abnormal larvae. Data are shown as mean  $\pm$  SE. The experiments were carried out in four replications, each with different sires. Data were checked for normality with the Liliefor's test and then compared with each other by ANOVA test, followed by Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ). Newly hatched larvae (maximum of 20 samples per repetition) from all treatments had ploidy confirmed by flow cytometry and karyotype. Sixteen larvae were separated, eight from the control group and eight from the mitotic gynogenetic treatment for microsatellite marker analysis. The sex ratio was performed by identifying the gonads. Samples for histology were collected from 91 fish (60 controls and 31 ginogenetics). The results show that the control group presented an hatch of  $80.42 \pm 2.28\%$ , with  $96.73 \pm 2.22\%$  of normal larvae and  $3.27 \pm 1.01\%$  of abnormal larvae. Irradiation and heat shock significantly reduced hatch survival ( $26.50 \pm 2.50\%$ ,  $P > 0.05$ ), normal larvae rate ( $36.62 \pm 3.42\%$ ,  $P = 0.08$ ), increase in the rate of abnormal larvae ( $63.38 \pm 3.42\%$ ,  $P=0.07$ ) and  $98.64\%$  of the total. In the treatment for induction of tetraploidy, an hatching rate of  $17.8 \pm 4.11\%$  ( $P = 0.01$ ) was observed with  $10.64 \pm 4.27\%$  of normal larvae and  $6.74 \pm 2.52\%$  of abnormal larvae, and  $37.25\%$  of the total tetraploid hatched larvae. The results of the cytogenetic analysis showed that the diploid karyotypes of *Astyanax altiparanae* from the control and diploid gynogenetic and haploid gynogenetic groups revealed 50, 50 and 25 chromosomes, respectively. There was no significant difference for carcass yield and gonadosomatic index between fish from the control and ginogenetic groups. However, this difference was observed in total and standard length and total weight ( $P > 0.05$ ). There was a small variation (12.1%) in the sex ratio of gyno fish, with the appearance of a male. The results obtained by the analysis of microsatellite markers were inconclusive for certifying the complete homozygosity of the individuals obtained, and it is therefore not possible to conclude that the protocol used in the present study resulted in the formation of mitotic gynogenetic individuals.

## 1 INTRODUÇÃO

A ginogênese é uma biotecnologia reprodutiva que pode ser induzida em peixes e tem como principal objetivo, produzir gerações de indivíduos uniparentais ou de descendência partenogênética, derivada exclusivamente do genoma materno (KOMEN e THORGAARD, 2007).

O processo de indução a ginogênese é baseado em duas grandes etapas, sendo elas; a) a inativação do genoma paterno e b) o restabelecimento do estado diploide, viabilizando a sobrevivência e a viabilidade da prole. A inativação do genoma paterno é geralmente alcançada utilizando a irradiação ultravioleta (UV) o que causa danos estruturais ao DNA, levando a nenhuma contribuição funcional do material genético paterno aos seus descendentes (LEBEDA *et al.*, 2014).

O estado haploide em peixes configura a “Síndrome Haploide”, resultando em uma série de anomalias e mortalidade durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (PAN *et al.*, 2017; TVEDT *et al.*, 2006), o que torna a diploidização do embrião imprescindível para a produção de progênies ginogenéticas viáveis (DUNHAM, 2004).

Os mecanismos de diploidização são relativamente simples, baseados na aplicação de choques térmico, químico ou de pressão. O choque térmico é uma forma eficiente e devido a fácil configuração atrelado ao baixo custo, é o método comumente utilizado em pacotes tecnológicos para espécies nativas, como a triploidização (ADAMOV *et al.*, 2017; BERTOLINI *et al.*, 2019) e a tetraploidização (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020).

A ginogênese têm sido aplicada há décadas em diversas espécies de peixes com a finalidade de otimizar a produção de linhagens clonais (KOMEN e THORGAARD, 2007). As linhagens clonais têm alto nível de homozigose, tornando-se uma importante ferramenta de seleção em programas de melhoramento genético, já que aumenta consideravelmente as chances de selecionar genótipos ligados as características produtivas.

Além disso, em espécies que o sistema de determinação sexual é XY e XY (fêmeas homogaméticas e machos heterogaméticos) a ginogênese desempenha um importante papel, uma vez que viabiliza a produção de lotes 100% femininos, contribuindo para a expansão da produção onde as fêmeas apresentam maiores ganhos produtivos, por exemplo em *A. altiparanae* (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017).

No entanto, estudos de indução a ginogênese mitótica para espécies nativas são inexistentes e à ginogênese meiótica ainda são escassos e estão limitados a uma quantidade pequena de espécies, a exemplo *Astyanax altiparanae* (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020). Diante do estrito número de estudos sobre a ginogênese em espécies neotropicals, este estudo foi conduzido com o objetivo de estabelecer um protocolo de indução a ginogênese mitótica em *Astyanax altiparanae*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ), protocolo N° 009-11-2019.

### 2.1 Local e período experimental

O experimento foi realizado no período de outubro de 2019 a dezembro de 2020, no Centro de Conservação da Biodiversidade Aquática Continental - CEPTA/ICMBio, em Pirassununga/SP, Brasil.

### 2.2 Reprodutores, indução hormonal e amostragem dos gametas

Os procedimentos de seleção de reprodutores e indução hormonal, foram baseados no protocolo de reprodução de Yasui et al. (2015). Os reprodutores utilizados foram quatro casais da espécie *Astyanax altiparanae* selecionados com base em características morfológicas e reprodutivas, machos com a presença de espícula na nadadeira caudal e fêmeas com ventre abaulado.

Cada casal foi mantido em aquário de 40 litros onde foram induzidos hormonalmente com Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (*Cyprinus carpio*) (EBHC). As fêmeas receberam duas doses com concentrações de 0,5 e 3,0 mg Kg<sup>-1</sup> em intervalos de 6 horas entre aplicações. Os machos receberam uma única dose com concentração de 3,0 mg Kg<sup>-1</sup>, aplicada simultaneamente a segunda dose das fêmeas.

Seis horas após a última dose do indutor hormonal ou início da liberação dos gametas, os casais foram anestesiados com solução eugenol (0.1 g L<sup>-1</sup>) (Biodinâmica, Iporã, Brasil) para a coleta de gametas. As fêmeas tiveram os oócitos extrusados em placas Petri de 90 mm cobertas com papel filme (Alpfilm, São Paulo, Brasil).

Em seguida, o sêmen foi coletado com pipeta de 1000 µL (Eppendorf, Alemanha) e armazenados em solução de 400 µL de Ringer modificado (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,1 mM MgCl<sub>2</sub>) para estocagem sob refrigeração (2,5°C).

Após cada coleta, parâmetros de motilidade total e concentração foram verificados. Para análise de motilidade espermática, 1 µ L de sêmen foi adicionado em lâmina de vidro fosca previamente embebida em albumina bovina sérica (BSA) (INLAB, #1870) a 0,1 % para evitar a adesão do células. Logo após, foi adicionado 19 µ L de água destilada para ativação dos espermatozoides.

Um vídeo de um minuto foi registrado utilizando uma câmera CCD (Nikon DS-F1, Nikon, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico (Nikon-EclipseNi, Tóquio, Japão) e o software Nis-Ar-Elements (Nikon, Tóquio, Japão) para realizar análise subjetiva (% motilidade total, % motilidade progressiva e % de imóveis). Análises de concentração

espermática foram realizadas de forma individual a partir do sêmen proveniente de cada reprodutor, utilizando o método de contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer (espermatozoides. mL<sup>-1</sup>). Para isso, foram usadas amostras fixadas em formol tamponado (YASUI *et al.*, 2008). Foi realizada a contagem de células espermáticas presentes em dez campos da câmara hematimétrica de Neubauer.

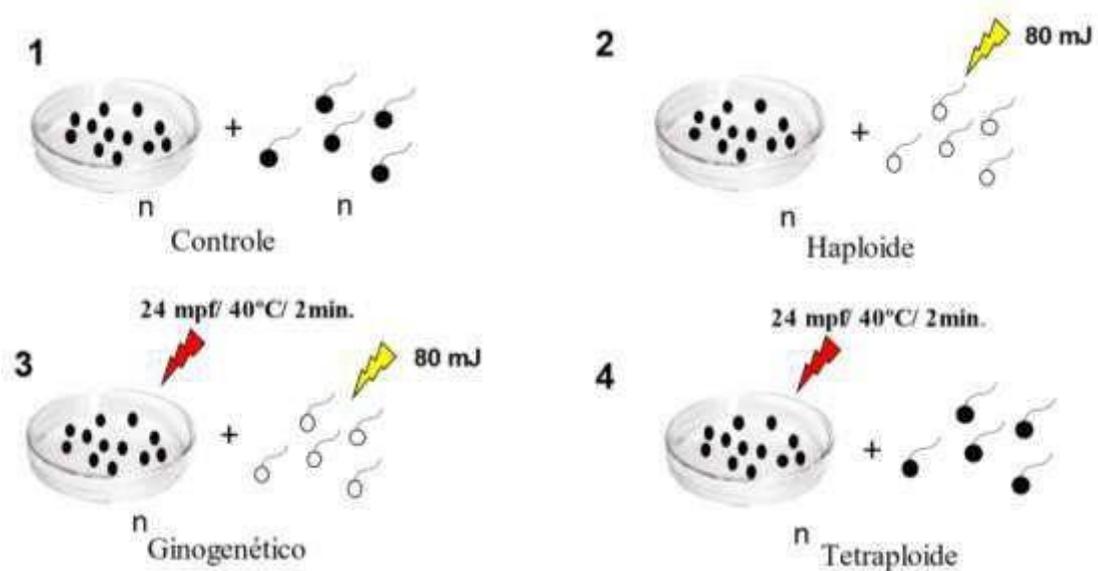
### **2.3 Inativação do genoma espermático por Irradiação Ultravioleta**

Para a inativação do genoma espermático foi adotado o protocolo de inativação espermática descrito por do Nascimento *et al.*, (2020). Para isso, foi separada uma alíquota de 500 µL de sêmen diluído em solução de Ringer, com concentração de  $3,6 \times 10^8$  espermatozoides mL<sup>-1</sup>, posteriormente distribuída sobre placa de Petri de 90 mm de diâmetro e mantida em câmara fechada de irradiação UV. A câmara foi equipada com lâmpada UV (254 nm) a 33,5 cm da superfície da placa de Petri. Os espermatozoides foram irradiados por 80 segundos a 1mW/ cm (dose de 80 mJ/cm). Logo após, o conteúdo espermático inativado foi retirado e subdividido em alíquotas de 250 uL, posteriormente utilizadas para fertilização *in vitro* para indução à ginogênese mitótica.

### **2.4 Choque térmico, tratamentos experimentais e desenvolvimento embrionário**

O choque térmico para restaurar o estado diploide foi similar ao descrito por do Nascimento *et al.*, (2020) em protocolos de tetraploidização em *Astyanax altiparanae*, utilizando choque térmico de 40° C, durante 2 minutos, aplicado 24 minutos pós fertilização. A temperatura pré-choque foi ajustada a 22°C, conforme descrito por Pereira-Santos *et al.* (2016).

Para constituir os tratamentos experimentais, a massa de oócitos foi subdividida em quatro alíquotas de ~ 100 oócitos (13 uL de oócitos) mantidas sobre placas de Petri de 90 mm revestidas com papel filme (Alpfilm, São Paulo, Brasil) as quais constituíram os tratamentos experimentais (Figura 1).



**Figura 1:** Ilustração dos tratamentos (1) grupo controle; (2) haploide; (3) presumidamente ginogenético e (4) tetraploide em *Astyanax altiparanae*. mJ: mJ cm<sup>2</sup>; Mpf: minutos pós fertilização.

Legenda: 1) óocitos fertilizados com esperma não irradiado (controle diploide); 2) fertilizados com espermatozoides irradiados com 80 mJ cm<sup>2</sup> (grupo haploide); 3) fertilizados com espermatozoides irradiados (80 mJ cm<sup>2</sup>) mais choque térmico (grupo diploide ginogenético presumível) e 4) fertilizados com espermatozoides não irradiados e submetidos a choque térmico (controle tetraploide).

Os embriões de cada tratamento foram observados por meio de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japan) durante os estágios de fertilização, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão, na qual foi contabilizado o número de larvas normais e anormais, seguindo a classificação proposta por Pereira – Santos et al. (2016).

## 2.5 Confirmação da ploidia

Foram realizadas análises de citometria de fluxo e citogenética em indivíduos adultos do grupo controle e ginogenético, e em larvas do grupo haploide para confirmação da ploidia. A análise de citometria de fluxo foi aplicada em 20 larvas recém-eclodidas de cada tratamento, nas quatro repetições. As larvas foram separadas de forma unitária em microtubos de 1,5 mL, nos quais foi adicionada solução de lise celular (9,53 mM MgSO 4 .7H 2 O, KCl 47,67 mM, Tris 15 mM, sacarose 74 mM, pH 8,0 e 0,8% de Triton X-100) por 10 minutos, para nucleação da amostra, seguindo protocolo descrito por Xavier et al. (2017).

A coloração dos núcleos foi realizada com a adição de 800 µL de solução de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride - DAPI (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (Sigma #D5773, St. Louis, EUA). Toda a solução do microtubo foi filtrada em telas de 30 µm (Celltrics, Partec, GmbH, Germany). Posteriormente, o conteúdo do DNA foi medido com um citômetro de fluxo CyFlow Ploidy, Analyzer, Partec, GmbH, Alemanha) e a ploidia de todos os tratamentos foi confirmada por comparação com a referência de calibração,

realizada com espermatozoides haploides de *Astyanax altiparanae*.

Para análise da ploidia por citogenética em larvas haploides, foram separados 20 embriões no estágio de segmentação, mantidos durante quatro horas em 0,5 gramas de colchicina diluída em 60 ml de água destilada. Após quatro horas, o córion foi retirado com auxílio de pronase a 0,05% e, posteriormente, as larvas foram sacrificadas com solução Eugenol (0.1 g L<sup>-1</sup>) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) e dissociadas individualmente (por inteiro) em placa de Petri contendo 7mL de solução hipotônica KCl (0,075 M). O material foi transferido para tubo de centrifuga e mantidos em estufa a 37°C por 21 minutos.

Para a confirmação da ploidia em peixes do grupo controle e ginogenético, foram selecionados sete animais de cada tratamento (N=14) com 90 dias de idade. Os peixes foram injetados com duas doses de fermento biológico diluído em água destilada e sacarose, com intervalos de 24 horas entre injeções. 24 horas após a aplicação da segunda dose da solução fermento biológico +sacarose, foi administrado via intramuscular 1000 uL de colchicina em cada animal.

O rim cranial de cada peixe foi retirado por processamento de rotina em citogenética, dissociados de forma individual em placa de Petri contendo 7 mL de solução KCl (0,075 M) e mantido em tubo de centrifugação em estufa a 37°C por 50 minutos. As etapas de fixação com metanol e ácido acético (3:1) e a coloração através de GIEMSA 5% (em ambos os processos) seguiram protocolos descritos por FORESTI et al. (1993).

## 2.6 Genotipagem

Para análise de genotipagem foram utilizados os parentais macho e fêmea, 8 larvas do grupo controle e 8 larvas do grupo ginogenético resultantes da eclosão da segunda repetição obtida neste experimento. As larvas com 15 dias de idade tiveram o DNA extraído por meio do kit E.Z.N.A. Tissue DNA kit® (Omega), de acordo com instruções do fabricante.

Foram realizadas duas amplificações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em volume total de 50 ul usando 200 ng de DNA genômico, Tag recombinante (Invitrogen). As reações de amplificação foram realizadas usando 35 ciclos de 45 s a 94 ° C, 30 s a 55 ° C e 45 s a 72 ° C. A primeira reação, foi realizada com DNA dos parentais macho e fêmeas mais os iniciadores específicos para regiões de microssatélite de *Astyanax altiparanae* (Zaganini et al., 2012) mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição de loco microssatélite, temperatura de anelamento e sequência de primer de *Astyanax altiparanae* (Adaptada Zagananie *et al.*, 2012).

	Sequência de Primer (5'-3')	Tamanho de banda (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
Asty 14	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	200	53
Asty11	TAAATCTATAAAAGTCACCAT TTTGTTTTTCTGCCGCTGTTT	151	50
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCCGAAATG ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	163	58
Asty 13	AAATGGGTGCAAGCAACG TGCCTGTCTGTAAGCATGTG	160	58
Asty 15	CAACTTTTACTTAAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	22	50
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA AGAGGGCATCATTGTACATTTTTG	165	52
Asty 21	TTTATGGGGACCGTGAGATGTGC CAGGGGCAGCGGTGATACCT	150	57
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	160	52
Asty 24	AGACCAAACACTAGGGCTCAG TTCGTCAATCTTCTTTCACTCTT	139	52
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	190	58
Asty 27	GCATTGTTTCAGGTTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	150	58

Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% e posteriormente em poli(acrilamida) a 12%, corados com SYBR Safe (Invitrogen, Groningen, Holanda) e visualizados usando o sistema de documentação de gel ENDURO GD (LabNet, Edison, NJ, EUA).

A segunda amplificação foi realizada com o DNA dos parentais, progênies do grupo controle e ginogenética, com o iniciador da região de microssatélite Asty 21. Os amplicons dos parentais e progênies do grupo controle e ginogenético com iniciador Asty 21, foram separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) a 12% e visualizado em usando o sistema de documentação de gel ENDURO GD.

## **2.7 Desempenho produtivo**

Para as análises de desempenho produtivo, todos os animais do grupo controle e ginogenético diploide tiveram as medidas de comprimento total e padrão (cm) mensuradas. Para a composição do rendimento de carcaça (%), foi coletado de forma individual, o peso vivo (g) e o peso da carcaça eviscerada (g) de todos os animais que compunham os tratamentos experimentais. Por fim, as gônadas foram coletadas e pesadas para posterior cálculo de índice gonadossomático (IGS%).

## **2.8 Histologia e Proporção Sexual**

Para as análises histológicas, foram utilizadas amostras do grupo controle (n=60) e ginogenético diploide (n=31) todos com 90 dias de idade. Após a coleta de todas as características descritas no item 2.7, os animais foram sacrificados com solução de Eugenol (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) a 100 mg/L<sup>-1</sup> e tiveram suas gônadas retiradas, fixadas em Bouin (solução Líquido de Bouin, Cinética, Londrina, Brasil), desidratadas em concentrações crescentes de 70%, 80%, 95% e 100% de Etanol e clareadas com Xilol (Êxodo científica, Hortolândia, Brasil). Posteriormente, as amostras foram incluídas em Paraplast (Paraplast®, Sigma, St. Louis, EUA), cortadas em seções de 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina.

A análise de proporção sexual do grupo controle e ginogenético diploide, foi baseada na identificação visual, presença de testículos em machos e ovários em fêmeas. Além disso, características morfológicas e a presença de gametas femininos e masculinos em cortes histológicos foram utilizados para diferenciação sexual.

## **2.9 Morfologia externa e interna**

A morfologia externa de peixes do grupo controle e ginogenético diploide foram fotografadas e classificadas em normal e anormal, de acordo com a posição da coluna vertebral. A comparação da morfologia óssea, incluindo disposição da coluna vertebral (presença de anomalias) e conformação cranial foram realizadas por radiografias realizadas em raio x portátil modelo PXP 40 HF plus (ABLA® Import, São Paulo, São Paulo) em peixes do grupo controle e ginogenético diploide.

## **2.10 Análise estatística**

Os dados são apresentados como média ± EP. Os dados de desenvolvimento embrionário e desempenho produtivo 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). A proporção sexual foi analisada por meio de teste de qui-quadrado. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 10 (Statisoft Inc., Tulsa, EUA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Desenvolvimento embrionário, choque térmico e sobrevivência

A embriogênese de cada tratamento foi dividida nos estágios de zigoto, blástula, gástrula, segmentação e eclosão. As taxas de sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* do grupo controle, ginogenético haploide (1n), ginogenético diploide (2n) e tetraploide (4n) são descritas na Tabela 2.

Os embriões do grupo controle, inicialmente apresentaram um aumento do espaço perivitelínico, migração e rearranjo do citoplasma no polo animal (Figura 2A).

A blástula, com 32 blastômeros dispostos de forma irregular na porção central do blastodisco em um plano 4 x 8, paralelo a primeira clivagem. (Figura 2B). O estágio de blástula correspondeu o padrão descrito para espécie (Figura 2C).

O estágio de gástrula, foi descrito o recobrimento de 70% do vitelo e a formação do escudo embrionário (Figura 2D). Por fim, durante o estágio de segmentação, foi observada a formação e diferenciação da região cranial e caudal e o surgimento da vesícula ótica (Figura 2E).

O grupo controle durante o desenvolvimento embrionário nos estágios de fertilização, blástula, gástrula e segmentação, apresentaram altos índices de sobrevivência com  $97,56 \pm 1,03\%$ ;  $97,56 \pm 1,03\%$ ;  $93,62 \pm 2,31\%$ ;  $91,20 \pm 1,92\%$ ;  $88,69 \pm 1,81\%$ ; respectivamente.

Além disso, foram observados percentuais satisfatórios de eclosão ( $80,52 \pm 2,28\%$ ), com alta porcentagem de larvas normais ( $96,73 \pm 2,22\%$ ) acompanhado de baixo percentual de larvas anormais ( $3,27 \pm 1,01\%$ ) (Figura 3A).

**Tabela 2.** Desenvolvimento embrionário do grupo controle, ginogenético haploide, ginogenético diploide e tetraploide de *Astyanax altiparanae*, durante os principais estágios e suas respectivas ploidias (%).

Desenvolvimento Embrionário (%)												
Tratamentos	Nº Oócitos	Não fertilizado	2-Células	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normal	Anormal	Ploidia		
										1n	2n	4n
<sup>1</sup> Controle	85	2,44 ± 1,03	97,56 ± 1,03	93,62 ± 2,31	91,20 ± 1,92	88,69 ± 1,81	80,52 ± 2,28 <sup>a</sup>	96,73 ± 2,22 <sup>a</sup>	3,27 ± 1,01 <sup>a</sup>	0,00	100,00	0,00
<sup>2</sup> Haploide	86	2,67 ± 1,43	97,33 ± 1,43	91,47 ± 2,29	81,40 ± 3,79	72,85 ± 4,20	20,48 ± 3,12 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	100,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	100	0,00	0,00
<sup>3</sup> Ginogenético 2n	93	1,54 ± 0,83	98,46 ± 0,83	91,55 ± 2,59	82,41 ± 3,96	46,42 ± 5,70	26,50 ± 2,50 <sup>b</sup>	36,62 ± 3,42 <sup>ab</sup>	63,38 ± 3,42 <sup>ab</sup>	1,35	98,64	0,00
<sup>4</sup> Tetraploide	80	3,62 ± 1,13	95,88 ± 1,44	90,24 ± 2,36	81,89 ± 1,99	58,65 ± 3,53	17,8 ± 4,11 <sup>b</sup>	50,08 ± 4,27 <sup>ab</sup>	49,92 ± 2,52 <sup>ab</sup>	0,00	62,75	37,25

**Legenda:** <sup>1</sup> Grupo controle: Oócitos fertilizados com sêmen fresco.

<sup>2</sup> Haploide: Oócitos fertilizados com sêmen irradiado sem aplicação de choque térmico.

<sup>3</sup> Ginogenético diploide: Oócitos fertilizados com sêmen irradiados submetidos a choque térmico 24 mpf a 40°C durante 2 min.

<sup>4</sup> Tetraploide: Oócitos fertilizados com sêmen fresco submetidos a choque térmico 24 mpf a 40°C durante 2 min.

O grupo controle indica ovos intactos, fertilizados com sêmen sem tratamento e mantidos a temperatura pré choque de 26°C. Os demais tratamentos foram mantidos em temperatura pré choque de 22°C. As porcentagens e o número de ovos representam uma média de quatro repetições, cada uma usando diferentes reprodutores. Valores com letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

Os embriões do tratamento haploide apresentaram inúmeras formações irregulares quando comparados aos mesmos estágios do desenvolvimento embrionário do grupo controle. Foi observado que na fase de 32 blastômeros, correspondente ao estágio de clivagem, a maioria das amostras apresentavam 12 a 26 blastômeros, dispersos em todo o perímetro do embrião com tamanho irregulares, sinalizando divisões celulares incompletas (Figura 2G).

A irradiação comprometeu o desenvolvimento dos blastômeros, que se desenvolveu irregularmente e apresentou características incompatíveis com o estágio de 32 blastômeros, e resultando em formações irregulares nos estágios consecutivos, como o não surgimento do anel germinativo, sem movimentos de epibolia (Figura 2I).

O comprometimento morfofisiológico foi evidenciado pelo desenvolvimento irregular dos eixos embrionários craniocaudal e laterolateral, possivelmente resultado do estado haploide. Durante a segmentação, não ocorreu desenvolvimento da vesícula ótica e foi observada a formação irregular da cauda (quando houve formação) (Figura 2J).

Essa série de eventos anormais observada no desenvolvimento embrionário, culminou na eclosão de larvas com acentuada torção na região caudal, região cárdica visivelmente aumentada e com alteração na deposição do vitelo (Figura 3B), contribuindo para um baixo percentual de eclosão ( $20,48 \pm 3,12\%$ ) e alto percentual de larvas anormais ( $98,53 \pm 3,11\%$ ).

No entanto, a irradiação e o choque térmico para o restabelecimento da ploidia afetou o desenvolvimento dos embriões do tratamento ginogenético mitótico, já que 80% dos embriões apresentaram atrasos na divisão celular, o que resultou no atraso do surgimento do estágio de 32 células (55 minutos). Os blastômeros foram incompatíveis em características de tamanho, forma, cor (translucidez) (Figura 2L) e apenas 20% dos embriões de fato chegaram ao estágio de 32 células.

O estágio de gástrula foi marcado por consecutivos atrasos e malformações observadas no escudo embrionário. Além disso, foi observada a incompleta cobertura do saco vitelino, atrasos na epibolia e a supressão da diferenciação dorsoventral (Figura 2N).

Durante o estágio de segmentação, foi observado o atraso do surgimento da vesícula ótica em 30% dos embriões, atraso e ausência (alguns casos) da formação da região craniocaudal (Figura 1O), resultando em alto percentual de mortalidade durante o estágio da segmentação ( $46,42 \pm 5,70\%$ ) e eclosão. Os eventos anteriormente descritos resultaram na eclosão de larvas ginogenéticas diploides com anomalias na região caudal e cranial (Figura 3C), contribuindo para menor percentual de eclosão e de larvas normais, e com aumento no percentual de larvas anormais.

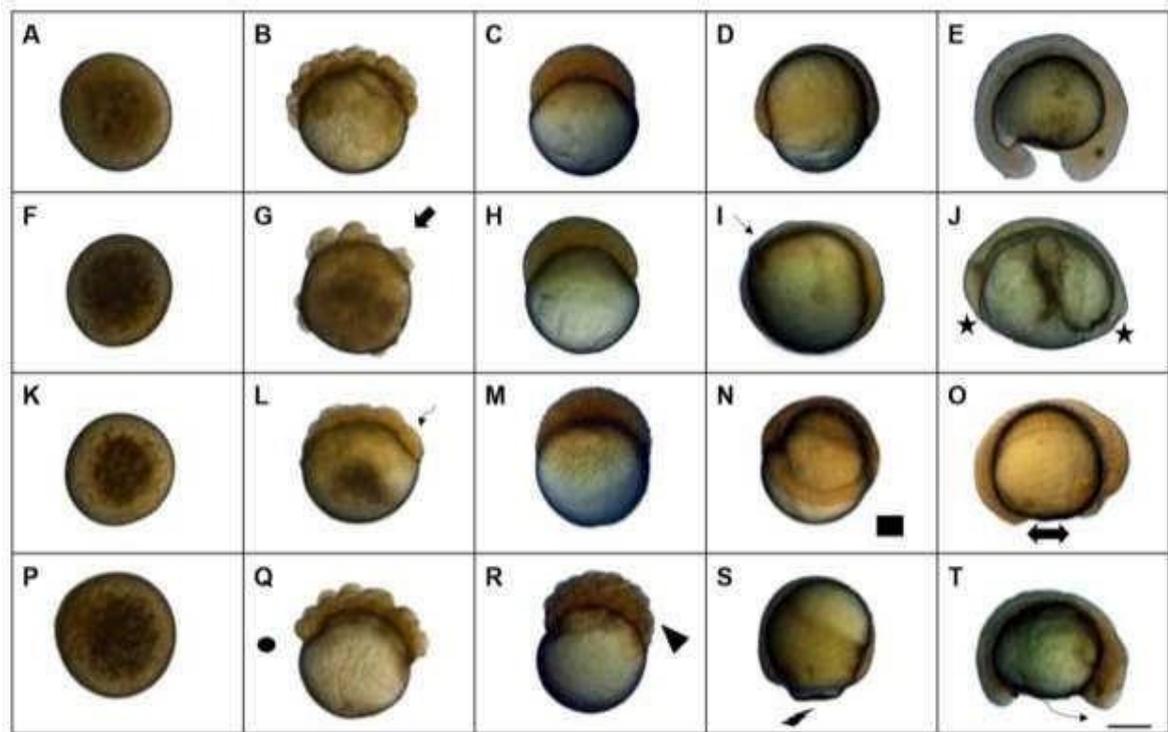
O tempo de aplicação e o choque térmico afetou negativamente o desenvolvimento dos embriões do tratamento tetraploide. No estágio de blástula, foi observado número reduzido de blastômeros (Figura 2R). Além disso, durante o estágio de gástrula, ocorreu o atraso e fechamento incompleto do blastóporo em 70,15 % dos embriões analisados (Figura 2S).

Durante a segmentação, foi observado atraso no desenvolvimento inicial da cauda e 30,54% dos embriões também apresentaram atrasos no surgimento da vesícula ótica (Figura 2T).

As variações morfológicas resultantes da aplicação do choque térmico em embriões

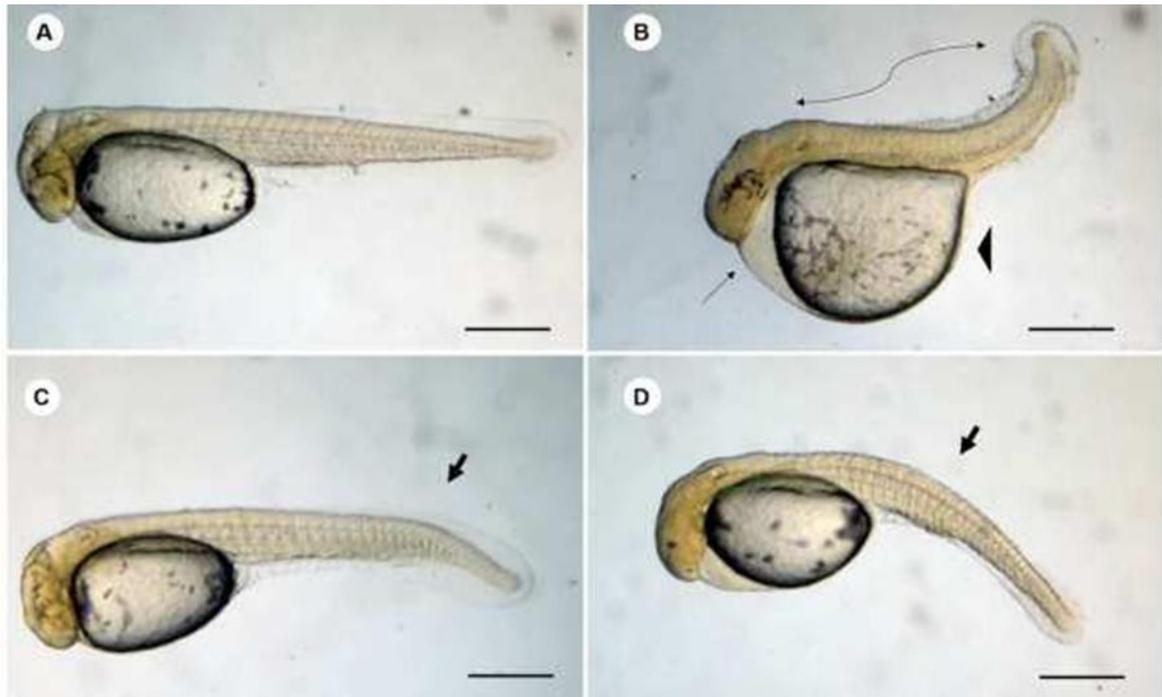
tetraploides resultaram na eclosão de larvas com formações acentuadas na região caudal (Figura 2D), o que proporcionou um menor percentual de eclosão ( $17,8 \pm 4,11\%$ ) e percentual de  $50,08 \pm 4,27\%$  de larvas normais e de  $49,92 \pm 2,52\%$  de larvas anormais.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos avaliados para a porcentagem de oócitos não fertilizados ( $P = 0,2449$ ), em estágio de clivagem ( $P = 0,1996$ ), blástula ( $P = 0,8674$ ), gástrula ( $P=0,5559$ ) e segmentação ( $P = 0,0509$ ). No entanto, apesar de não significativa, foi observada diferença morfológica entre os tratamentos avaliados, principalmente durante o estágio de segmentação ( $88,69 \pm 1,81\%$ ;  $72,85 \pm 4,20\%$ ;  $46,42 \pm 5,70\%$ ;  $58,65 \pm 3,56\%$ ), respectivamente.



**Figura 2.** Desenvolvimento embrionário do grupo controle, ginogenético haploide, ginogenético diploide e tetraploide de *Astyanax altiparanae*, durante os estágios de clivagem, blástula, gástrula e segmentação. Escala: 200  $\mu\text{m}$ .

**Legenda: Grupo controle:** As características de todos os estágios são compatíveis as descritos para *Astyanax altiparanae* por Pereira-Santos et al., (2016) **A:** diferenciação do polo animal; **B:** a divisão celular do embrião em 32 células disposta em 4x8; **C:** blástula; **D:** gástrula, epibolia recobrendo 70% do vitelo e formação do escudo embrionário; **E:** segmentação, formação da cauda e vesícula óptica. **Ginogenético haploide:** **F:** diferenciação do polo animal; **G:** a seta indica divisão irregular e tardia dos blastômeros originando formações incompatíveis com a fase de 32 células; **H:** blástula; crescimento sincrônico dos blastômeros; **I:** gástrula, seta fina indica movimentos assíncrônicos de epibolia, região responsável pela diferenciação da região cranial e caudal; **J:** segmentação, as estrelas indicam má formação na região craniocaudal. **Ginogenético diploide:** **K:** diferenciação do polo animal; **L:** blástula, a seta em forma de Sindica um atraso na divisão celular, formação irregular e assíncrônica das células da clivagem; **M:** blástula; **N:** gástrula, a seta dupla grossa em s representa a formação incorreta do escudo embrionário, anel germinativo e a incompleta cobertura do saco vitelino; **O:** segmentação, a seta dupla indica formações irregulares na região de formação cranial e caudal sem o surgimento da vesícula óptica. **Tetraploide:** **P:** diferenciação do polo animal; **Q:** a circunferência preenchida aponta atraso na divisão das células do embrião; **R:** blástula, o triângulo representa número reduzido e atraso na involução dos blastômeros; **S:** gástrula, o raio representa o desenvolvimento do blastoderme recobrendo 70% do vitelo e o incompleto fechamento do blastoporo; **T:** segmentação, a seta dupla em S indica a formação inicial da cauda e a presença da vesícula óptica.

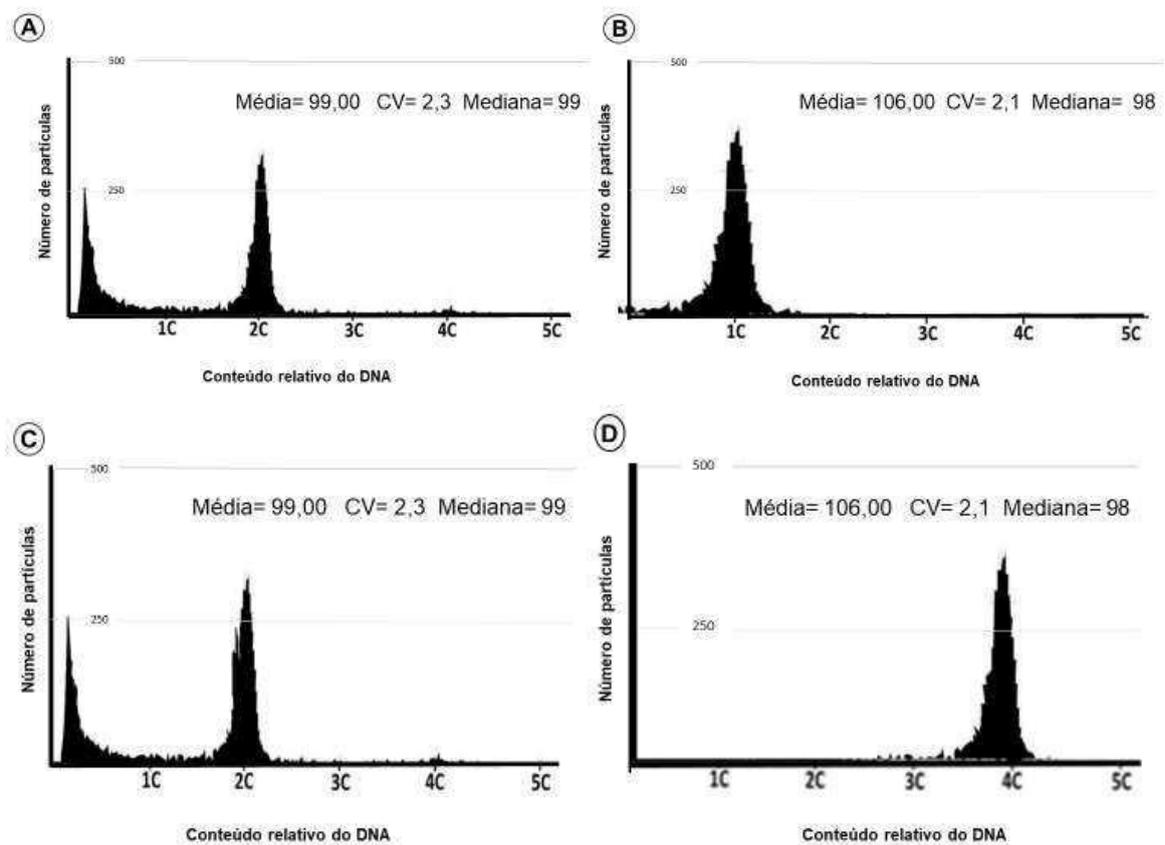


**Figura 3.** Larvas recém eclodidas de *Astyanax altiparanae* do grupo controle (A), grupo haploide (B), ginogenético (C) e tetraploide (D). Cabeça de seta indica: anomalia na deposição do vitelo; Seta dupla em s indica: lordose severa; Seta indica: anomalia na região cárdica; Seta grossa indica: a presença de anomalias na coluna vertebral. Escala: 500  $\mu$ m.

### 3.2 Confirmação da ploidia

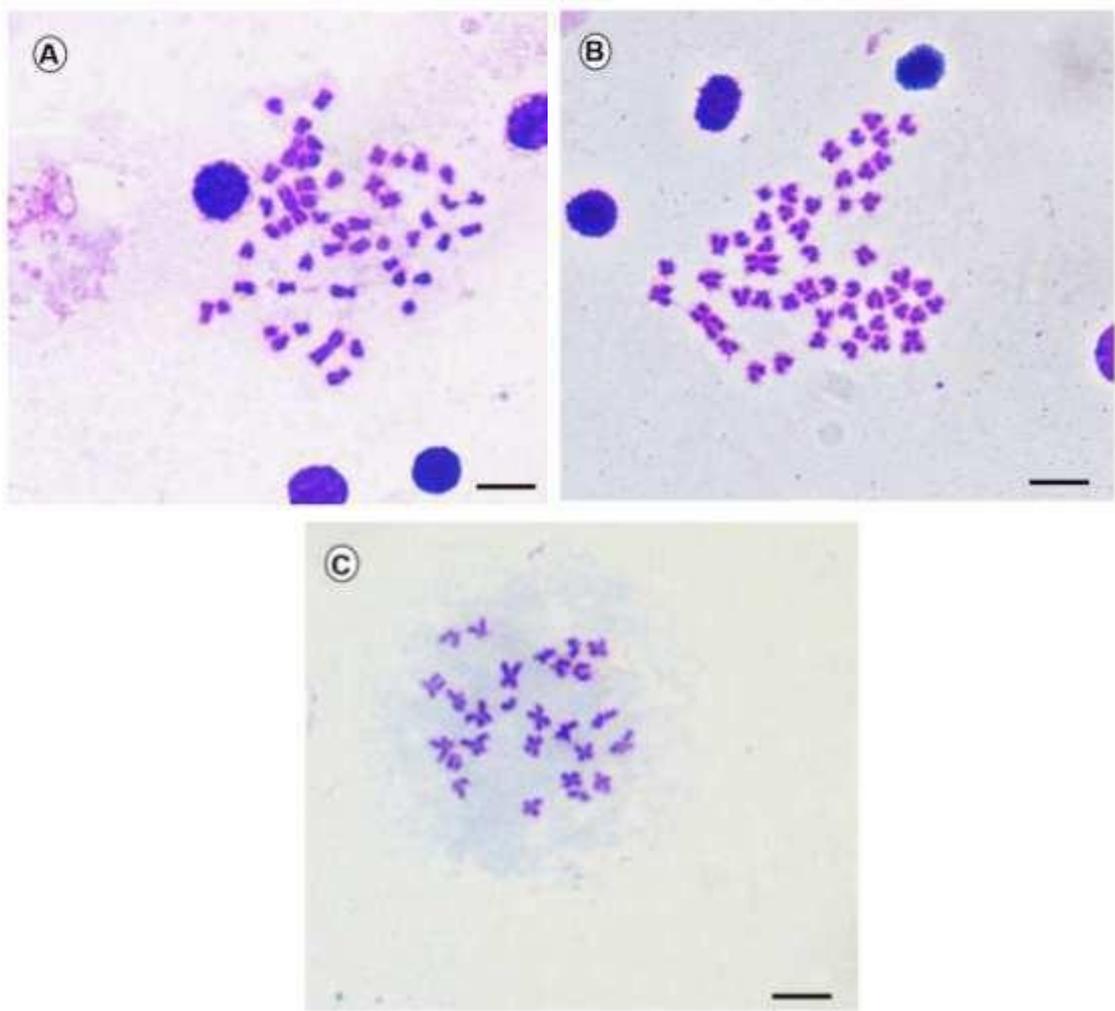
Os dados obtidos por meio de análise de citometria de fluxo realizada em larvas recém-eclodidas de cada tratamento estão expressos na figura 4. Como esperado, 100% dos indivíduos do grupo controle se confirmaram diploides. Além disso, todas as larvas do grupo haploide se confirmaram 100% haploides, reafirmando a eficácia da inativação do genoma paterno neste protocolo de ginogênese mitótica.

No grupo ginogenético 98,75% dos indivíduos se confirmaram diploides com o surgimento de um indivíduo haploide. Esse resultado mostra a eficiência do choque aplicados a 24 mpf na recuperação do estado diploide dos embriões. Já o choque para indução a tetraploidia, resultou em 37,25% de indivíduos tetraploides, sendo 62,75% dos peixes diploides.



**Figura 4.** Histograma de citometria de fluxo de larvas recém-eclodias de *Astyanax altiparanae* do grupo controle (A), haploide (B), ginogenético (C) e tetraploide (D).

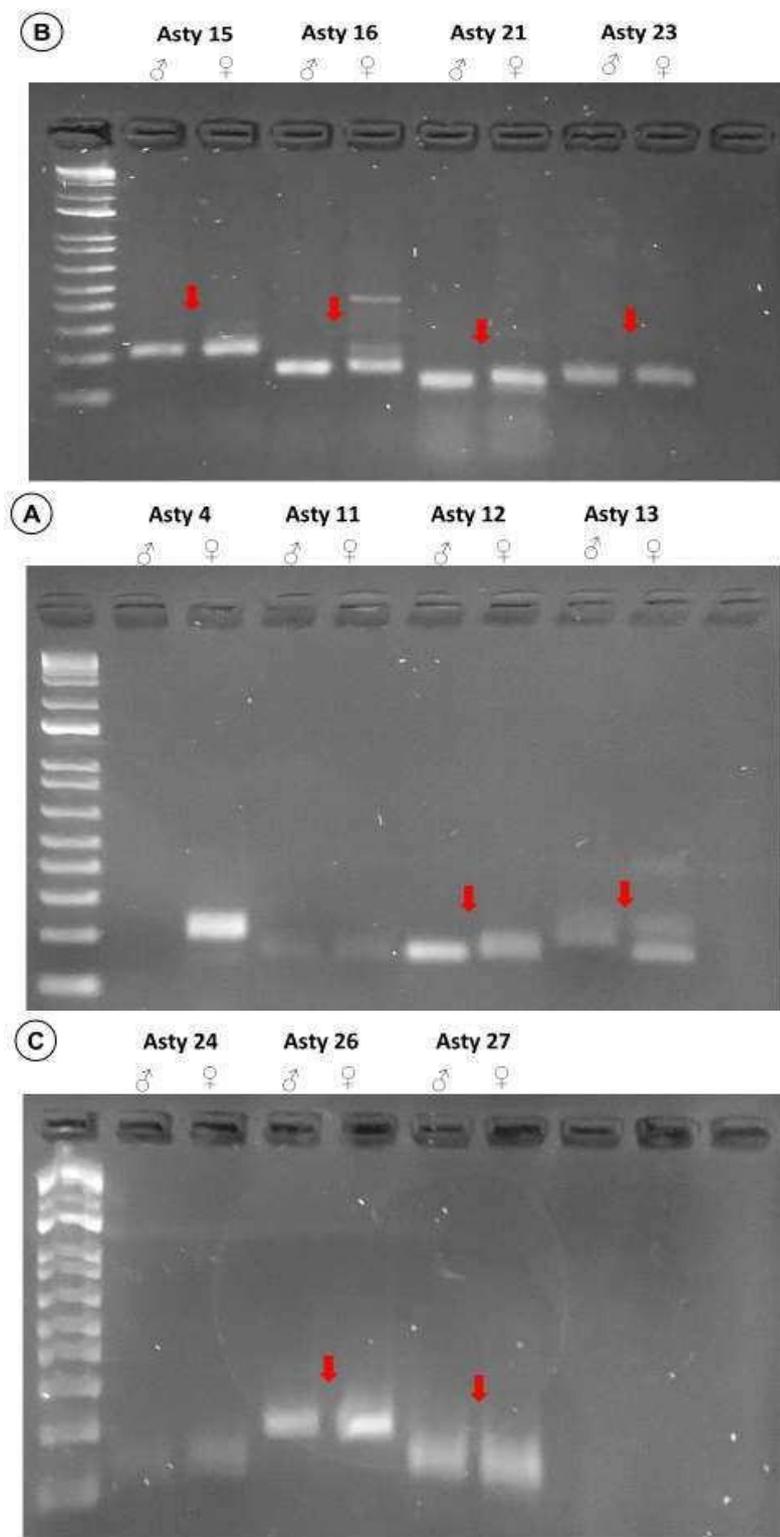
As análises em citogenética evidenciaram cariótipos de *Astyanax altiparanae* do grupo controle, ginogenético diploide e ginogenético haploide ( com 50, 50 e 25 cromossomos, respectivamente. Os resultados corroboram os dados obtidos pela análise em citometria.



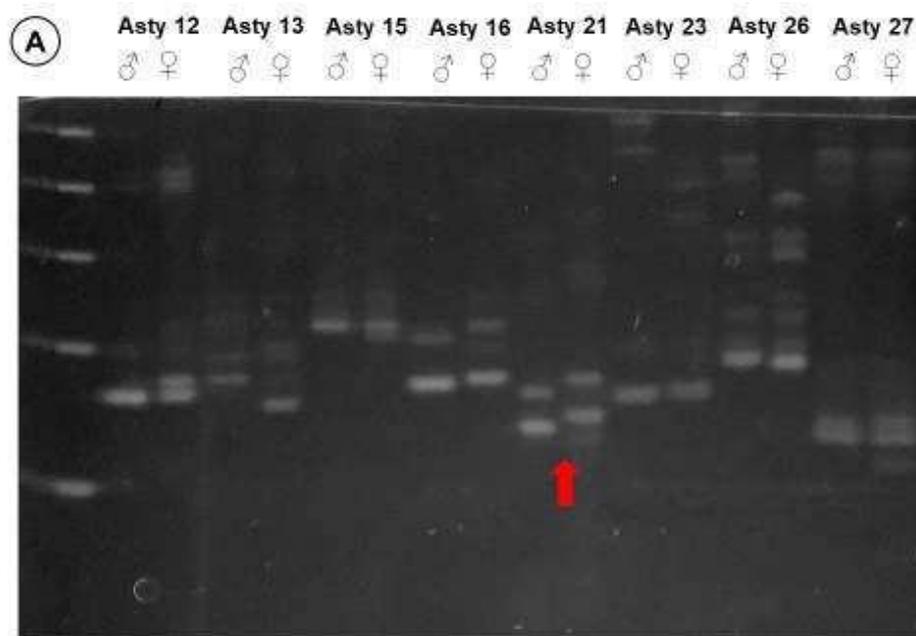
**Figura 5.** Cariótipos diploide e haploide de *Astyanax altiparanae* do grupo controle (A), ginogenético (B) e haploide (C) revelaram 50, 50 e 25 cromossomos, respectivamente. Escala: 100  $\mu$ m.

### 3.3 Análise molecular

O resultado da análise molecular com DNA analisado com primers Asty 4, 11, 12, 13, 15, 16, 21, 23, 24, 26 e 27 em gel de agarose a 1,4% são apresentados na Figura 6 e com primers 12, 13, 15, 16, 21, 23, 26 e 27 em gel de poliacrilamida 12% na Figura 7.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,4% corado em SYBER com produtos de PCR – DNA microssatélite de parentais machos e fêmeas de *A. altiparanae*, para os primers ASTY 4, 11, 12, 13, 15, 16, 21 e 23. Seta indica diferença entre bandas de parental paterno e materno.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado em SYBER com produtos de PCR – DNA microssatélite de parentais machos e fêmeas de *A. altiparanae*, para os primers ASTY 4, 11, 12, 13, 15, 16, 21 e 23, 26 e 27. Seta indica diferença entre bandas de parental paterno e materno.

### 3.4 Desempenho produtivo

Os resultados do desempenho produtivo do grupo controle e ginogenético diploide estão expressos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Desempenho de *Astyanax altiparanae* do grupo controle e ginogenético diploide. CT: comprimento total; CP: comprimento padrão; PT: peso total; IGS: índice gonadossômico e RC: rendimento de carcaça;

Características	Controle		Ginogenético diploide	P-valor
	Macho	Fêmea	Fêmea	
C.T (mm)	46,38 <sup>a</sup> ±1,47	49,63 <sup>a</sup> ±1,49	71,08 <sup>b</sup> ±1,67	0,0005
C.P (mm)	39,16 <sup>a</sup> ±1,20	42,36 <sup>a</sup> ±1,47	61,60 <sup>b</sup> ±2,00	0,0005
P.T (g)	02,16 <sup>a</sup> ±0,17	02,33 <sup>a</sup> ±0,21	5,74 <sup>b</sup> ±0,33	0,0003
IGS (%)	0,04 <sup>a</sup> ±0,01	0,05 <sup>a</sup> ±0,09	0,02 <sup>a</sup> ±0,01	0,7685
RC (%)	88,34 <sup>a</sup> ±2,01	88,28 <sup>a</sup> ±1,41	87,17 <sup>a</sup> ±1,44	0,5975

Legenda: Valores com letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa (ANOVA;  $P < 0,05$  e Tukey a 5%).

Foi observada diferença significativa para as características de comprimento total ( $P=0,003$ ), padrão ( $P=0,004$ ) e peso total ( $P =0,006$ ), respectivamente, em indivíduos ginogenéticos quando comparados ao tratamento controle.

No entanto, não foi observada diferença significativa para as mesmas características entre macho e fêmeas do grupo controle ( $P = 0,781$ ). Também não foi observada diferença significativa para o rendimento de carcaça (%) ( $P= 0,859$ ) e índice gonadossomático (IGS%) ( $P= 0,521$ ) entre os grupos controle e ginogenético diploide.

### 3.5 Proporção sexual

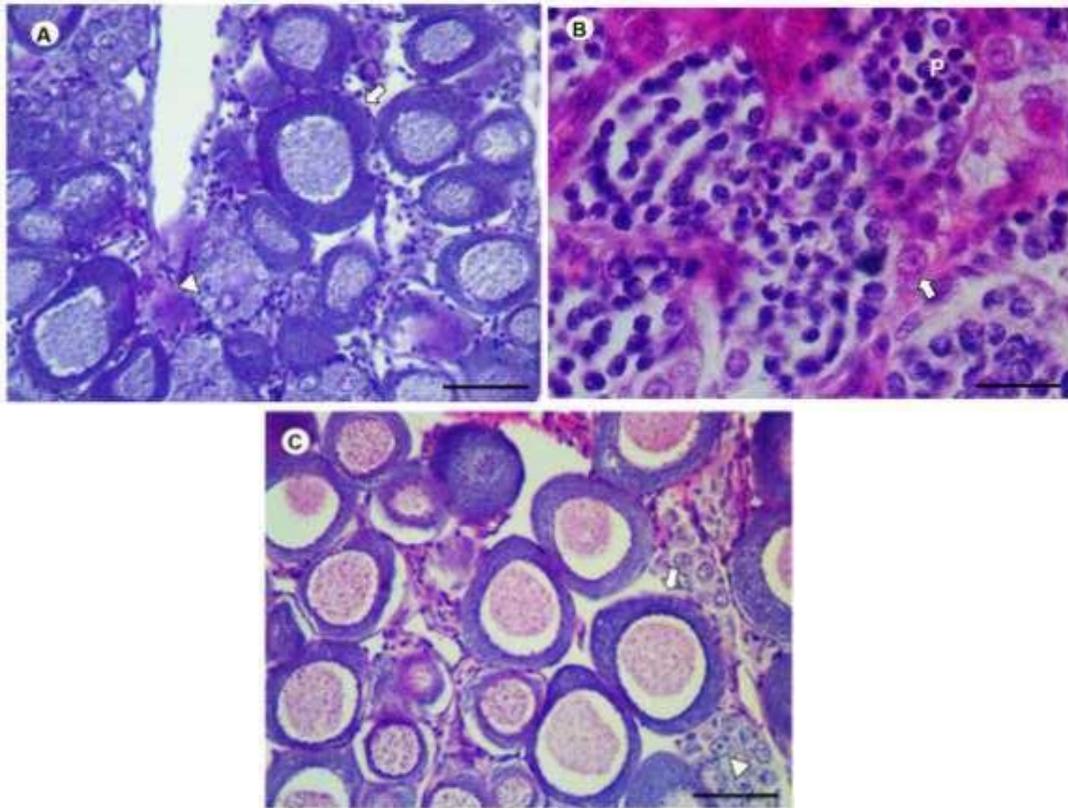
Conforme apresentado na Tabela 4, a proporção sexual dos indivíduos ginogenéticos da primeira e terceira repetição são de 100% fêmeas.

**Tabela 4.** Proporção sexual do grupo controle e ginogenético diploide de *Astyanax altiparanae*.

Repetição	2n Controle		
	Macho	Fêmea	Qui-quadrado
R1	25	36	0,0161
R2	32	25	0,3362
R3	21	22	1,0000
Repetição	Ginogenético diploide		
	Macho	Fêmea	Qui-quadrado
R1	0	12	1,0000
R2	1	10	0,7630
R3	0	9	1,0000

Na segunda repetição, ocorreu um macho, correspondendo a 12,5% do total de peixes do tratamento ginogenético diploide. Os resultados das análises histológicas de fêmeas do grupo controle evidenciaram os ovários repletos de oócitos pré-vitelogênicos, em vitelogênese primária e ninhos de oogônias, caracterizando a maturação sexual (Figura 8A).

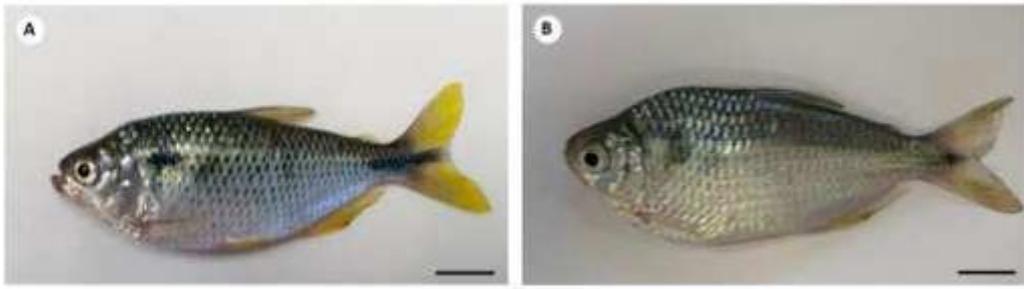
Os machos do grupo controle apresentaram espermatogônias, espermatídes e espermatócitos (Figura 8B). A morfologia dos ovários de fêmeas do grupo ginogenético diploide revelou a presença de oócitos pré-vitelogênicos e ninhos de oogônias (Figura 8C).



**Figura 8.** Histologia ovariana (A), testicular (B) do grupo controle e ovariana (C) do ginogenético diploide de *Astyanax altiparanae*. Figura A; Seta indica: oócito pré vitelogênico; cabeça de seta indica: ninho de oogônias; Figura B: seta indica espermatogônias e P: espermatócitos. Figura C: Seta indica oócitos pré vitelogênicos: Cabeça de seta indica: ninho de oogônias. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

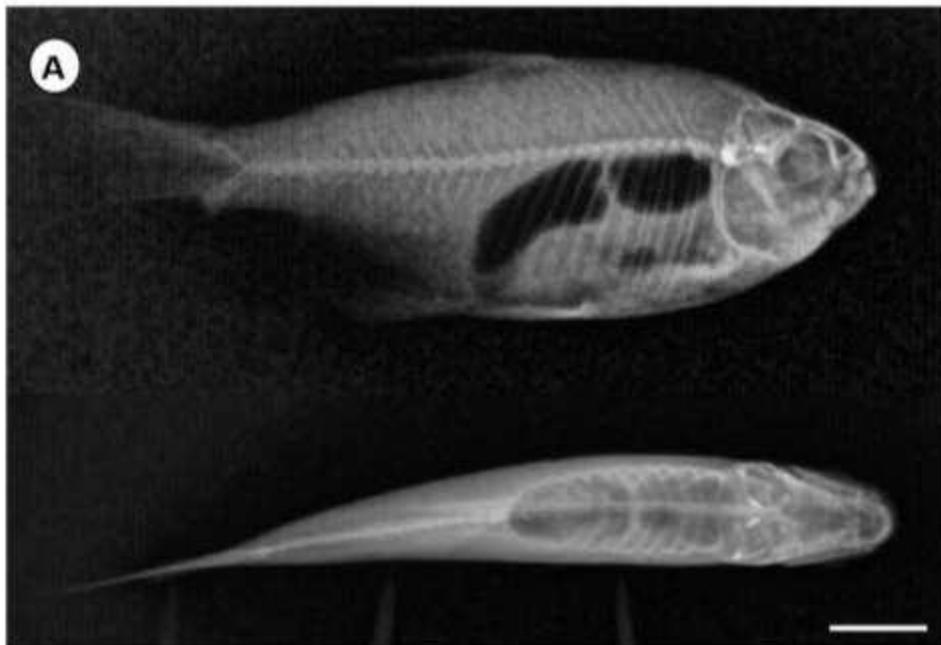
### 3.6 Morfologia externa e interna

Morfologia externa (Figura 9) e radiografias de peixes do grupo controle (Figura 10) e ginogenético diploide (Figura 11) de *Astyanax altiparanae*. Peixes do grupo controle não apresentaram anomalias na coluna vertebral e morfologia cranial.

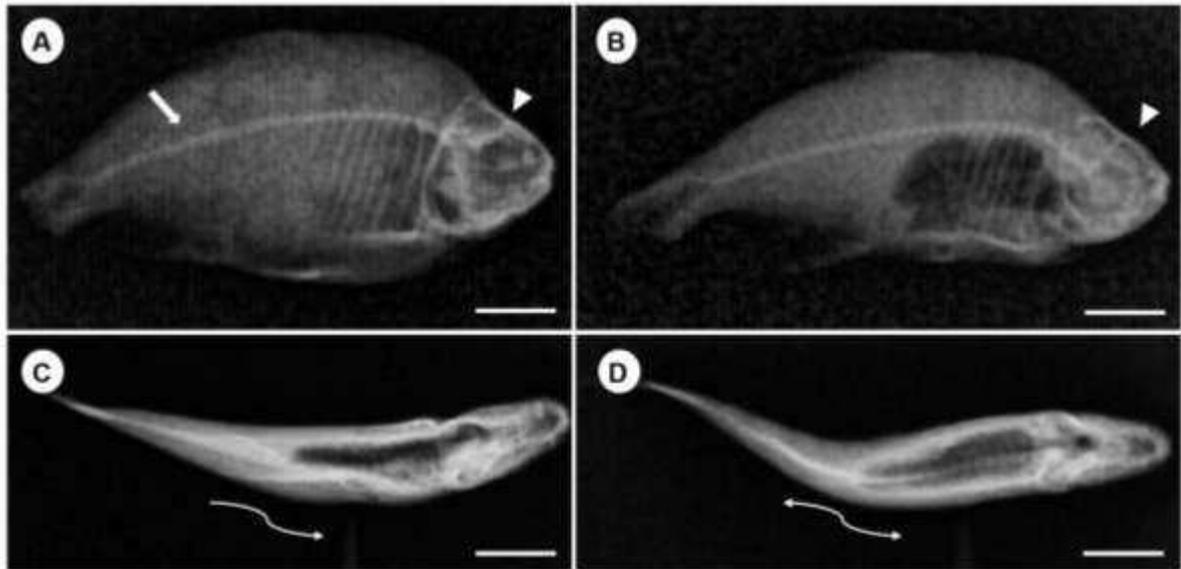


**Figura 9.** Morfologia externa de peixes do grupo controle (A) e ginogenético diploide (B) de *Astyanax altiparanae*.

Por outro lado, o tratamento de indução a ginogênese mitótica alterou a estrutura da coluna vertebral, com o surgimento de cifose nas vertebrae torácicas, formações irregulares da região cranial (Figura 11A; B), lordose acentuada e hiperlordose (Figura 11C; D), o que resultou em maior mortalidade entre os indivíduos durante o período experimental.



**Figura 10.** Projeção radiográfica laterolateral e dorso ventral (A) de peixes do grupo controle *Astyanax altiparanae*. Vista superior; **A:** Peixe com simetria lateral em vista superior; coluna normal sem a presença de lordose e cifose.



**Figura 11.** Projeção radiográfica laterolateral (A; B) e dorso ventral (C; D) de peixes ginogenéticos diploides em *Astyanax altiparanae*; **A e B:** Seta indica cifose acentuada nas vertebrae torácicas; cabeça de seta indica formações craniais irregulares. **Figura C e D:** Seta em “s” indica lordose moderada; Seta dupla em “s” indica hiperlordose.

## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados testes para indução de ginogênese mitótica em um caracídeo da região Neotropical utilizando espermatozoides irradiados e choque térmico para o restabelecimento da diploidia.

Quanto a embriogênese, os indivíduos do grupo controle de *Astyanax altiparanae* apresentaram altos índices de fertilização, taxa de eclosão e larvas normais, que são compatíveis ao descrito para a espécie por Pereira-Santos et al. (2016), o que sugere que qualquer variação nos estágios durante o desenvolvimento embrionário seja resposta aos tratamentos avaliados.

O protocolo de inativação espermática se mostrou eficaz, uma vez que 100% das larvas resultantes da eclosão do tratamento haploide apresentaram características da “síndrome haploide”, marcada por diversas anomalias morfológicas e morte logo após eclosão (TVEDT et al., 2006; PAN et al., 2017).

Esses resultados corroboram aos descritos por do NASCIMENTO et al. (2020) que em *A. altiparanae*, usando a mesma faixa de irradiação UV para inativação do genoma paterno, obtiveram 100% de indivíduos haploides. Tais dados comprovam a eficácia deste protocolo de irradiação para *A. altiparanae*.

O estado haploide resultou na eclosão de indivíduos com funções morfofisiológicas comprometidas, o que proporcionou aumento da mortalidade de indivíduos anormais quando comparado ao tratamento controle. Nas espécies *altiparanae* e *Salvelinus fontinalis* do NASCIMENTO et al. (2020) e JAGIELLO et al. (2018) encontraram maiores percentuais de larvas anormais ( $100,00 \pm 0,00\%$  e  $90,00 \pm 2,14\%$ ), respectivamente. Alguns autores apontam que o aumento da anormalidade e mortalidade de indivíduos haploides está relacionada a presença de genes letais recessivos deletérios no genoma haploide (FANKHAUSER, 1945; PURDOM, 1969; THORGGARD, 1983).

Por outro lado, Varadaraj (1993) sugeriu que, a alta taxa de anormalidade e mortalidade estão mais relacionadas a falta de genes homólogos em pares do que a presença de alelos letais. Além disso, segundo Luo e Li (2003) durante a morfogênese embrionária de vertebrados, os mecanismos de regulação da expressão de genes responsáveis pela morfologia não são baseados em um, mas em dois conjuntos de cromossomos.

Em estudos de indução a ginogênese, a condição diploide deve ser restaurada pela aplicação de choques de pressão ou térmicos (KOMEN e THORGAARD, 2007). Em nosso estudo, utilizamos procedimento de choque térmico usado por do NASCIMENTO et al. (2020) para a indução a tetraploidização em *A. altiparanae*; logo, obtivemos ginogenéticos mitóticos através da supressão da primeira clivagem mitótica.

Neste estudo, os atrasos e malformações resultaram no aumento de larvas anormais ( $63,38 \pm 3,42\%$ ) e menor sobrevivência ( $26,50 \pm 2,50\%$ ) de indivíduos presumidamente ginogenéticos mitóticos. A baixa sobrevivência de indivíduos do tratamento de ginogênese mitótica também foi relatada em *Salvelinus fontinalis* ( $12,1 \pm 1,5\%$ ) (JAGIELLO et al., 2021), *Oncorhynchus mykiss* ( $21,1 \pm 1,08$ ) e *Salmo trutta* ( $25,3 \pm 1,17\%$  e  $23,7 \pm 4,24\%$ ) (Poloniset al., 2018; JAGIELLO et al., 2017), demonstrando que apesar de promissores, a viabilidade de linhagens ginogenéticas mitóticas, independente da espécie, ainda são baixas. Esses resultados podem ser justificados pelos fatores genéticos, como o aumento da consanguinidade, e a

efeitos colaterais da aplicação do choque térmico para o restabelecimento do estado diploide.

A alta incidência de variações morfofisiológicas, incluindo anomalias esqueléticas como lordose, escoliose e cifose está intimamente ligada a redução da heterozigose em peixes (JAGIELLO *et al.*, 2018), como observado em *Paralichthys olivares* (WU *et al.*, 2021), *Salvelinus fontinalis* (JAGIELLO *et al.*, 2021) *Oreochromis Aureus* (SHIRAK *et al.*, 2012) e *Danio rerio* (DIEKMANN e NAGEL, 2005).

Além disso, YAMAHA *et al.* (2002) verificaram que o choque para o restabelecimento da ploidia resulta em atrasos na epibolia e supressão da diferenciação dorsoventral, evento prontamente observado neste estudo que possivelmente favoreceu a baixa sobrevivência no desenvolvimento embrionário de peixes do grupo presumidamente ginogenéticos diploides. Diante dessa marcante característica de viabilidade, as linhagens ginogenéticas mitóticas foram produzidas apenas em um número limitado de espécies de salmonídeos.

Foi observada uma pequena variação na proporção sexual do segundo grupo de presumidamente ginogenético mitótico, com o surgimento de um indivíduo macho (12,5%). Essa variação pode ser justificada por fatores externos como pH, temperatura, densidade de estocagem e cortisol (RUBIN, 1985; FERNANDINO *et al.*, 2013 e 2012; DEVLIN E NAGAHAMA, 2002), uma vez que 100% dos indivíduos se confirmaram haploide por citometria de fluxo e citogenética, além de não terem expressado herança paterna, o que descarta a irradiação incompleta dos espermatozoides.

A variação na proporção sexual observada no presente estudo de indução a ginogênese mitótica e a anteriormente relatada em protocolo de ginogênese meiótica (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020), ambos em *A. altiparanae*, evidenciam que as fêmeas da espécie são homogaméticas (XX). Esses resultados são promissores e auxiliam no esclarecimento da determinação sexual em *A. altiparanae* e outros caracídeos da região neotropical que são classificados sexualmente através do sistema XX. Porém, mais estudos ainda são necessários para esclarecer fatores genéticos e ambientais que influenciam na diferenciação sexual em peixes.

Em *A. Altiparanae*, o número diploide é constante em suas populações, sendo  $2n=50$  cromossomos (KAVALCO *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2014). Neste estudo, os resultados da análise de citogenética mostraram que os cariótipos diploides do grupo controle, haploide e presumidamente ginogenético revelaram 50, 25 e 50 cromossomos, respectivamente. Esses resultados reafirmam a eficácia da análise de citometria de fluxo, evidenciando a eficiência das mesmas em estudos de manipulação cromossômica, como os de indução a ginogênese.

Os resultados aqui apresentados mostram que os indivíduos presumidamente ginogenéticos mitóticos analisados não apresentaram herança paterna. No entanto, a quantidade de DNA extraída foi insuficiente para realizar o sequenciamento genético, impedindo a verificação do nível de homozigose das proles obtidas no presente estudo.

Neste estudo, os resultados histológicos dos presumidamente ginogenéticos diploides revelaram a presença de oócitos. Embora o achado seja indícios de desenvolvimento gonadal, mais estudos são necessários para esclarecer os efeitos da supressão da primeira clivagem mitótica no desenvolvimento reprodutivo e gonadal de ginogenéticos em *A. altiparanae*.

Sobre os aspectos produtivos, no presente trabalho as fêmeas do grupo presumidamente ginogenético foram maiores quando comparadas as fêmeas do grupo controle. Isso pode ser justificado pela homogeneidade do lote, uma vez que os lotes de estoque de ginogenéticos eram formados majoritariamente por fêmeas. Além disso, a alta mortalidade

observada no grupo ginogenético diploide, contribuiu para um melhor ajuste de densidade populacional, favorecendo maior crescimentos para esses animais quando comparadas as fêmeas do grupo controle.

Neste estudo, a aplicação de choque com 24 mpf afetou diretamente a porcentagem de eclosão ( $17,8 \pm 4,11\%$ ) e resultou um baixo percentual de indivíduos tetraploides (37,25%). A diminuição da sobrevida observada durante a tetraploidização é comumente relatada em outras espécies (SAKAO *et al.*, 2006) e após a eclosão, vários estudos não mostraram nenhuma sobrevivência no início da alimentação (HANIFFA *et al.*, 2004; SAKAO *et al.*, 2006; GIL *et al.*, 2016). Além disso, a baixa sobrevivência de tetraploides pode estar relacionada com o desenvolvimento assíncrono ou alta homozigose (ZHANG e ONOZATO, 2004; FUJIMOTO *et al.*, 2013; PANDIAN e KOTEESWARAN, 1998).

Os resultados obtidos pela análise de microssatélites foram inconclusivos quanto a verificação da homozigose dos indivíduos obtidos. Dessa forma, destaca-se que não é possível concluir que o protocolo apresentado resulta na formação de indivíduos ginogenéticos mitóticos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOV, N.S. *et al.* Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock :**Tools for Conservation and Aquaculture**. v.48, n. 5, p. 741-750, 2017.
- BERTOLINI, R. M. *et al.* Strategies for aquaculture and conservation of Neotropical catfishes based on the production of triploid *Pimelodus maculatus*. *Aquaculture International*. Dordrecht: **Springer**, 12, v. 28, n. 1, p. 127-137, 2019.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v.208, n 3-4, p. 191–364, 2002.
- DIEKMANN, M. e NAGEL, R. Different survival rates in zebrafish (*Danio rerio*) from different origins. **Journal of Applied Ichthyology**, v.21, p.451–454, 2005.
- DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v. 514, p. 734-432, 2020.
- DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. **Zygote**, v.25, n.4, p. 537-544, 2017b.
- DUNHAM, R. A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Oxford: GABI Publishing, 2004.
- FANKHAUSER, G. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. **Quarterly Review of Biology**, v. 20, n.1, p. 20-78, 1945.
- FERNANDES, C. A. *et al.* Cytogenetic and Morphometric Analysis in the Species *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Iguatemi River Basin, Brazil. **Folha biológica**, v.62, n.3, p.193-201, 2014.
- FERNANDINO, J. I. *et al.* Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation, Review. **General and Comparative Endocrinology**, v.192, p.36–44, 2013.
- FERNANDINO, J. I. *et al.* The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase as a key enzyme. **Endocrinology**, v.153, n. 12, p.6003-6011, 2012.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. e DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 810-813, 1993.
- FUJIMOTO, T.; SAKAO, S.; OSHIMA, K.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Heat-shock-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic in pond loach, *Misgurnusanguillicaudatus*. **Aquaculture international**, v. 21, n. 4, p. 769-781, 2013.
- GIL, H. *et al.* Cytogenetic study of diploid and induced tetraploid in Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii*. **Springer Plus**, v. 5, n. 1, p. 186, 2016.

- HANIFFA, M. A.; SRIDHAR, S. e NAGARAJAN, M. Induction of triploidy and tetraploidy in stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using heat shock. **Aquaculture research**, v. 35, n. 10, p. 937-942, 2004.
- JAGIELLO, K. *et al.* Developmental competence of eggs produced by rainbow trout Doubled Haploids (DHs) and generation of the clonal lines. **Reproduction. Domestic Animal**, v. 53, p. 1176–1183, 2018.
- JAGIELLO, K. *et al.* High rate of deformed larvae among gynogenetic brown trout (*Salmo trutta* m. *fario*) Doubled Haploids. **BioMed Research International**, p.2314-61,33 2017.
- JAGIELLO, K. *et al.* Production of triploid, doubled haploid (DH) and meiogynogenetic brook trout (*Salvelinus fontinalis*)- efficiency and development of body deformities. **Animal Science**, v. 21, p. 141-157, 2021.
- KAVALCO, K. F. *et al.* Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae*–*Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, n.2, p.108-119, 2011.
- LEBEDA, I. e FLAJSHANS, M. Production of tetraploid sturgeons. *Journal of Animal Science*, v. 93, n. 8, p. 3759-3764, 2015.
- LUO, C. e LI, B. Diploid-dependent regulation of gene expression: a genetic cause of abnormal development in fish haploid embryos. **Heredity**, v. 90, p. 405–409 2003.
- PAN, Z. J. *et al.* Induction of meiotic gynogenesis in bagrid catfish (*Pseudobagrus ussuriensis*) with homologous sperm and its confirmation for female homogamety. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5659- 5665, 2017.
- PANDIAN, T. J. e KOTEESWARAN, R. Ploidy induction and sex control in fish. **Hydrobiologia**, v. 384, n. 1, p. 167-243, 1998.
- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Grooves surrounding the micropyle decrease the inseminating dose in fish. **Zygote**, v. 25, n. 6, p. 731–739, 2017.
- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote** (Cambridge, England), v. 24, n. 6, p. 795-807, 2016.
- POLONIS, M. *et al.* Genome incompatibility between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea trout (*Salmo trutta*) and induction of the interspecies gynogenesis. *Journal Applied Genetics*, v.59. p. 91–97, 2018.
- PURDOM, C.E: Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. **Heredity**, v. 24, p.431–444, 1969.
- RUBIN, D. A. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). **American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH)**, v. 1985, n. 1, p. 233–235, 1985.
- SAKAO, S. *et al.* Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 147-160, 2006.
- SHIRAK, A. *et al.* A deleterious effect associated with UNH159 is attenuated in twin embryos of an inbred line of blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Journal of Fish Biology**, v.82, p.42–53, 2012.

- THORGGARD, G.H. Chromosome set manipulation and sex control. In: Hoar WS, Randall DJ, Donadlson EM (eds) *Fish Physiology*, Academic **Press: New York**. v. 9B, p. 405–434, 1983.
- TVEDT, H. B. *et al.* Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 573-583, 2006.
- VARADARAJ, K. Production of viable haploid *Oreochromis mossambicus* gynogenes using UV-irradiated sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 267, p. 460–497, 1993.
- WU, Q. *et al.* Comparative study on growth performance and morphological characteristics of the meio- and mito-gynogenesis olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 535, p. 736-387, 2021.
- XAVIER, P. L. P. *et al.* A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 131, 2017.
- YAMAHA, E. *et al.* Dorso-ventral axis perturbation in goldfish embryos caused by heat- and pressure-shock treatments for. **Fish Science**, v.68, p.313–319, 2002.
- YAMAMOTO, E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (*Temminck et Schlegel*). **Aquaculture**, v. 173, p. 235-246, 1999.
- YASUI, G. S. *et al.* A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal Reproduction Science**, v.116, p. 335- 345, 2008.
- ZAGANINI, R. L. *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of genetics**, v. 93, n. 1, p. 24-27, 2012.
- ZHANG, X.; ONOZATO, H. Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one. **Aquaculture**, v. 240, n. 1–4, p. 101–113, 2004.

**CAPÍTULO II. Produção de triploides em *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) a partir de reprodutores tetraploides.**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir lotes 100% triplóides através do cruzamento de machos diploides e fêmeas tetraploides de *Astyanax altiparanae*. Foram analisados dois cruzamentos, que resultaram nos tratamentos experimentais; controle: oócitos obtidos de fêmeas diploides fertilizados com sêmen de machos diplóides e triploide: oócitos obtidos de fêmeas tetraploides fertilizados com sêmen de machos diplóides. Os percentuais de sobrevivência foram verificadas nas principais fases do desenvolvimento embrionário (fecundação, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão), bem como a porcentagem de larvas normais e anormais. Os experimentos foram realizados em três repetições. Vinte larvas recém-eclodidas de cada tratamento foram separadas em todas as repetições para confirmação de ploidia por citometria de fluxo. Além disso, 20 larvas foram selecionadas para contagem cromossômica. Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou alto percentual de sobrevivência durante o desenvolvimento embrionário, fertilização de  $96,96 \pm 1,10\%$ , blástula  $96,62 \pm 2,42\%$ , gástrula  $94,10 \pm 1,92\%$ , eclosão  $92,19 \pm 1,52\%$ , sendo  $98,12 \pm 22,90\%$  de larvas normais e  $1,88 \pm 1,09\%$  de larvas anormais. Porém, no grupo triploide foi observado menores percentuais de sobrevivência em blástula ( $90,10 \pm 2,29\%$ ), gástrula ( $84,95 \pm 3,79\%$ ), segmentação ( $79,85 \pm 4,20\%$ ) e eclosão ( $60,48 \pm 3,12\%$ ), porcentagem de larvas normais ( $55,44 \pm 0,98\%$ ) e anormais ( $45,66 \pm 1,11\%$ ) quando comparado ao grupo controle. Os resultados da citometria e dos cariótipos do grupo controle e triploide foram confirmados como 100% diplóide e triplóide, respectivamente.

## ABSTRACT

The objective of this work was to produce 100% triploid batches by crossing diploid males and tetraploid females of *Astyanax altiparanae*. Two crosses were analyzed, which resulted in experimental treatments; control: oocytes obtained from diploid females fertilized with semen from diploid males and triploid treatment: oocytes obtained from tetraploid females fertilized with semen from diploid males. Survival percentages were verified in the main phases of embryonic development (fertilization, cleavage, blastula, gastrula, segmentation and hatching), as well as the percentage of normal and abnormal larvae. The experiments were carried out in three replications. Twenty newly hatched larvae from each treatment were separated into all replicates to confirm ploidy by flow cytometry. Additionally, 20 larvae were selected for chromosome counting. The results showed that the control group presented a high percentage of survival during embryonic development, fertilization of  $96.96 \pm 1.10\%$ , blastula  $96.62 \pm 2.42\%$ , gastrula  $94.10 \pm 1.92\%$ , hatching  $92.19 \pm 1.52\%$ , with  $98.12 \pm 22.90\%$  normal larvae and  $1.88 \pm 1.09\%$  abnormal larvae. However, in the triploid group, lower survival rates were observed in blastula ( $90.10 \pm 2.29\%$ ), gastrula ( $84.95 \pm 3.79\%$ ), segmentation ( $79.85 \pm 4.20\%$ ) and hatching ( $60.48 \pm 3.12\%$ ), percentage of normal ( $55.44 \pm 0.98\%$ ) and abnormal ( $45.66 \pm 1.11\%$ ) larvae when compared to the control group. The cytometry and karyotype results of the control and triploid groups were confirmed as 100% diploid and triploid, respectively.

## 1 INTRODUÇÃO

Na natureza, para que ocorra o número diploide de cromossomos, é necessário que durante o processo de gametogênese sejam formados gametas haploides ( $1n$ ), os quais irão constituir 50% do conjunto cromossômico do embrião em formação, que irá tornar-se diploide após a fusão dos pronúcleos, durante o processo de fertilização (LUTZ, 2003).

Em espécies que possuem a fertilização externa, como a maioria dos peixes, é possível manipular os conjuntos cromossômicos (adicionando ou diminuindo). Neste processo, quando somamos um ou mais conjuntos de cromossomos aos eventuais observados para dada espécie na natureza, obtemos indivíduos poliploides (DUNHAM, 2004).

A condição triploide em peixes pode ser induzida, mas pode ocorrer de forma natural, como relatado para diversas espécies, a exemplo, *Astyanax scabripinnis* (LUIS MAISTRO *et al.*, 1994), *Trichomycterus davisii* (BORIN; MARTINS-SANTOS e OLIVEIRA, 2002) e *loach* (*Misgurnus anguillicaudatus*) (ZHANG e ARAI, 1999).

O principal atrativo da triploidização é a esterilidade, a qual contribui com demandas ecológicas e produtivas. Do ponto de vista ecológico, a condição estéril geralmente observada em triploides elimina riscos de desequilíbrios ecológicos, além de preservar a variabilidade genética, caso haja fuga de sistemas produtivos para naturais (PIFERRER *et al.*, 2009).

A triploidização também desenvolve importante papel para o emprego de tecnologias reprodutivas aplicadas na recuperação e conservação de espécies, a exemplo, o transplante de células germinativas primordiais (CGP's). A técnica de transplante de CGP's, necessitam de um hospedeiro estéril (receptor), como observado em alguns triploides, para gerar as chamadas quimeras germinativas (YAMAHA, 2003).

Do ponto de vista produtivo, os peixes triploides podem apresentar melhores índices produtivos, como o rendimento de carcaça (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017; KIZAK *et al.*, 2013) e maior ganho de peso (TABATA; RIGOLINO e TSUKAMOTO, 1999), representando maior produtividade e maior rendimento econômico (DUNHAM, 2004).

Para o sucesso da indução a triploidização, são indispensáveis estudos básicos da biologia reprodutiva da espécie, principalmente acerca dos eventos pós fertilização, como o tempo de extrusão do segundo corpúsculo polar e o tempo de fusão dos pronúcleos (PIFERRER *et al.*, 2009; PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2016).

Em peixes, a liberação do segundo corpúsculo polar ocorre momentos após a fertilização, dessa forma, a aplicação de choques térmicos, químicos ou de pressão nesse momento para inibir a extrusão do segundo corpúsculo polar é imprescindível para a produção de um indivíduo triploide, com dois cromossomos de herança materna e um cromossomo de herança paterna (PIFERRER *et al.*, 2009).

Por outro lado, um método alternativo para produzir triploides é cruzar um indivíduo tetraploide, os quais são férteis e geram gametas diploides, com um diploide normal (PIFERRER *et al.*, 2009; ARAI, 2001). Como resultado, teremos a produção em massa de peixes triploides sem efeitos deletérios da aplicação do choque, como a mortalidade e anormalidade (FJELLDAL e HANSEN, 2010).

Nascimento et al. (2020), por reprodução artificial, observou que espermatozoides diploides de machos tetraploides são capazes de fertilizar oócitos haploides e gerar proles 100% triploides em *A. altiparanae*. No entanto, ainda não foi avaliada a capacidade de fêmeas tetraploides na geração em massa de triploides. Diante da importância ecológica e produtiva de peixes triploides, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de produzir triploides através de cruzamentos entre fêmeas tetraploides e machos diploides em *Astyanax altiparanae*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ), protocolo N° 009-11-2019.

### 2.1 Local e Período Experimental

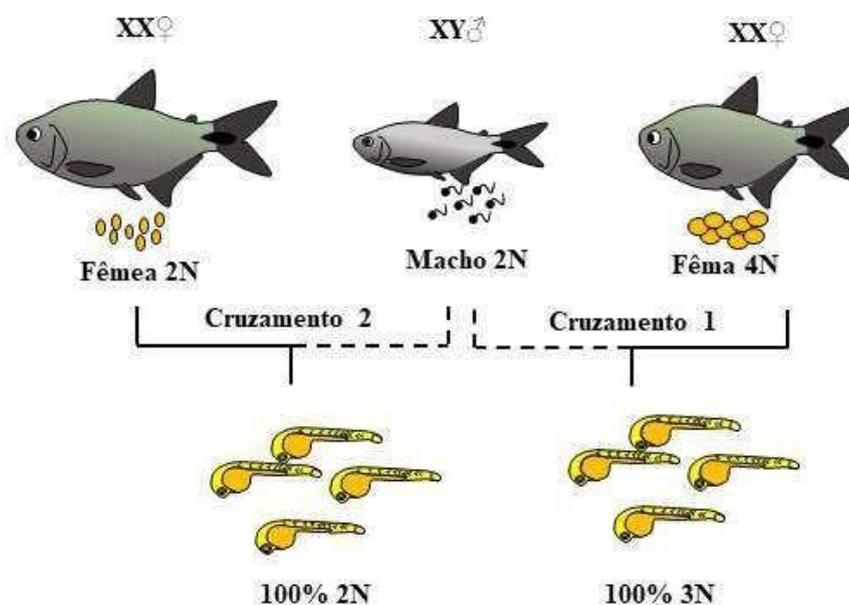
O experimento foi realizado no período de janeiro a maio de 2021, no Centro de Conservação da Biodiversidade Aquática Continental- CEPTA/ICMBio, em Pirassununga/SP, Brasil.

### 2.2 Reprodutores utilizados e tratamento experimental

Foram utilizados quatro animais adultos em idade reprodutiva (duas fêmeas tetraploide, uma diploide e um macho diploide) de *Astyanax altiparanae* com ploidia confirmada por citometria de fluxo. Os reprodutores foram submetidos a indução hormonal com Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (EBHC). As fêmeas receberam duas doses, com concentração de 0,1 e 3 mg/kg<sup>-1</sup>, em intervalos de 6 horas entre doses. O macho foi induzido com uma única dose aplicada simultaneamente a segunda dose nas fêmeas. Os reprodutores foram mantidos em aquário de 20 litros com temperatura controlada a 26°C até o início das desovas.

As fêmeas tiveram os oócitos extrusados sobre placas de Petri de 90 mm cobertas com papel filme (Alpfilm, São Paulo, Brasil). Posteriormente, o sêmen foi coletado com pipeta de 1000 µL (Eppendorf, Alemanha) e armazenados em solução de 400 µL de Ringer modificado (128,3 mM NaCl, 23,6 mM KCl, 3,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,1 mM MgCl<sub>2</sub>).

Foram separadas duas aliquotas (~100 oócitos) provenientes de fêmea tetraploides diploides, respectivamente, as quais constituíram os tratamentos experimentais, sendo eles: Oócitos de fêmeas tetraploides fertilizados com sêmen fresco (triploide) e oócitos de fêmea diploide fertilizadas com sêmen fresco (controle). O sêmen utilizado é proveniente do mesmo reprodutor Figura 1.



**Figura 1.** Ilustração dos tratamentos experimentais usando fêmeas tetraploides e machos diploides de *Astyanax altiparanae*. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado através de estereomicroscópio (Nikon SMZ 1500, Tokyo, Japan) durante os estágios de fertilização, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e eclosão, classificados como larvas normais e anormais de acordo com o descrito para *Astyanax altiparanae* por Pereira-Santos et al. (2016).

### 2.3 Confirmação da ploidia

A confirmação da ploidia foi realizada por análise de citometria de fluxo e citogenética nas larvas eclodidas. A citometria de fluxo foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido por Xavier *et al.* (2017). Para isso, 20 larvas recém eclodidas foram transferidas de forma individual para microtubos contendo 120  $\mu\text{L}$  de solução de lise celular (9,53 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 47,67 mM KCl; 15 mM Tris; pH 8,0, com adição de sacarose e com detergente Triton-X a 0,6%) por 10 minutos. Para a coloração dos núcleos, foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de solução de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride - DAPI (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (Sigma #D5773, St. Louis, USA). As amostras foram filtradas em telas de nylon de 30  $\mu\text{m}$  (Celltrics, Partec, GMBh, Germany). Posteriormente, o conteúdo do DNA foi medido com um citômetro de fluxo CyFlow Ploidy, Analyzer, Partec, GMBh, Alemanha) e a ploidia de todos os tratamentos foi confirmada por comparação com análise referência previamente realizada com sêmen de machos diploide.

Para análise da ploidia por citogenética, foram separados 20 embriões por repetição, de cada tratamento no estágio de segmentação, mantidos durante quatro horas em 0,5 gramas de colchicina diluída em 20 mL água destilada. Após quatro horas, o córion foi retirado com auxílio de pronase 0,05% e posteriormente, os embriões foram sacrificados e dissociados individualmente (por inteiro) em placa de Petri contendo 7mL de solução hipotônica KCl (0,075 M).

O material foi transferido para tubo de centrifuga e mantido em estufa a 37°C por 21 minutos. As etapas de fixação com metanol e ácido acético (3:1) e a coloração através de GIEMSA 5% (em ambos os processos) seguiram protocolos descritos por FORESTI; OLIVEIRA e DE ALMEIDA-TOLEDO (1993).

## **2.4 Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EP. O experimento foi realizado em duas repetições, usando os mesmos reprodutores. Os dados foram verificados quanto à normalidade com o teste Liliefors e em seguida comparados entre si por teste ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 10 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

### 3 RESULTADOS

Os resultados do desenvolvimento embrionário do grupo controle e triploide e suas respectivas ploidias são apresentados na Tabela 1. De forma geral, os embriões incubados dos dois tratamentos apresentaram índices satisfatórios de sobrevivência nos estágios do desenvolvimento embrionário, alcançando a eclosão (Figura 2A; B). Foi observado diferença significativa entre os tratamentos no estágio de gástrula ( $P=0,0273$ ), eclosão ( $P=0,0499$ ), larvas normais ( $P=0,0032$ ) e anormais ( $P=0,0013$ ). Não foi observado diferença significativa na fertilização ( $P=0,9347$ ), 2 células ( $P=0,5389$ ), blástula ( $P=0,6612$ ) e segmentação ( $P=0,05244$ ).

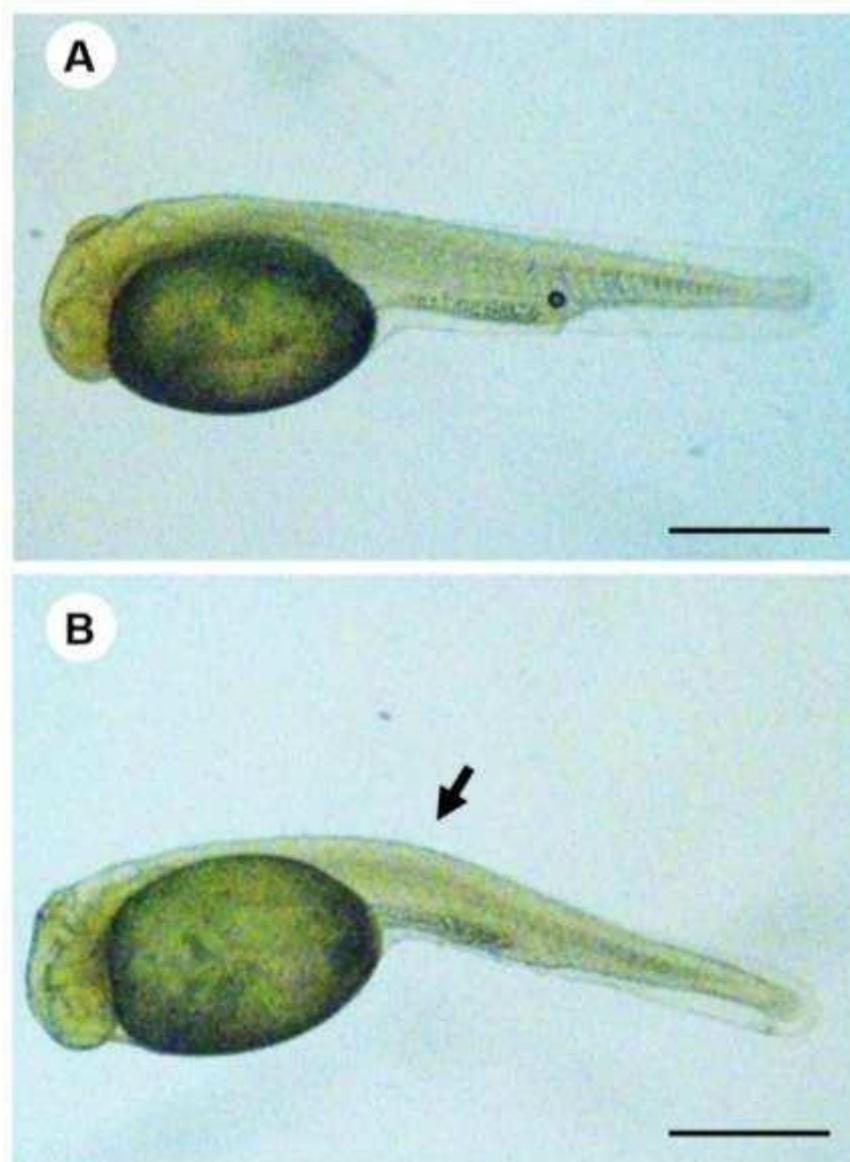
**Tabela 1.** Desenvolvimento embrionário do grupo controle e triploide de *Astyanax altiparanae*, durante os estágios de clivagem, blástula, gástrula e segmentação, eclosão (normais e anormais) e suas respectivas ploidias (em %).

Desenvolvimento Embrionário (%)											
Tratamentos	Nº Oócitos	Não fertilizado	2-Células	Blástula	Gástrula	Segmentação	Eclosão	Normal	Anormal	Ploidia	
										2n	3n
Controle	106	3,04 ± 1,10 <sup>a</sup>	96,96 ± 1,10 <sup>a</sup>	96,62 ± 2,42 <sup>a</sup>	94,10 ± 1,92 <sup>a</sup>	92,19 ± 1,52 <sup>a</sup>	90,12 ± 2,59 <sup>a</sup>	98,12 ± 22,90 <sup>a</sup>	1,88 ± 1,09 <sup>a</sup>	100,00	0,00
Triploide	99	3,86 ± 1,43 <sup>a</sup>	95,14 ± 1,43 <sup>a</sup>	90,10 ± 2,29 <sup>a</sup>	84,95 ± 3,79 <sup>b</sup>	79,85 ± 4,20 <sup>a</sup>	60,48 ± 3,12 <sup>b</sup>	55,44 ± 0,98 <sup>b</sup>	45,66 ± 1,11 <sup>b</sup>	0,00	100,00

Legenda: As porcentagens e o número de ovos representam uma média de duas repetições. Valores com letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

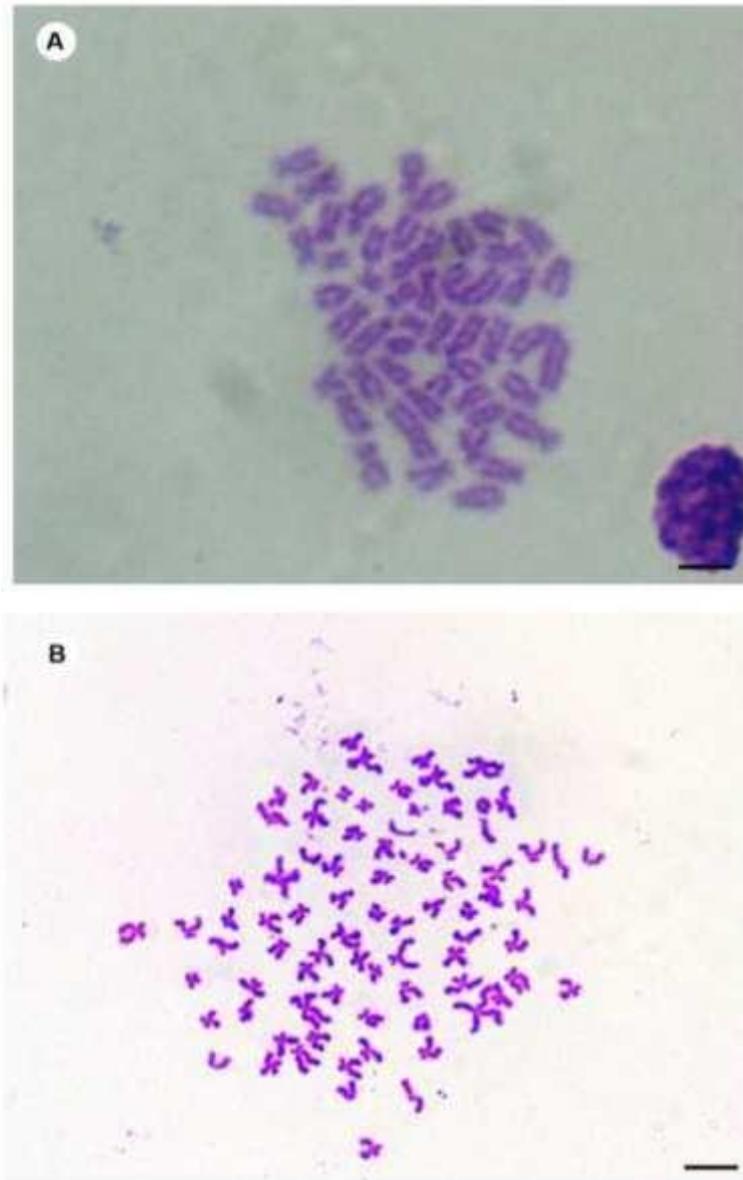
### 3.1 Confirmação da ploidia

O resultado da análise de citometria de fluxo em *Astyanax altiparanae* do grupo controle evidenciou que todos os indivíduos são diploides (Figura 4A). Já os indivíduos resultantes do cruzamento entre fêmeas tetraploides e machos diploides são 100% triploides (Figura 4B).

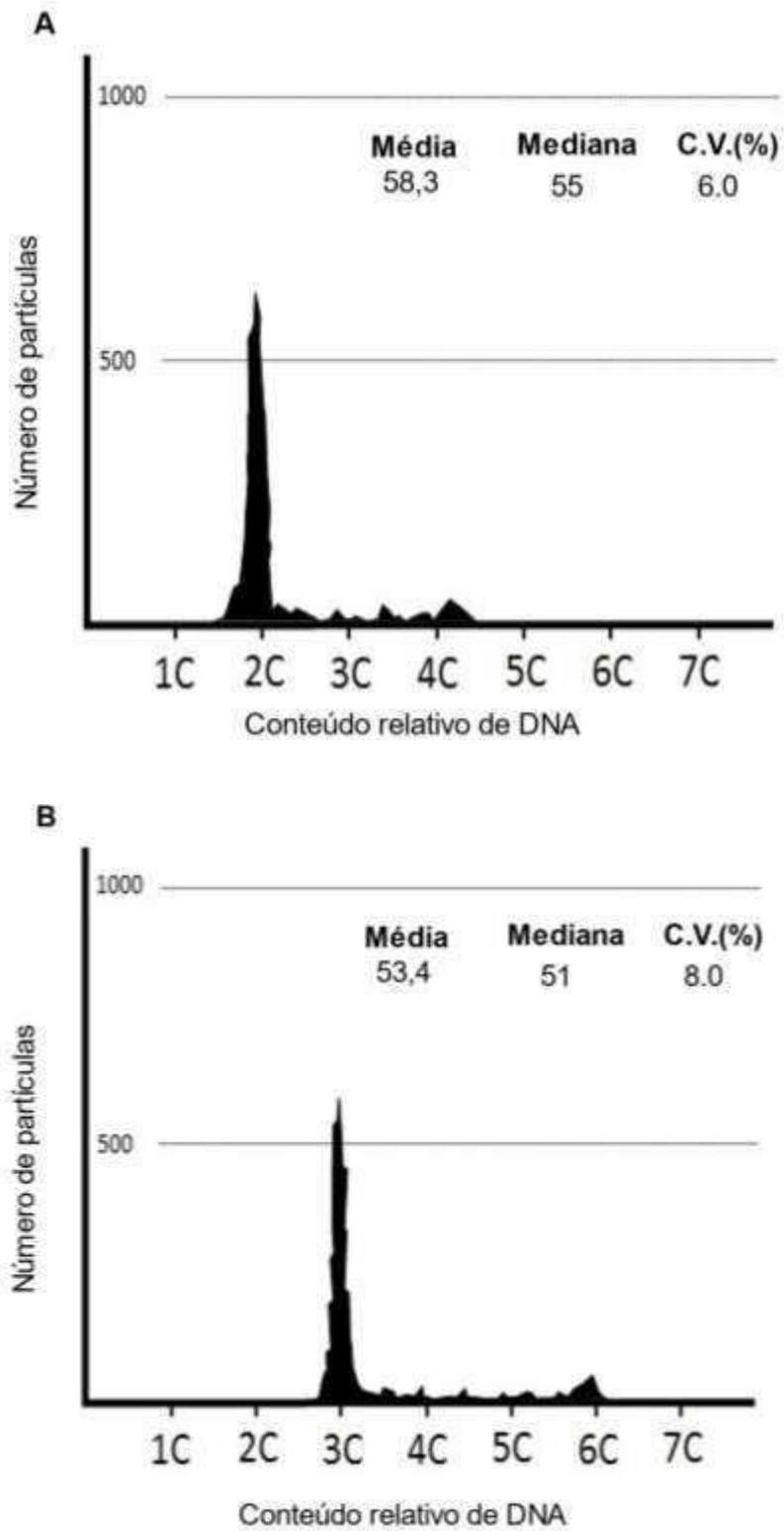


**Figura 2.** Larvas recém eclodidas de *Astyanax altiparanae* do grupo controle (A) e triploide (B). Escala: 500  $\mu$ m. Seta indica deformidade na região caudal.

Os resultados da análise de citogenética em larvas evidenciaram que os cariótipos do grupo controle e triploide de *A. altiparanae* apresentavam 50 e 75 cromossomos, respectivamente (Figura 3) e citometria de fluxo (Figura 4).



**Figura 3.** Cromossomos de larvas do grupo controle (A) e triploide (B) de *Astyanax altiparanae* revelaram 50 e 75 cromossomos, respectivamente. Escala: 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.** Histograma de citometria de fluxo de larvas diploides recém-eclodidas do grupo controle (A) e triploides (B) de *Astyanax altiparanae*.

## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi desenvolvido o primeiro protocolo de triploidização utilizando fêmeas tetraploides e machos diploides de *Astyanax altiparanae*. Não há relatos na literatura de produção de triploides através de parentais tetraploide e diploide e tão pouco é conhecido a vantagem da criação de indivíduos triploides resultantes destes cruzamentos em relação aos diploides.

O aumento de populações triploides é de grande interesse para piscicultura, uma vez que triploides podem apresentar melhores índices de desempenho, como mostrado em estudos comparativos em *A. altiparanae*, onde as fêmeas triploides apresentaram maiores rendimentos de carcaça quando comparados as fêmeas diploides (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Em protocolos de indução a triploidia, também foi observado que as fêmeas triploides quando comparadas as diploides foram superiores em importantes índices como o ganho de peso em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (TABATA; RIGOLINO e TSUKAMOTO, 1999), bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) (FEINDEL; BENFEY e TRIPPEL., 2011) e truta marrom (*Salmo trutta fario*) (KIZAK *et al.*, 2013).

Esses resultados evidenciam a importância comercial da triploidização e o quão imprescindíveis são as ferramentas que viabilizam a produção de peixes triploides em escala comercial. Os nossos resultados são inovadores e viabilizam a expansão produtiva de triploides em *A. altiparanae*, bem como outras espécies de caracídeos da região neotropical com igual ou maior valor econômico.

No entanto, vale ressaltar que esses resultados são espécies específicos e que, exceções existem, já que nem sempre é observado um maior desempenho dos triploides para algumas espécies (FRIARS *et al.*, 2001; SACOBIE *et al.*, 2012). Além disso, ainda não é conhecido os aspectos produtivos de peixes triploides resultantes de reprodutores tetraploides. Logo, mais estudos serão desenvolvidos afim de comparar sua viabilidade produtiva em relação aos diploides em *A. altiparanae*.

A esterilidade é uma importante característica de peixes triploides. O cultivo desses indivíduos pode evitar problemas associados à maturação sexual, como suscetibilidade a doenças e redução da qualidade da carne (TARANGER *et al.*, 2010), e caso haja escape, não ocorra problemas ecológicos como a introgressão genética (PIFERRER *et al.*, 2009) e a introdução de espécies exóticas, apontada como uma das principais causas que leva a extinção de populações de peixes.

Em nossos resultados parciais ainda não foi possível avaliar a esterilidade dos indivíduos triploides resultante do cruzamento analisado. No entanto, estudos prévios de indução a triploidização com aplicação de choque térmico em *A. altiparanae* mostraram que as fêmeas triploides em idade reprodutiva apresentam gônadas em estágio imaturo, sendo considerada estéreis. Os machos apresentaram produção espermática, porém com capacidade de fertilização reduzida (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017). Deste modo, são necessários mais estudos sobre a biologia reprodutiva e fertilidade destes peixes, bem como sua viabilidade.

Todos os indivíduos se confirmaram 100% triploides por análise de fluxo e citogenética. Esses achados evidenciam a eficácia e a aplicabilidade de fêmeas tetraploides e machos diploides na obtenção de lotes 100% triploides, (PIFERRER *et al.*, 2009; ADAMOV *et al.*, 2017 e DO NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Com base nos resultados, podemos concluir que em *A. altiparanae* a produção de triploides através do cruzamento de fêmeas tetraploides e machos diploides é eficaz na produção de lotes 100% triploides. Com isso, sugerimos o aumento das populações de indivíduos tetraploides (machos e fêmeas) para a produção em massa de peixes triploides em *A. altiparanae* ou outras espécies com potencial produção e de valor econômico.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOV, N.S. *et al.* Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: **Tools for Conservation and Aquaculture**. v.48, n. 5, p. 741-750, 2017.
- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture*, v.197, n. 1, p. 205–228, 2001.
- BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. e OLIVEIRA, C. A natural triploid in *Trichomycterusdavisii* (*Siluriformes, Trichomycteridae*): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. **Genetica**, v. 115, n. 3, p. 253-258, 2002.
- BUCHTOVA, H.*et al.* Fatty acid composition of diploid and triploid populations of tench (*Tincatinca L.*). **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, n. 2, p. 235-245, 2004.
- DO NASCIMENTO, N. F. *et al.* Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v. 471. 163-171, 2017.
- DUNHAM, R. A. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. Oxford: GABI Publishing, 2004.
- FEINDEL, N. J.; BENFEY, T. J. e TRIPPEL., E. A Gonadal development of triploid *Atlantic Cod Gadus morhua*. **Journal of Fish Biology**, v. 79, p. 1900 - 1912, 2011.
- FELIP, A.; CARRILLO, M. e ZANUY, S. Older triploid fish retain impaired reproductive endocrinology in the European sea bass *Dicentrarchuslabrax*. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 10, p. 2657-2669, 2009.
- FJELLDAL, P. G. e HANSEN, T. Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) underyearling smolts. **Aquaculture**, v. 309, n. 1-4, p. 131-136, 2010.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. e DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 810-813, 1993.
- FRIARS, G. W.*et al.* Family differences in relative growth of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). **Aquaculture**, v. 192, n. 1, p. 23-29, 2001.
- KIZAK, V.; GUNER, Y.; TUREL, M.; KAYIM, M. Comparison of Growth Performance, Gonadal Structure and Erythrocyte Size in Triploid and Diploid Brown Trout (*Salmo trutta fario L.*, 1758). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 13, p. 571 - 580, 2013.
- LUIS MAISTRO, E. *et al.* Natural triploidy in *Astyanax scabripinnis* (*Pisces, Characidae*) and simultaneous occurrence of macro B-chromosomes. **Caryologia**, v. 47, n. 3-4, p. 233- 239, 1994.
- LUTZ, C. G. *Practical Genetics for Aquaculture*. London: **Blackwell**, 2003.
- MANOR, M. L. *et al.* Effect of sexual maturation and triploidy on chemical composition and fatty acid content of energy stores in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, p. 312-321, 2012.

- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Morphology of gametes, post-fertilization events and the effect of temperature on the embryonic development of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Zygote** (Cambridge, England), v. 24, n. 6, p. 795-807, 2017.
- PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Grooves surrounding the micropyle decrease the inseminating dose in fish. **Zygote**, v. 25, n. 6, p. 731–739, 2017.
- PIFERRER, F. *et al.* Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. **Aquaculture**, v. 293, n. 3-4, p. 125-156, 2009.
- RIBEIRO, C. S. *et al.* The effect of ploidy on the fatty acid profile during the reproductive cycle of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 20, p. 1117-1137, 2012.
- SACOBIE, C. F. D. *et al.* Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. **Aquaculture**, v. 334, p. 58-64, 2012.
- TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. e TSUKAMOTO, R. Y. Production of all female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (*Pisces, Salmonidae*). III. Growth up to first sexual maturation. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 4, p. 101 - 102, 1999.
- TARANGER, G. L. *et al.* Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 483-515, 2010.
- WEBER, G. M. *et al.* Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. **Aquaculture**, v. 433, p. 85-93, 2014.
- XAVIER, P. L. P. *et al.* A flow cytometry protocol to estimate DNA content in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 131, 2017.
- ZHANG, Q. Q. e ARAI, K. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the leach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Ichthyological Research**, v. 46, p. 153-161, 1999.