

RENATA DA SILVA FARIAS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MASCULINIZAÇÃO DO LAMBARI
DO RABO AMARELO DO SÃO FRANCISCO**

**Recife,
Outubro/2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MASCULINIZAÇÃO DO LAMBARI
DO RABO AMARELO DO SÃO FRANCISCO**

Renata da Silva Farias

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título Doutor.

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra
Orientadora

Recife,
Outubro/2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F224i Farias, Renata da Silva
Identificação molecular e masculinização do lambari do rabo amarelo do São Francisco / Renata da Silva Farias. - 2023.
76 f. : il.

Orientadora: Maria Raquel Moura Coimbra.
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2023.

1. Andrógeno. 2. Lambari. 3. Filogeografia. 4. Reversão indireta. 5. Reversão sexual. I. Coimbra, Maria Raquel Moura, orient. II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MASCULINIZAÇÃO DO LAMBARI
DO RABO AMARELO DO SÃO FRANCISCO**

Renata da Silva Farias

Tese julgada adequada para obtenção do título de doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 18/10/2023 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra

Orientadora

Departamento de Pesca e Aquicultura

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Leonardo Luiz Calado

Instituto Nacional do Semiárido

Membro externo

Dra. Gelcirene de Albuquerque Costa

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Membro externo

Dra. Juliana Ferreira dos Santos

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Membro interno

Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Membro interno

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família.

Resumo

O lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*) é uma espécie onívora, rústica, de rápido crescimento e com um mercado em expansão. A taxonomia desse gênero, quando baseada em caracteres morfológicos e merísticos, é imprecisa devido a sobreposição desses parâmetros. Mais recentemente, três espécies (*A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis*) foram consideradas sinônimas de *A. lacustris*, o que faz necessário uma avaliação molecular do espécime para identificar com precisão a espécie trabalhada. Um outro aspecto relevante na lambaricultura é a possibilidade de reversão sexual desses animais. A técnica de manipulação do sexo gonadal em peixes de cultivo permite a produção de lotes monossexo, caso a espécie apresente benefícios específicos associados a um dos sexos. No lambari, as fêmeas podem crescer até 33% mais que os machos, sendo uma vantagem o cultivo monossexo feminino. Para isso, a utilização de hormônios esteroides é um método eficaz para induzir a diferenciação gonadal. Apesar de sua aplicação em várias espécies de peixes, ainda não se conhecem os efeitos do uso de 17α -metiltestosterona (MT) no lambari do rabo amarelo. Assim, o objetivo geral dessa tese foi identificar molecularmente a espécie utilizada e produzir lotes monossexo masculino através da reversão sexual hormonal no *Astyanax lacustris*. Essa tese foi dividida em três capítulos, no primeiro foi realizado uma identificação molecular utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de lambaris provenientes do reservatório de Moxotó (BA), na bacia do rio São Francisco, para determinação da espécie. Posteriormente, esses dados foram comparados com outras sequências de *A. lacustris* da bacia do São Francisco, bacia do Atlântico nordeste oriental e bacia do Paraná, sendo possível identificar, por meio de diferentes abordagens, uma distinção entre os espécimes da bacia do Paraná e os do presente estudo, sugerindo a ocorrência de duas espécies crípticas. O segundo e terceiro capítulos se referem aos experimentos de reversão sexual com 17α -metiltestosterona. Foram realizados dois experimentos utilizando diferentes doses (de 0 a 60 mg/kg) e diferentes períodos de oferta (30 e 60 dias). Em ambos os experimentos, os animais receberam o hormônio a partir do primeiro dia de abertura do aparato bucal e foram mantidos por, pelo menos, quatro meses até atingirem a maturidade sexual, permitindo assim a avaliação das gônadas. Os experimentos resultaram em um maior percentual de machos, sem grandes diferenças significativas no tamanho, no peso ou na sobrevivência. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a oferta de 10 mg/kg de 17α -metiltestosterona em 30 dias é uma estratégia eficiente para a produção de lotes monossexo masculinos de lambari do rabo amarelo atingindo percentuais superiores a 80%.

Palavras-chave: Andrógeno, lambari, filogeografia, reversão indireta, reversão sexual.

Abstract

The yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*) is an omnivorous, robust species with rapid growth and a growing market. The taxonomy of this genus, when based on morphological and meristic characters, is imprecise due to the overlap of these parameters. More recently, three species (*A. altiparanae*, *A. asuncionensis*, and *A. jacuhiensis*) have been considered synonymous with *A. lacustris*, which necessitates a molecular evaluation of the specimen to accurately identify the species being studied. Another relevant aspect of fish farming is the possibility of sexual reversal in these animals. The technique of gonadal sex manipulation in farmed fish allows the production of monosex batches if the species present specific benefits associated with one of the sexes. In the yellowtail tetra, females can grow up to 33% larger than males, making the cultivation of the female monosex batch advantageous. For this, the use of steroid hormones is an effective method to induce gonadal differentiation. Despite its application in various fish species, the effects of using 17α -methyltestosterone (MT) on the yellowtail tetra are not yet fully understood. Thus, the general objective of this thesis was to molecularly identify the species used and produce male monosex batches through hormonal sex reversal in *Astyanax lacustris*. This thesis is divided into three chapters. In the first chapter, molecular identification was conducted using the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI) of yellowtail tetra from the Moxotó reservoir (BA), in the São Francisco River basin, to determine the species. These data were then compared with other *A. lacustris* sequences from the São Francisco basin, oriental northeast Atlantic basin, and Paraná basin, revealing distinctions between specimens from the Paraná basin and those of the present study, suggesting the occurrence of two cryptic species through different approaches. The second and third chapters describe the experiments on sexual reversal with 17α -methyltestosterone. Two experiments were conducted at different doses (from zero to 60 mg/kg of MT) and durations (30 and 60 days). In both experiments, the animals received the hormone from the first day of mouth opening and were kept for at least four months until reaching sexual maturity, allowing for the evaluation of gonads. The experiments resulted in a higher percentage of males, with no significant differences in size, weight, and survivor. Based on the obtained results, we can conclude that administering 10 mg/kg of 17α -methyltestosterone over 30 days is an efficient strategy for producing monosex male batches of yellowtail tetra, achieving percentages exceeding 80% of males.

Keywords: Androgen, tetra, filogeography, sex reversal and breeding, sex reversal.

Agradecimentos

À Deus, por sempre me fortalecer diante dos obstáculos da vida.

Aos meus pais, Ercílio e Gicele, meus irmãos Larissa, Fernanda, Matheus e Samuel, pelo incentivo e apoio incondicional. Vocês são meu porto seguro. Amo vocês!

Ao programa de Recursos Pesqueiros e Aquicultura, pela oportunidade de realizar o doutorado e estrutura de apoio à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado e Doutorado Sanduíche (CAPES/PrInt) concedidas.

À Companhia Hidrelétrica do São Francisco (Chesf), pela doação dos exemplares de lambari que formaram a nossa população basal.

À Profa. Dra. Raquel Coimbra, por todo suporte, orientação, amizade e pelos conselhos profissionais e de vida. Obrigada por sempre acreditar em mim!

To Dr. Rex Dunham, my co-supervisor at Auburn University, I express my gratitude for granting me the valuable opportunity to join his lab and for generously sharing his wealth of knowledge. I extend my sincere thanks to all my fellow lab mates at the Fish Genetic Enhancement Laboratory, including Dr. Baofeng Su, Dr. Mei Shang, Indira Medina, Ansel, Abel, Tasnuba, De, Jinhai, Shanjia, Darshika, Veronica, Logan, and Jacob. Your guidance, support, shared knowledge, friendship, and memorable moments of fun have enriched my academic journey in countless ways. War eagle!

À Base de Pesca Prof. Johei Koike, em nome do Dr. Dijaci Ferreira, pelo espaço e apoio para realização dos experimentos dessa tese.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Amaro e ao Dr. Alluanan Adelson, pelo apoio nas análises de histologia.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética Aplicada, Bruno, Karol, Marcele, Marília, Rodolf, João e Gil pela parceria diária e os momentos de descontração.

A todos os meus amigos que de perto ou de longe foram peças fundamentais na minha vida, Elizabeth, Otávio, Valdemir, Gênisson, Railton, Jenny, Flávia, Beatriz, Camilinha, Thiago, Talita, Águida, Rafaela, Indira, Alejandro, Islaine, Hélio Neto, Romildo e Taile. Muito obrigada pelo apoio e torcida!!

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!!!

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Dados de produção (em kg) e valor da produção (em reais) de lambari no Brasil entre os anos de 2013 e 2022. Elaborado a partir de dados do IBGE (2013-2023).	10
Figura 2. Dados de produção (em toneladas) de lambari para cada região do Brasil no ano de 2022. Elaborado a partir de dados do IBGE (2023).	11
Figura 3. Dimorfismo de tamanho entre machos (A) e fêmeas (B) adultos de lambari do rabo amarelo (<i>Astyanax lacustris</i>).	12

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Agradecimentos	7
Lista de figuras.....	8
1- Introdução	10
1.2- Objetivos	16
2- Artigo científico I.....	17
3- Artigo científico II	39
4- Artigo científico III	50
5- Considerações finais	65
6- Referências	66
ANEXO I	74

1- Introdução

Contextualização da Pesquisa

A aquicultura brasileira vem crescendo ao longo dos anos e em 2022 atingiu um valor de produção de R\$ 8,65 bilhões, sendo 83,5% (617,3 mil toneladas) proveniente da piscicultura e 15,3% (113,3 mil toneladas) da carcinicultura (IBGE, 2023). Apesar de o Brasil ser detentor da maior diversidade de ictiofauna de água doce do mundo (COLLEN et al., 2014), a maior parte de sua produção aquícola baseia-se no cultivo de espécies exóticas, como é o caso do camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*), da ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) e datilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo esta última responsável por 66% da piscicultura brasileira (IBGE, 2023; POVH et al., 2022). A mais recente espécie exótica introduzida para criação em alguns estados brasileiros é o *Pangasius hypophthalmus*, um bagre popularmente conhecido como panga e originário do Vietnã, mas, ainda não há uma regulamentação federal estabelecida para o seu cultivo (PEIXEBR, 2023). O principal motivo para a escolha dessas espécies é a existência de pacotes tecnológicos estruturados que englobam todas as fases do ciclo de vida, incluindo alimentação adequada, domínio da reprodução, alta sobrevivência e disponibilidade de larvas ao longo do ano (KUBITZA, 2007). Contudo, a introgressão de espécies, sejam exóticas ou alóctones, ameaçam as espécies nativas, seja pela predação, competição, disseminação de patógenos ou hibridação, resultando no declínio de populações endêmicas (HULME, 2015).

Devido ao grande potencial das espécies nativas, muitos estudos vêm sendo realizados, de forma a identificar as mais propícias para a aquicultura, levando em consideração rusticidade, facilidade de manejo, tempo de crescimento e o desempenho zootécnico (SAINT-PAUL, 2017; BALDISSEROTTO e GOMES, 2020; VALENTI et al., 2021). Algumas destas já possuem um pacote tecnológico em desenvolvimento e vêm sendo cultivadas comercialmente, como é o caso do tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e lambari (*Astyanax* spp.) (IBGE, 2022, POVH et al., 2022).

Há uma variedade de peixes comumente referidos como lambaris, que habitam riachos, lagos e os principais rios que compõem as bacias hidrográficas dos ecossistemas tropicais (PORTO-FORESTI et al., 2001). São de pequeno porte e boa parte pertence à família Characidae e gênero *Astyanax*, que é um dos mais abundantes com

aproximadamente 150 espécies catalogadas. O cultivo de lambari vem se destacando, principalmente, devido à rusticidade e rápido crescimento desses animais, atingindo o ponto de abate entre dez e onze semanas de idade (PORTO-FORESTI et al., 2005, VALENTI et al., 2021). O lambari é comercializado como isca viva para a pesca esportiva e como aperitivo para bares e restaurantes (HAYASHI et al., 2002; GARUTTI, 2003).

No ano de 2022, a produção chegou a 467,9 toneladas avaliada em R\$ 5.925.000,00 (IBGE, 2023), tendo um aumento de 271% no valor de produção e 83% na quantidade produzida quando comparado ao ano de 2013 (Figura 1). O estado de Goiás foi o maior produtor (135,9 toneladas), seguido de São Paulo (132,2 toneladas) e Rio Grande do Sul (83,5 toneladas) (Figura 2), enquanto as regiões Norte e Nordeste (Figura 2) têm uma produção incipiente de menos de 4 ton (IBGE, 2023).

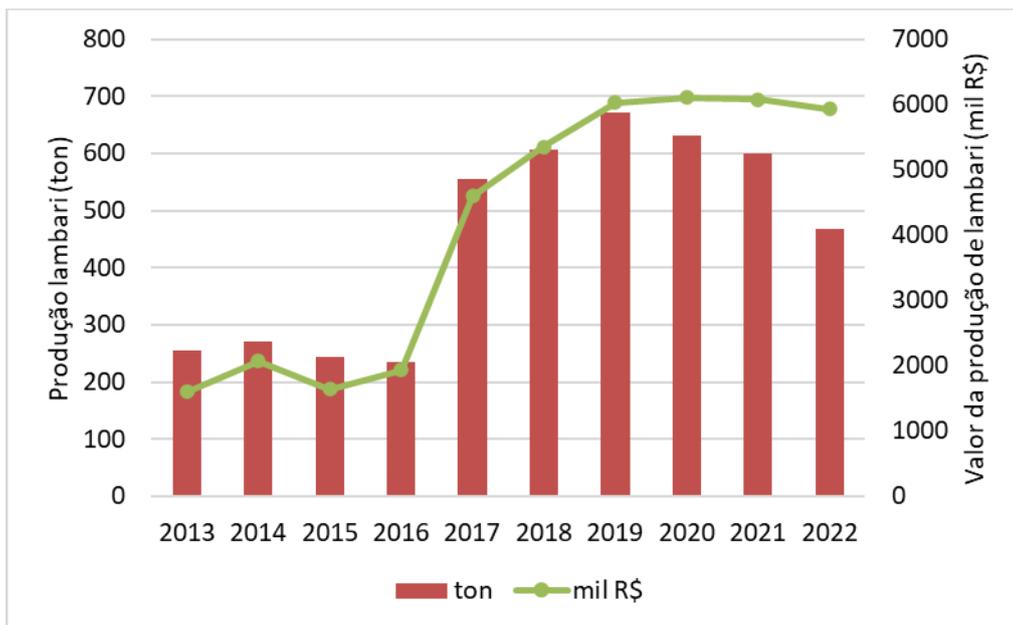


Figura 1. Dados de produção (em toneladas) e valor da produção (em mil reais) de lambari no Brasil entre os anos de 2013 e 2022. Elaborado a partir de dados do IBGE (2013-2023).

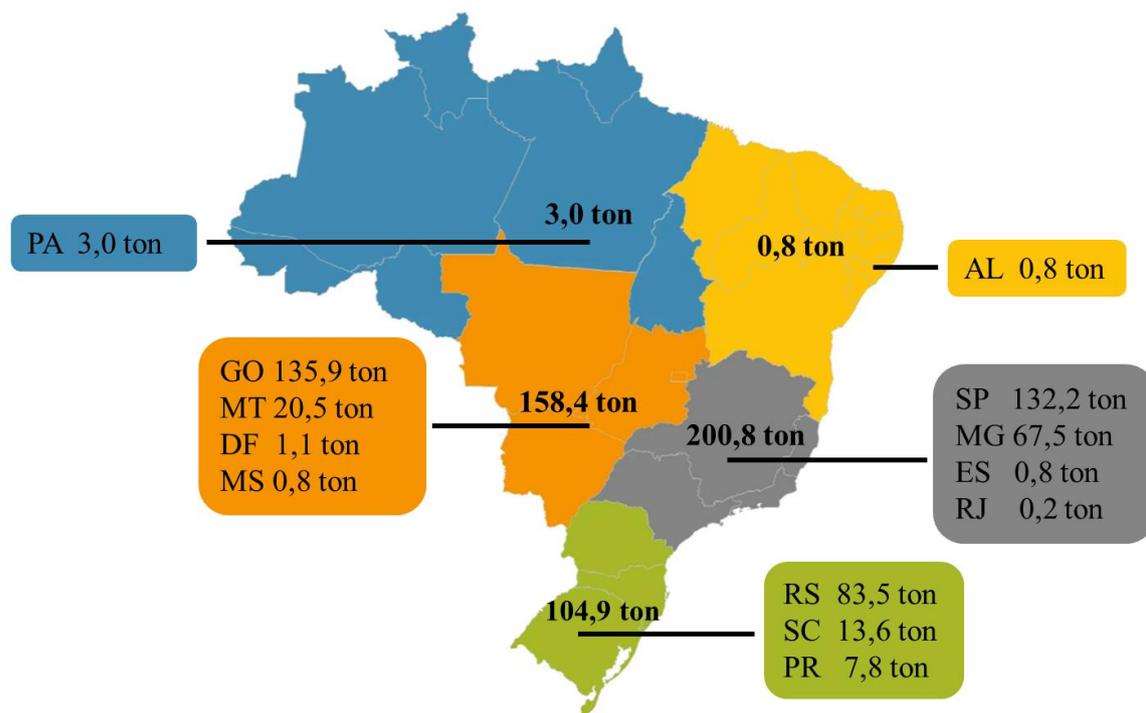


Figura 2. Dados de produção (em toneladas) de lambari para cada região do Brasil no ano de 2022. Elaborado a partir de dados do IBGE (2023).

Espécies do gênero *Astyanax* têm sido objeto de estudo de pesquisas com reprodução (ARIKI et al., 2023, FELIZARDO et al., 2012, ABREU et al., 2021), criopreservação de gametas (YASUI et al., 2015, SANTOS et al., 2018, CARNEIRO-LEITE et al., 2020), ecotoxicidade (AKAISHI et al., 2004, PASCHOALINI et al., 2021, SCHULTZ et al., 2001), manipulação cromossômica (ADAMOV et al., 2017, NASCIMENTO et al., 2017, 2019), cultivo (JATOBA e SILVA, 2015, VILELA e HAYASHI, 2008, MARQUES et al., 2021), nutrição (SILVA et al., 2022, SUSSEL et al., 2014, FURUYA et al., 2015), viabilidade econômica (SABBAG et al., 2011, LOPES et al., 2014), sustentabilidade (FONSECA et al., 2017, 2022), entre outros, contribuindo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento das tecnologias associadas à lambaricultura nos últimos anos.

O *Astyanax lacustris* é a espécie de lambari mais cultivada (VALENTI et al., 2021), contudo sua taxonomia é imprecisa, devido a sobreposição de caracteres morfológicos e merísticos (GARUTTI e BRITSKI, 2000). Numa última revisão com base nesses caracteres, Lucena e Soares (2016) propuseram que as espécies *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* fossem consideradas sinônimos juniores de *A. lacustris*

(Lütken 1875), sendo essa a única reconhecida como espécie válida atualmente.

Esses são peixes de pequeno porte, bentopelágicos, de hábito onívoro com tendência insetívora, que possuem um ciclo de vida curto e sem cuidado parental (AGOSTINHO et al., 2004; SILVA et al., 2012). Esses animais atingem a maturidade sexual em cativeiro num período de até quatro meses, possibilitando a obtenção de várias desovas ao longo do ano (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI et al., 2005; ABIMORAD e CASTELLANI, 2011). Apresentam dimorfismo sexual mais evidente durante o período reprodutivo, quando as fêmeas podem atingir tamanhos entre 9 e 12 cm, corpo mais abalado e é possível visualizar a papila urogenital irrigada (avermelhada) e proeminente. Já os machos são menores (Figura 3), com tamanho variando de 7 a 9 cm, corpo mais alongado e espículas na região da nadadeira anal; quanto mais áspera ao tato, mais desenvolvidas estão as gônadas (PORTO-FORESTI et al., 2001; GARUTTI, 2003; BEM, 2009).



Figura 3. Dimorfismo de tamanho entre machos (A) e fêmeas (B) adultos de lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*).

Essa disparidade de tamanho entre os peixes no período de abate se acentua quando reproduções sucessivas não controladas ocorrem no viveiro, resultando em lambaris de diversas idades e tamanhos, gerando um grande problema aos produtores de lambari (SALARO et al., 2015). Navarro et al. (2003) compararam o cultivo misto (machos + fêmeas) com o cultivo monosexo (machos e fêmeas separados) no lambari prata, *A. scabripinnis*, e observaram melhores índices morfométricos e gonadosomáticos para as

fêmeas cultivadas separadas.

Um das maneiras de se obter populações monosexo é através da reversão sexual por meio de hormônios. Os primeiros registros do uso desse método datam de 1937, quando foi aplicado para reversão sexual da truta arco-íris (PADAIO, 1937). Desde então, essa técnica tem sido continuamente aprimorada e aplicada ao redor do mundo em diversas espécies de peixes de interesse comercial, como é o caso do salmão (*Salmo salar*) e da tilápia (*Oreochromis* sp), (PANDIA e SHEELA, 1995; JUDYCKA et al., 2021; SILVA et al., 2023). No Brasil, a reversão em nível comercial é aplicada majoritariamente na tilapicultura (REIS et al., 2016), apesar disso, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com espécies nativas, como é o caso do jundiá *Rhamdia quelen* (AMARAL JUNIOR et al., 2008; WEISS et al., 2018), do tambaqui *Colossoma macropomum* (REIS e ALMEIDA, 2018) e do lambari (BEM et al., 2012). Esse último ainda sem atingir a reversão completa do lote.

A reversão sexual pode ser realizada na forma direta ou indireta. Na forma direta, para produção de populações femininas, são ofertados hormônios estrógenos (17β -estradiol) durante os estágios iniciais de desenvolvimento, quando as gônadas ainda estão indiferenciadas. Já na forma indireta, fêmeas genóticas (XX) são masculinizadas com hormônios andrógenos (17α -metiltestosterona) e, na idade adulta, ovócitos de fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genóticas XX) são fertilizados com o sêmen dessas fêmeas masculinizadas (XX), chamadas de neomachos (TOLEDO-FILHO et al., 1996; DUNHAM, 2011). Desta forma, a progênie resultante será teoricamente composta por 100% de fêmeas.

Apesar de muito utilizada, a técnica de reversão direta durante a larvicultura é bastante criticada pelo risco de contaminação ambiental (JOHNSTONE et al., 1983; PANDIAN e SHEELA, 1995) e pelo fato de o peixe destinado ao consumo ter recebido hormônio em alguma fase da sua vida. Desta forma, a reversão indireta se mostra mais vantajosa, pois uma vez obtidos os parentais revertidos, todos os lotes descendentes serão monossexuados e livres de tratamento hormonal (TOLEDO-FILHO et al., 1996; PIFERRER, 2001), além de diminuir os riscos de contaminação da água e do solo. A reversão indireta só é aplicada em espécies nas quais as fêmeas são o sexo homogamético (XX) e os machos, o heterogamético (XY) (TOLEDO-FILHO et al., 1996; DUNHAM, 2011), como na *A. altiparanae*, espécie sinônima de *A. lacustris* (LUCENA e SOARES, 2016; NASCIMENTO et al., 2019).

Apesar de ser uma técnica já consolidada, ela é espécie-específica e requer estudos com a espécie alvo para se determinar o hormônio mais adequado, as doses ideais, o método de oferta e a duração do tratamento. A implementação de estratégias de produção de populações monossexo femininas aumenta a produtividade e a uniformidade do tamanho de despesca, contribuindo para o desenvolvimento da lambaricultura no país.

1.2- Objetivos

Objetivo Geral

- Identificar molecularmente a espécie utilizada e produzir lotes monossexo masculino através da reversão sexual hormonal no *Astyanax lacustris*.

Objetivos específicos

- Identificar com base em marcadores moleculares a espécie utilizada e avaliar sua similaridade com espécimens de diferentes bacias;
- Determinar a dose ideal de 17α -metiltestosterona e o tempo de exposição ideais para a obtenção do maior percentual de machos de *Astyanax lacustris*;
- Avaliar possíveis danos genéticos causado pelo uso do 17α -metiltestosterona nos animais;
- Avaliar o crescimento animal pós masculinização.

2- Artigo científico I

**Filogeografia do *Astyanax lacustris* clado do São Francisco:
uma história diferente**

Resumo

O gênero *Astyanax* é um dos mais diversos da família Characidae, com cerca de 100 espécies válidas. Devido a sobreposição de caracteres morfológicos, morfométricos, merísticos e padrões de coloração, a dificuldade de classificação de indivíduos desse gênero é desafiadora. Assim, o uso de ferramentas moleculares são fundamentais para auxiliar na identificação e na avaliação de possíveis diferenças genéticas entre as populações de *Astyanax* em diferentes bacias. Este trabalho teve como objetivo avaliar exemplares de *A. lacustris* utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) das bacias do São Francisco (SF), do Atlântico nordeste oriental (LC) e do Paraná (PR) para averiguar as possíveis diferenças genéticas entre essas populações. Foram amostrados 40 indivíduos originalmente oriundos do lago de Moxotó pertencente ao submédio São Francisco, que tiveram suas sequências comparadas com as 102 sequências disponíveis no BOLD para as demais bacias. O K2P entre PR e as demais localidades foi de 3,8%. Na árvore bayesiana e na rede haplotípica, as amostras da bacia do São Francisco e do Atlântico nordeste oriental se agruparam independentemente das amostras do PR. Nossos resultados sugerem uma diversidade críptica entre as amostras da bacia do PR e as demais, indicando existência de mais de uma espécie.

Palavras-chave: Filogenia, peixes neotropicais, clado, DNA barcode

Abstract

The genus *Astyanax* one of the most diverse within the Characidae family, comprises approximately 100 valid species. Due to the overlap of morphological, morphometric, meristic, and coloration pattern characters, the corrected species identification of this genus is challenging. The use of molecular tools is crucial to aid in the identification and assessment of potential genetic differences among *Astyanax* populations in different basins. Thus, this study aimed to evaluate specimens of *A. lacustris* using the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI) from the São Francisco (SF), oriental northeast Atlantic, and Paraná (PR) basins to investigate possible genetic differences among them. Forty individuals originally from Moxotó reservoir in the sub-middle São Francisco were sampled and compared to 102 sequences available on BOLD for other basins. The K2P divergence between PR and other locations was 3.8%. In the Bayesian tree and haplotype network, samples from the SF and oriental northeast Atlantic basins clustered independently from PR samples. Our results suggest cryptic diversity between PR samples and others, indicating the occurrence of more than one species across the basins.

Keywords: Phylogeny, Neotropical fish, clade, DNA barcode

Introdução

A região Neotropical constitui o maior repositório de biodiversidade íctica das Américas, amparada por seu sistema hidrográfico antigo e diversificado (CIOFFI et al., 2012). Neste contexto, a história geomorfológica das bacias e o soerguimento de barreiras biogeográficas vem atuando na formação e composição taxonômica de biotas regionais estabelecidas sob padrões evolutivos diferenciados (JACOBINA et al., 2009), onde em alguns grupos de peixes com considerável diversidade, ampla distribuição geográfica, limites biogeográficos definidos e datáveis, evolução espaço-temporal, plasticidade genômica e especificidades ecológicas, os tornam importantes modelos para análise dos mecanismos envolvidos nos processos filogenéticos de especiação (CIOFFI et al., 2012; SEMBER et al., 2018). Por ser detentor de vasto território então constituído por um arcabouço dulcícola continental de grande biodiversidade ictiológica, o Brasil abriga cerca de 5777 espécies de peixes de água doce distribuídas em 39 famílias dentro de 9 ordens, onde destacam-se os abundante os Siluriformes (38%), os Characiformes (33%), os Cyprinodontiformes (13%), os Cichliformes (9%) e os Gymnotiformes (4%) (MALABARBA e MALABARBA et al., 2014).

Dentre as espécies de peixes Neotropicais geograficamente mais representativas, se destacam aquelas do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Characiformes) primeiramente inserido em Tetragonopterinae, mas posteriormente foi agrupado em Characidae (ORSI et al., 2004; LIMA et al., 2007), atualmente incluído em Stethaprioninae (MIRANDE, 2018), com cerca de 100 espécies válidas (ESCHMEYER e FONG, 2019). De fato, representantes deste grupo, são encontrados na maioria das bacias hidrográficas da América do Sul e Central (GARUTTI, 2003; PORTO-FORESTI et al., 2010). Entre estas, os *Astyanax lacustris*, *Astyanax altiparanae* e *Astyanax fasciatus* são espécies distribuídas em importantes bacias hidrográficas do continente sul-americano (GARUTTI, 1995; LUCENA e SOARES, 2016). O gênero *Astyanax* apresenta considerável plasticidade ecológica, sobre o qual um vasto conhecimento científico está disponível nos aspectos reprodutivos, ecológicos, genéticos e citogenéticos, mas apesar disto, se agrupam em complexos onde muitas espécies ainda são taxonomicamente indefinidas (PAZZA et al., 2008; PORTO-FORESTI et al., 2010; KAVALCO et al., 2011; YASUI et al., 2014; LUCENA e SOARES, 2016).

Inicialmente, a espécie *Astyanax bimaculatus* era o nome atribuído a muitas formas do

gênero *Astyanax*, principalmente devido a semelhanças nos padrões de coloração, onde a presença de uma mancha umeral escura horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons situadas na mesma região e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios caudais medianos (EIGENMANN, 1921), caracterizavam os indivíduos da espécie. Ao longo do tempo, o avanço da descrição de algumas espécies componentes do gênero, até então fundamentadas em dados merísticos e morfométricos para populações de lambari do rabo amarelo referidas como *A. bimaculatus*, separaram espécies próximas dentro do mesmo grupo (GARUTTTI e BRITSKI, 2000). Estas reclassificações sucessivas sugeriram diversos rearranjos aos *A. bimaculatus* e táxons como *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* ainda são considerados sinônimos juniores de *A. lacustris* (LÜTKEN 1875) (LUCENA e SOARES, 2016).

A taxonomia tem se beneficiado dos marcadores moleculares (mitocondriais e nucleares), que em decorrência de modificações espaço-temporais constituem ferramentas de análise populacionais, de identificação de espécies, distribuição biogeográfica e padrões filogenéticos (CARVALHO et al., 2011; COIMBRA et al., 2020, 2023). A alta taxa de mutações, a ausência de mecanismos de reparo durante a replicação e a herança exclusivamente materna tornam os marcadores mitocondriais particularmente úteis na construção filogenética e na inferência evolucionária histórica entre espécies relacionadas (AL-SAMARAI e AL-KAZAZ, 2015; CHAUHAN, 2010).

Marcadores mitocondriais interespecíficos, além de conservados são bem eficientes em evidenciar diferenças genéticas moleculares entre táxons, e resolutivos no reconhecimento e distinção de espécies crípticas (JACOBINA et al., 2020; ZANGL et al., 2020). Atualmente para acessar a biodiversidade de forma rápida e precisa na região mtDNA, a sequência da Citocromo Oxidase I (COI), conhecido popularmente como DNA Barcode tem sido muito útil desde sua descrição (HEBERT et al., 2003).

Esse tipo de abordagem tem sido fundamental para grupos que incluem complexos de espécies, como é o caso dos *Astyanax*. Gavazzoni et al. (2018), por meio de análises de citogenética básica e molecular, detectaram discrepâncias significativas na fórmula do cariótipo, na distribuição de heterocromatina e na localização dos sítios de rDNA 5S de *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis*, contrariando a proposta anterior de sinonimização feita por Lucena e Soares (2016). Cunha et al. (2019), utilizando citogenética e marcadores moleculares (*S72*, *RAG2* e *COI*), em *A. altiparanae* da bacia do Atlântico Sudeste, sugeriram que *A. altiparanae* e *A. lacustris* formavam clados

monofiléticos e deveriam ser consideradas como espécies distintas. Semelhantemente, Tonello et al. (2022) utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e citogenética com *A. lacustris* e seus sinônimos oriundos da bacia do rio Paraná, identificaram uma diversidade críptica desse grupo nessa região.

Embora muitos estudos tenham sido realizados com populações do Alto rio São Francisco e da bacia do Paraná, pouco se sabe sobre as populações do Submédio e Baixo São Francisco. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a possível ocorrência de diversidade críptica entre os espécimes de *A. lacustris* das bacias do São Francisco e do Paraná, utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI).

Material e métodos

Amostras

Foram coletadas amostras de nadadeira caudal de 40 exemplares de lambari do rabo amarelo oriundos da região do submédio São Francisco no reservatório de Moxotó, (-9.364498, -38.230087), em Paulo Afonso, Bahia (daqui em diante nomeadas como SMSF) que foram mantidas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso – EPPA. As amostras foram armazenadas em etanol 95% em ultrafreezer (-80 °C). Além disso, foram utilizadas sequências Citocromo Oxidase I (COI) depositadas nas bases de dados BOLD (Barcode of Life Data, www.boldsystems.org) e GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), cujos números estão no anexo I, de exemplares identificados como *A. lacustris* de diferentes pontos da bacia do São Francisco (SF), de lagoas costeiras – bacia do atlântico nordeste oriental (LC) e da bacia do rio Paraná (PR) (Figura 1). As localizações das sequências estão representadas no mapa (Figura 1).

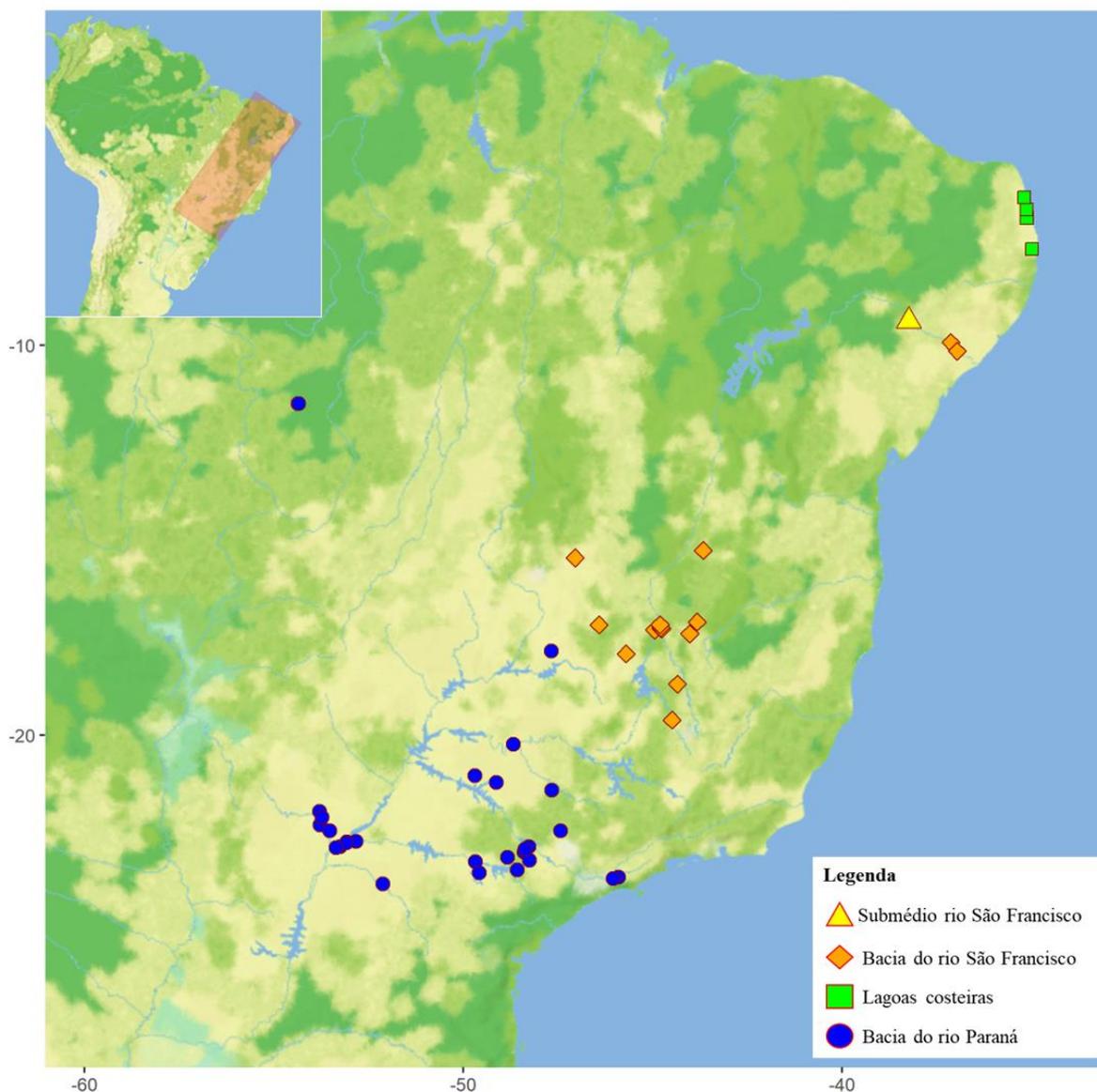


Figura 1. Localização das amostras de *Astyanax lacustris* coletadas no submédio São Francisco (SMSF) e das sequências do BOLD system provenientes da bacia do rio São Francisco (SF), lagoas costeiras (LC) e bacia do rio Paraná.

Extração de DNA e sequenciamento

O DNA total foi extraído seguindo o protocolo de fenol:clorofórmio, conforme descrito por Sambrook et al. (2012). As amostras de DNA foram quantificadas por fluorímetro (Quantus - Promega) e sua integridade foi avaliada em eletroforese de gel de agarose a 0,8%.

Para amplificação do COI, foram utilizados os primers FishF1

(TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC), FishR1
(TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA) (Ward et al., 2005), seguindo o protocolo descrito por Ivanova et al. (2007).

Os amplicons foram purificados com EXOI/SAP (New England Biolabs) e amplificados bidirecionalmente utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem™) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, os amplicons resultantes foram novamente purificados por meio de precipitação com NaOAC 3M pH 5,8, EDTA 125 mM pH 8 e etanol absoluto. As amostras foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™).

Análises filogenéticas e de diversidade

As sequências foram editadas no software MEGA v11.0 (TAMURA et al., 2021) e alinhadas com o método CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994). Para identificação das amostras, as sequências foram comparadas com sequências existentes no Genbank utilizando a ferramenta de alinhamento local (BLASTn).

Para as análises de distância, as amostras foram agrupadas em quatro grupos, de acordo com a sua origem, sendo as amostras do submédio São Francisco (SMSF), amostras do GenBank da bacia do São Francisco (SF), de lagoas costeiras (LC) e da bacia do rio Paraná (PR). A distância genética dentro e entre os grupos foi calculada com o modelo de substituição Kimura 2-parameter (K2P) no MEGA11 (TAMURA et al., 2021). O programa DnaSP v6.10.04 (ROZAS et al., 2017) foi utilizado para estimar as diversidades nucleotídica (π) e haplotípica (H_d), o número de haplótipos (H) e para realizar os testes de neutralidade de Tajima's D (TAJIMA, 1989) e Fu & Li D teste (FU e LI, 1993).

Para a construção da árvore bayesiana foi utilizado o JModelTest v.2.1.4 (POSADA, 2008) a fim de identificar o melhor modelo de substituição utilizando o BIC (Bayesian Information Criterion). O melhor modelo encontrado para o COI foi o HKY+I. A IB foi conduzida no BEASTi v2.6.7 (BOUCKAERT et al., 2019) usando 100 milhões de gerações de cadeias de Markov e Monte Carlo e coletando a cada 100 mil gerações, em triplicata com um burn-in de 25%. A construção da árvore bayesiana foi editada no FigTree v1.4.4 (RAMBAUT, 2018). Sequências de COI de *Astyanax scabripinnis* (GU702188), *Psalidodon fasciatus* (KY267303) e *Megaleporinus obtusidens* (KU134859) foram utilizadas como outgroup.

As distâncias genéticas também foram estimadas pelo do método ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery - ABGD, PUILANDRE et al., 2012), utilizando o modelo de distância simples na ABGD interface web (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>). Além disso, também foram utilizados os métodos de Máxima Parcimônia (M.P.) com bootstrap de 1000 no e Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) com o modelo Kimura-2-parameter no MEGA11 (TAMURA et al., 2011) e os agrupamentos foram apresentados em barras junto a árvore bayesiana.

O software PopART v 1.7 (LEIGH e BRYANT, 2015) foi usado para a construção da rede de haplótipos utilizando o método Median-Joining (BANDELT et al., 1999).

A análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada no programa Arlequin v3.5.22 (EXCOFFIER et al., 2005) a para investigar a estrutura genética entre e dentro dos grupos populacionais, considerando como grupos os haplogrupos que eventualmente se formariam na rede haplotípica.

Resultados

Citocromo Oxidase I (COI)

Após o alinhamento e corte foram obtidas sequências com 612pb. A análise BLASTn das 40 sequências de COI demonstrou uma correspondência de 100% de similaridade com registros do GenBank para *A. lacustris*.

Um total de 44 haplótipos foram encontrados, sendo quatro deles no submédio São Francisco, 19 nas sequências da bacia do rio São Francisco, três nas Lagoas Costeiras e 22 nas sequências da bacia do Rio Paraná (Tabela 1). O haplótipo 1 incluiu 32 espécimes de SMSF, 3 de SF e 4 de LC. As diversidades haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) variaram entre 0,345 e 0,922, e entre 0,001 e 0,012, respectivamente (Tabela 1). Os testes de Fu & Li e Tajima D só foram significativos para SF.

Tabela 1. Número de haplótipos, diversidade haplotípica e nucleotídica e testes de neutralidade estimados para o gene mitocondrial COI de exemplares de *Astyanax lacustris* provenientes da Bacia do rio São Francisco (SMSF e SF), Lagoas Costeiras (LC) e Bacia do Paraná (PR).

Populações	n	Haplótipos	Hd	π	Fu & Li	Tajima
SMSF	40	4	0.345	0.001	-1,616	-0,856
SF	37	19	0.922	0.005	-3,240	-1,855
LC	9	3	0.722	0.003	1,270	1,305
PR	56	22	0.917	0.012	-2,472	-0,922

n: número de sequências avaliadas; Haplótipos: número de haplótipos por população; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; Fu & Li D teste; Tajima's D teste. Em negrito estão os valores significativos para $p < 0,05$.

A distância K2P foram menores para as amostras SMSF, SF e LC, tanto dentro quanto entre grupos, variando de 0,1% (SMSF) a 0,5% (SF) dentro do grupo e de 0,2% a 0,4% entre grupos. Enquanto isso, a distância K2P entre grupos, revelou uma distância de 3,8% entre as amostras de PR e as demais (Tabela 2).

Tabela 2. Distância Kimura 2-parametros (K2P) entre grupos (abaixo da diagonal) e dentro do grupo (diagonal em negrito) estimadas com COI para *A. lacustris* da Bacia do rio São Francisco, Lagoas Costeiras e Bacia do Paraná.

	SMSF	SF	LC	PR
SMSF	0,001			
SF	0,003	0,005		
LC	0,002	0,004	0,003	
PR	0,038	0,038	0,038	0,012

A árvore filogenética mostrou quatro clados, um deles formado pelas sequências do SMSF juntamente com as 37 sequências do BOLD para *A. lacustris* provenientes da bacia do São Francisco (SF) e as 9 sequências de lagoas costeiras (LC), separado dos outros clados com altos valores de probabilidade posterior (Figura 2). A distância calculada pelos métodos de Máxima Parcimônia e UPGMA mostraram a existência de três haplogrupos: um haplogrupo entre as amostras deste trabalho (SMSF), as sequências da bacia do SF e lagoas costeiras. Um segundo haplogrupo, similar ao clado 2 da árvore bayesiana, formado por 43 sequências da bacia do rio Paraná, provenientes de SP, MS, MG, GO e PR. Um terceiro haplogrupo, similar aos clados 3 e 4 da árvore bayesiana, foi formado por 13 sequências da bacia do rio Paraná, sendo 11 da região de SP, uma de MS e outra do PR.

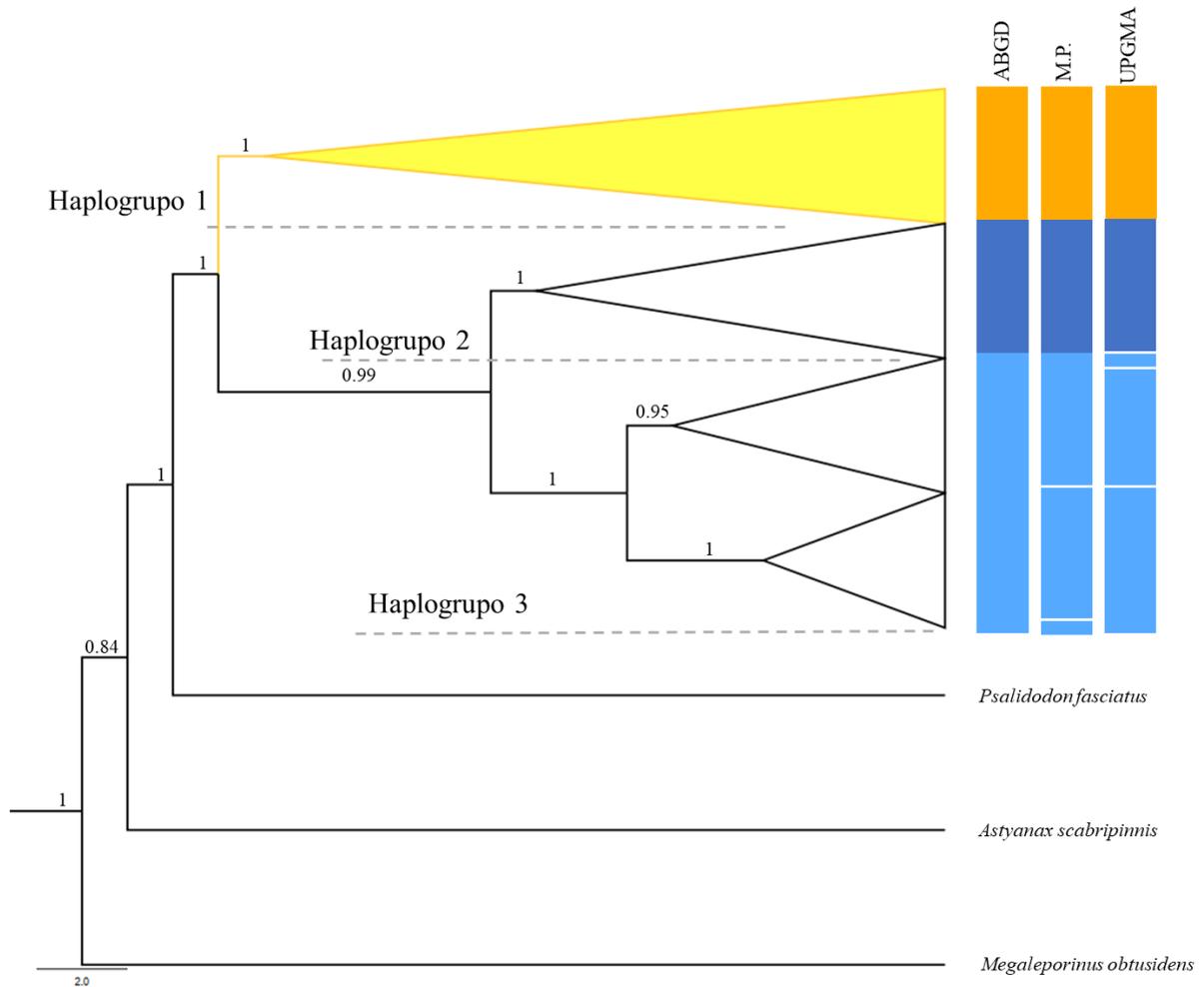


Figura 2. Árvore bayesiana reconstruída com base em sequências de COI de indivíduos de *Astyanax lacustris* provenientes da Bacia do rio São Francisco, Lagoas Costeiras e Bacia do rio Paraná. As barras do lado direito representam o Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Máxima parcimônia (M.P.) e o Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA).

A rede haplotípica (Figura 3) mostrou um agrupamento semelhante ao indicado pelo ABGD (Figura 2). Foi observado a presença de 44 haplótipos divididos em três haplogrupos, o haplogrupo 1 formado pelas amostras SMSF, SF e LC e os haplogrupo 2 e 3 formados pelas amostras da bacia do rio Paraná. Dentro de cada haplogrupo, a maioria dos haplótipos apresentou uma distância de uma única mutação entre os demais. O haplogrupo 1 se distanciou em 18 e 14 passos evolutivos dos haplogrupos 2 e 3, respectivamente. Já para o haplogrupo 2 e 3, a distância entre o haplótipo 20 e os haplótipos 44 e 8 foi de 12 passos evolutivos. Os haplogrupos 1, 2 e 3 possuem a mesma formação dos clados 1, 2 e 3 da árvore bayesiana, respectivamente.

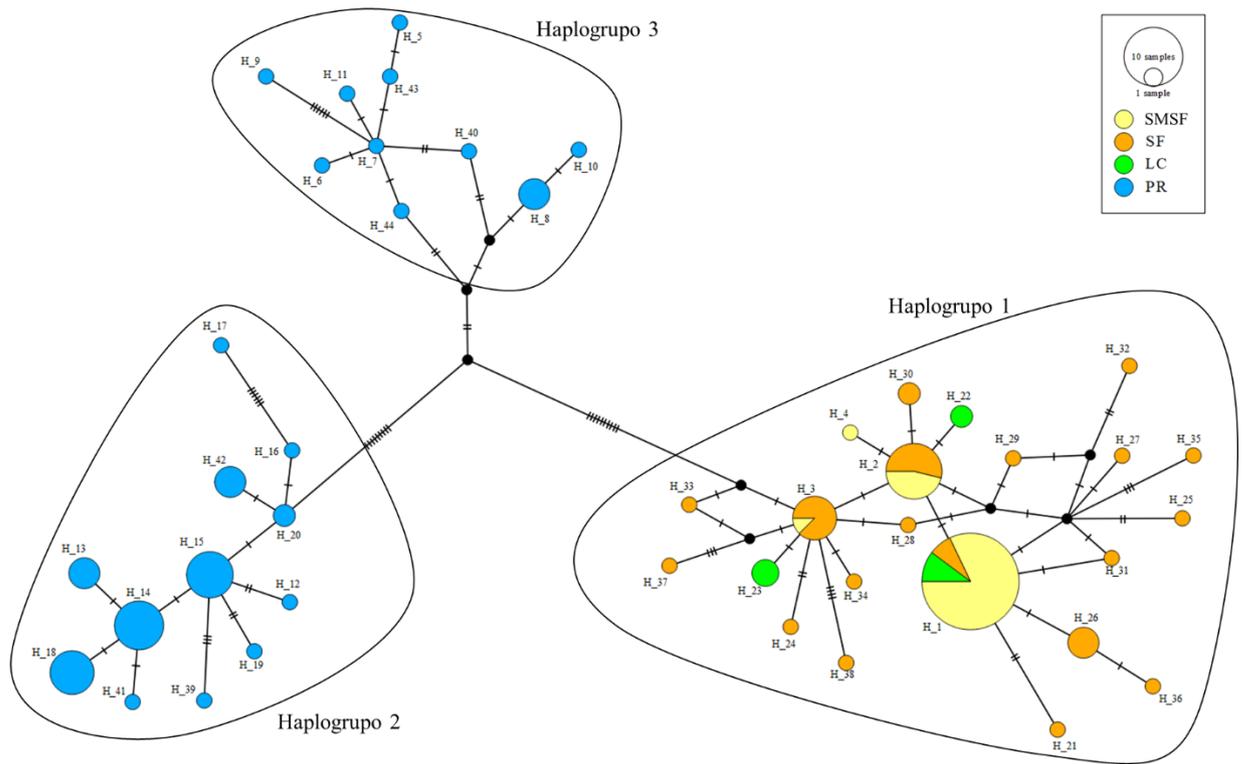


Figura 3. Rede haplotípica baseada no método Median-joining para COI de exemplares de *Astyanax lacustris* provenientes da Bacia do rio São Francisco, Lagoas Costeiras e Bacia do Paraná. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências dos haplótipos e os traços representam a quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos. SMSF: Amostras do submédio rio São Francisco utilizadas nesse estudo (amarelo); LC: seqüências de lagoas costeiras (verde); SF: seqüências da bacia do rio São Francisco (laranja); PR: Seqüências da bacia do rio Paraná (azul); Outgroup: *Psalidodon fasciatus* (vermelho).

O histograma de distâncias intra e interespecíficas do ABGD mostrou um barcode gap de 0,02 entre o haplogrupo 1 e os haplogrupo 2 e 3 (Figura 5). Os haplogrupos 2 e 3 não apresentaram barcode gap entre eles.

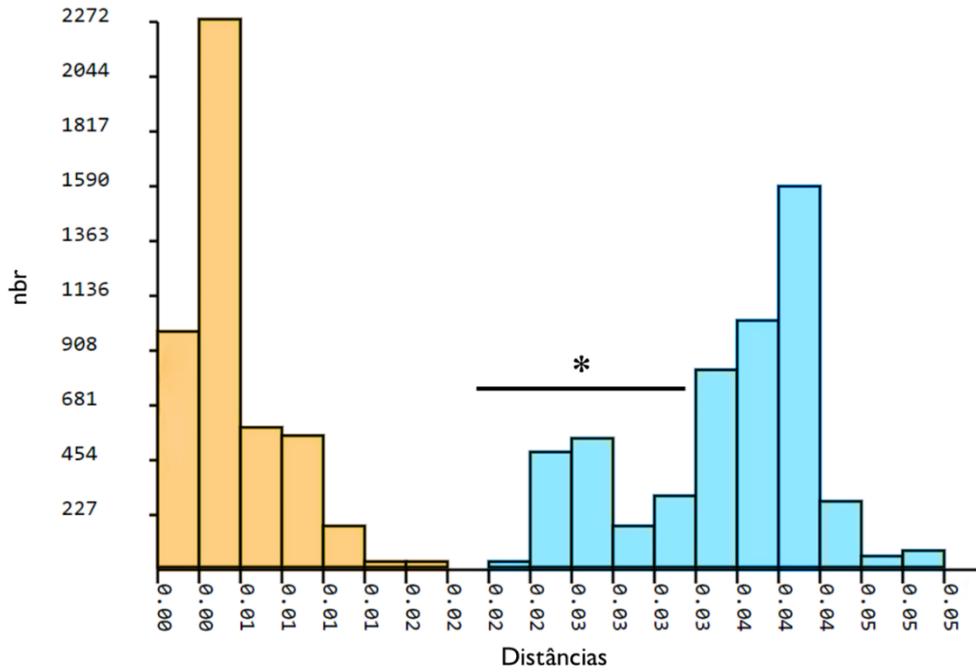


Figura 5. Histograma de distâncias intra e interespecíficas geradas pelo ABGD baseadas em sequências de COI de indivíduos de *Astyanax lacustris* provenientes da Bacia do rio São Francisco, Lagoas Costeiras (laranja) e Bacia do Paraná (azul). * Haplogrupo 3.

A análise de variância molecular (AMOVA), utilizando um cenário hierárquico sugerido pela rede haplotípica (haplogrupos 1, 2 e 3), indicou que a diferença dentro das amostras explicou 9,72% ($F_{ST}=0,90284$) da variância molecular total, ao passo que 89,02% da variância foi explicada pela diferença entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) para sequências de COI de exemplares de *Astyanax lacustris* provenientes da bacia do rio São Francisco, Lagoas Costeiras e bacia do Paraná.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de Variação	Índices de fixação
Entre os haplogrupos 1, 2 e 3	2	735,297	9,58453 Va	89,02	$F_{CT} = 0,89016$ ($p=0.09$)
Entre amostras dentro dos haplogrupos 1, 2 e 3	2	8,992	0,13653 Vb	1,27	$F_{SC} = 0,11544$ ($p=0.00$)
Dentro das amostras	137	143,324	1,04616 Vc	9,72	$F_{ST} = 0,90284$ ($p=0.00$)
Total	141	887,613	10,76722		

Em negrito estão os valores significativos para $p < 0,05$.

Discussão

O rio São Francisco abriga 211 espécies de peixes e 64% delas são endêmicas dessa bacia (REIS et al., 2016). Apesar disso, sua ictiofauna possui uma grande similaridade com a bacia do alto Paraná (BUCKUP, 2011). Esse fato, se deve as atividades tectônicas datadas do Terciário que concomitantemente ao complexo sistema de falhas tectônicas da região, resultou em sucessivos eventos de captura de cabeceiras, causando a distribuição de algumas espécies para as drenagens vizinhas, como é o caso do rio São Francisco (BRITSKI et al., 1988, AB SABER, 1998; BRITTO e CASTRO, 2002; LANGEANI et al., 2007).

Isso gerou um processo de especiação vicariante em muitas espécies, que é quando uma população ancestral é distribuída em duas ou mais áreas e surge uma barreira efetiva entre as subpopulações isoladas. Assim, nessas bacias existem várias espécies revisadas atualmente que são consideradas como “complexo de espécies” e outras como sinônimas (RIBEIRO, 2006).

Mais recentemente, o rio São Francisco voltou a se conectar com o Alto da bacia do Paraná através da construção da usina hidrelétrica de Furnas nos anos de 1960, quando o rio Piumhi, afluente do Rio Grande pertencente a Bacia do Rio Paraná, teve seu curso desviado para desaguar no rio São Francisco, possibilitando mais uma vez a introdução de espécimes da bacia do Paraná para habitar trechos do Alto rio São Francisco (MOREIRA FILHO e BUCKUP, 2005).

Apesar da distância e das barreiras entre os pontos de coleta das amostras ao longo do São Francisco e das lagoas costeiras, nossos resultados para a árvore bayesiana mostrou um agrupamento onde todas as 40 amostras desse estudo formaram um clado com alto valor de suporte com as 37 amostras de SF e as 9 amostras das LC. Já as amostras da bacia do Paraná formaram outros clados independentes (Figura 2). Mesmo não havendo uma unanimidade entre a árvore bayesiana, ABGD, ML e UPGMA para a indicação de um ou dois haplogrupos, nenhuma das amostras da bacia do Paraná se agruparam com as amostras da bacia do SF.

As diferenças genéticas K2P entre os grupos do Paraná e os demais foi de 3,8%. Segundo Ward (2009), uma diferença maior que 2% têm uma probabilidade de 95% de indicar a presença de diferentes espécies. Da mesma forma, a distância ABGD mostrou um barcode gap de 2% entre o haplogrupo do São Francisco e os da bacia do Paraná, mas não entre os dois desta última bacia.

A AMOVA apontou que as amostras do São Francisco (haplogrupo 1=SMSF+SF+LC) são diferentes daquelas do Paraná (haplogrupo 2 e 3), com uma porcentagem de variação entre os grupos de 89,02%. Essa diferenciação entre as bacias pode indicar um processo de especiação vicariante e que estão se diferenciando. Semelhantemente, Peres et al. (2012) quando avaliaram espécimes do gênero *Astyanax* do grupo “bimaculatus” provenientes do rio Grande, Piumhi e São Francisco, encontraram alterações no cariótipo, com diferenças nos números de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos. Esses autores registram um citótipo no rio Grande e um outro citótipo no rio São Francisco. Já para o rio Piumhi, a região de transição entre as bacias, foi encontrado um citótipo intermediário em relação aos dois mencionados anteriormente, além de outros dois distintos. Os autores sugeriram que os grupos do rio Grande e do São Francisco divergiram durante um isolamento geográfico anterior, mas apesar disso, eles ainda mantêm uma proximidade significativa, possibilitando cruzamentos e originando uma zona híbrida secundária, causada pela quebra do isolamento geográfico no rio Piumhi.

Da mesma forma, Peres et al. (2009), avaliando *A. fasciatus* (agora *Psalidodon fasciatus* Cuvier, 1819 (PASA et al., 2021; TERÁN et al., 2020)) no rio Grande, Piumhi e São Francisco, encontraram citótipos diferente entre a bacia do Paraná e São Francisco. Para essa espécie, os autores não encontraram um citótipo intermediário, apenas encontraram o cariótipo da bacia do Paraná na região de transição onde o rio Piumhi foi deslocado, sugerindo uma exclusão competitiva entre os citótipos.

Estudos avaliando molecularmente amostras de *A. lacustris* provenientes de outros tributários do rio São Francisco, principalmente nas regiões próximas e subsequentes, onde houve a transposição do rio Piumhi no rio São Francisco, poderiam elucidar se há uma diversidade críptica entre as duas bacias devido a sua história geológica e por isso hoje é possível observar dois grupos diferentes ou se de fato trata-se de duas espécies diferentes.

A bacia do Paraná ocupa uma área de 900.00 km² com uma declividade de 0.8 cm/km,

e abriga aproximadamente 310 espécies de peixes. A região do alto Paraná faz fronteira com o médio Paraná em uma região anteriormente caracterizada por cachoeiras de até 60 m, como as Sete Quedas, que foram inundadas para a construção do lago da usina Hidrelétrica de Itaipu (AGOSTINHO e JÚNIOR, 1999; AGOSTINHO et al., 2008). Devido a essas barreiras, essa região possui um alto endemismo, com sua fauna de peixes se diferenciando das demais partes da bacia (BONETTO 1986; BRITSKI e LANGEANI 1988; LANGEANI et al. 2007; BUCKUP, 2011)

Neste estudo, os diferentes modelos variaram na indicação da quantidade de grupos presente entre as amostras da bacia do Paraná, todavia, nenhum deles indicou a presença de um único grupo. Na árvore bayesiana, as amostras se agruparam em três clados diferentes, semelhante ao indicado nos modelos de ML e UPGMA. Já a rede haplotípica e o ABGD evidenciaram a existência de dois haplogrupos que não apresentaram barcode gap entre eles mesmo em uma análise utilizando apenas as amostras do Paraná (dados não apresentados).

Semelhantemente, alguns autores analisando apenas amostras da Bacia do Paraná encontraram distinção dentro desse grupo. Altos valores de diferenças K2P utilizando COI foram encontrados por Pereira et al. (2013) quando avaliaram espécimes de “*A. altiparanae*” no alto da bacia do Paraná (K2P= 2,6%) e por Tonello et al. (2022), que encontraram valores entre 3,13 e 8,8% entre haplogrupos de *A. lacustris* na região do lago de Itaipu. Esses mesmos autores, encontraram um barcode gap de 2%, e sugeriram a possibilidade da existência de mais de uma espécie ou a existência de diversidade críptica na bacia do Paraná.

As avaliações moleculares presentes nesse estudo sugerem a existência de um clado específico para espécimes de *Astyanax lacustris* da região da bacia do rio São Francisco e bacia do Atlântico nordeste oriental, diferente dos indivíduos da bacia do rio Paraná. A história geológica das bacias indica a ocorrência de um processo de especiação vicariante, devido aos sucessivos eventos de captura de cabeceira, onde espécies inicialmente habitantes da bacia do Paraná foram distribuídas no São Francisco. Com o isolamento geográfico o fluxo gênico foi interrompido entre as bacias causando um alto nível de especiação entre elas.

Logo, nossos resultados evidenciaram um nível de diversidade críptica diferente do

que foi proposto pela sinonimização das espécies *A. altiparanae*, *A. asuncionensis* e *A. jacuhiensis* em *A. lacustris*, indicando a possibilidade de existência de duas espécies distintas, uma pertencente a bacia do rio São Francisco e outra a bacia do rio Paraná. Contudo, para determinar com exatidão o nível de diferenciação entre as bacias, será necessário a utilização de uma combinação de marcadores moleculares e citogenéticos.

Referências

AB SABER, N.A. Megageomorfologia do território brasileiro. In: CUNHA, S.B.; GUERRA, A.J.T. (eds.) Geomorfologia do Brasil. Bertand Brasil, Rio de Janeiro, 1998. p.71-106.

AGOSTINHO AA, PELICICE FM, GOMES LC. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.1119-32, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000500019>.

AGOSTINHO, A.A.; JÚNIOR, H.F.J. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Cunningham. São Paulo: EDUSP, 1999. p.374-400.

AL-SAMARAI, F.R.; AL-KAZAZ, A.A. Molecular markers: An introduction and applications. **European Journal of Molecular Biotechnology**, v.9, p.118-30, 2015. DOI: <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>.

BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.37–48, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.

BONETTO, A.A. The Paraná River system. In: DAVIES, B.R.; WALKER, K.F. (eds.). The ecology of river systems. Dordrecht, Dr. W.Junk Publishers, 1986, p.541-555.

BOUCKAERT, R.; VAUGHAN, T.G.; BARIDO-SOTTANI, J.; DUCHÊNE, S.; FOURMENT, M.; GAVRYUSHKINA, A.; HELED, J.; JONES, G.; KÜHNERT, D.; DE MAIO, N.; MATSCHINER, M. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS computational biology**, v.15, p.e1006650, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>.

BRITSKI, H.A.; LANGEANI, F. *Pimelodus paranaensis*, sp.n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, p.409-

417, 1988.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco – CODEVASF, Brasília. 1988.

BRITTO, M.R.; CASTRO, R.M.C. New Corydoradine catfish (Siluriformes: Callichthyidae) from the upper Paraná and São Francisco: the sister group of *Brochis* and most of *Corydoras* species. **Copeia**, v.2002, p.1006-1015, 2002.

BUCKUP, P.A. The Eastern Brazilian Shield. In: ALBERT, J.; REIS, R.E. (ed.) Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Oakland, CA, University of California Press, 2011. P.203-210.

CARVALHO, D.C.; NETO, D.A.; BRASIL, B.S.; OLIVEIRA, D.A. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. **Mitochondrial DNA**, v.22, p.97-105, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588219>.

CHAUHAN, P. “Review of ‘Petraglia, M.D. and B. Allchin (eds.) – The Evolution and History of Populations in South Asia: Inter-Disciplinary Studies in Archaeology, Biological Anthropology, Linguistics and Genetics. **PaleoAnthropology**, v.1, p.64–71, 2010.

CIOFFI, M.B.; MOLINA, W.F.; ARTONI, R.F.; BERTOLLO, L.A.C. 2012. Chromosomes as tools for discovering biodiversity - the case of Erythrinidae fish family. In: TIRUNILAI, P. (eds). Recent trends in cytogenetic studies - methodologies and applications. Rijeka, InTech, 2012. p. 125-146.

COIMBRA, M.R.; BENEVIDES, E.; FARIAS, R.D.; DA SILVA, B.C.; CLOUX, S.; PÉREZ-MUÑUZURI, V.; VERA, M.; TORRES, R. Restricted connectivity for cobia *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae) in the Western Atlantic Ocean. **Fisheries Oceanography**, v.1, p.1-14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/fog.12642>.

COIMBRA, M.R.; DANTAS, H.L.; LUNA, M.M.; LIMA, M.A.; SALES, M.; DA SILVA, B.C.; LIMA, A.P. High gene flow in two migratory Neotropical fish species, *Salminus franciscanus* and *Brycon orthotaenia*, and implications for conservation aquaculture. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v.30, p.1063-1073, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/aqc.3336>.

CUNHA, M.S.; FREGONEZI, A.R.; FAVA, L.; HILSDORF, A.W.; CAMPOS, L.A.; DERGAM, J.A. Phylogeography and historical biogeography of the *Astyanax bimaculatus* species complex (Teleostei: Characidae) in coastal southeastern South America.

Zebrafish, v.16, p.115-27, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1668>.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology**, v.43, p.209–310, 1921.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. 2019. **Catalog of fishes**. Disponível em: <<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>.

Acesso em 25 de setembro de 2023.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v.1, p.47-50, 2005.

FU, Y.X.; LI, W.H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v.133, p.693-709, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/133.3.693>.

GARUTTI, V. Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. 1995. **Tese (Livro-Docência)** - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS Ser Zool**, v.13, p.65–88, 2000.

GAVAZZONI, M.; PAIZ, L.M.; OLIVEIRA, C.A.; PAVANELLI, C.S.; GRACA, W.J.; MARGARIDO, V.P. Morphologically cryptic species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup diagnosed through cytogenetic characters. **Zebrafish**, v.15, p.382-388, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1574>.

HEBERT, P.D.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v.270, p.313-21, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

JACOBINA, U.P.; AFFONSO, P.R.A.M.; CARNEIRO, P.L.S.; DERGAM, J.A. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p.617-622, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252009000400009>.

JACOBINA, U.P.; TORRES, R.A.; DE MELLO AFFONSO, P.R.A.; DOS SANTOS, E.V.; CALADO, L.L.; DE ARAÚJO BITENCOURT, J. DNA barcoding reveals cryptic

diversity and peculiar phylogeographic patterns in mojarra (Perciformes: Gerreidae) from the Caribbean and South-western Atlantic. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.100, p.277-283, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0025315419001206>.

KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BRANDAO, K.D.O.; GARCIA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.D. Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae*–*Astyanax* aff. *bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.134, p.108-119, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1159/000325539>.

LANGHEANI, F.; CASTRO, R.M.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI, C.S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v.7, p.181-97, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000300020>.

LEIGH, J.W.; BRYANT, D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v.6, p.1110–1116, 2015.

LIMA, F.C.T.; BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; LUCENA, Z.M.S.; TOLEDOPIZA, M.; ZANATA, A. Família Characidae: Gêneros *incertae sedis*. In: BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. (eds.) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de JANEIRO, MUSEU NACIONAL, 2007. P. 44- 62.

LUCENA, C.A.; SOARES, H.G. Review of species of the *Astyanax Bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup *sensu* Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v.4072, p.101-125, 2016.

MALARBA, L.R.; MALARBA, M.C. 2014. Filogenia e Classificação dos Peixes Neotropicais. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. UNESP, Jaboticabal, 2014. p.1–12.

MIRANDE, J.M. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, v.35, p.1–19, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/cla.12345>.

MOREIRA FILHO, O.; BUCKUP, P.A. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotropical Ichthyology**, v.3, p.449-52, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1679-62252005000300015>.

ORSI, M.L.; CARVALHO, E.D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná,

Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, p.207-18, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000200008>

PASA, R.; MENEGIDIO, F.B.; RODRIGUES-OLIVEIRA, I.H.; SILVA, I.B.; CAMPOS, M.L.; ROCHA-REIS, D.A.; SEYMOUR, J.; SCHWARZACHER, T.; KAVALCO, K.F. Ten complete mitochondrial genomes of Gymnocharacini (Stethaproninae, Characiformes): evolutionary relationships and a repetitive element in the Control Region (*D-loop*), **Frontiers in Ecology and Evolution**, v.9, p. 650783, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.650783>.

PAZZA R, KAVALCO SA, PENTEADO PR, KAVALCO KF, DEALMEIDA-TOLEDO LF. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes)– a multidisciplinary approach. **Journal of Fish Biology**, v.72, p.2002-10, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01837.x>.

PEREIRA, L.H.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v.14, p.20, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20> » <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>.

PERES, W.A.; BUCKUP, P.A.; KANTEK, D.L.; BERTOLLO, L.A.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection. **Genetica**, v.137, p.305-311, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9389-4>.

PERES, W.A.M.; BERTOLLO, L.A.C.; BUCKUP, P.A.; BLANCO, D.R.; KANTEK, D.L.Z.; MOREIRA-FILHO, O. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: Karyotypic evidence in *Astyanax “bimaculatus group”* (Characiformes: Characidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p.519-526, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9246-2>.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. In: Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2.ed. Santa Maria: UFSM, 2010. p.111-116.

POSADA, D. jModelTest: phylogentic model averaging. **Molecular biology and evolution** v.25, p.1253–1256, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.

PUIILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v.21, p.1864–77, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>.

RAMBAUT, A. FigTree v.1.4.4, 2018. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 5 de agosto de 2023.

REIS, R.E.; ALBERT, J.S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M.M.; PETRY, P.; ROCHA, L.A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v.89, p.12-47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>.

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v.4, p.225-46, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000200009>.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S.E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, v.34, p.3299-302, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2012. 34p.

SEMBER, A.; BERTOLLO, L.A.; RÁB, P.; YANO, C.F.; HATANAKA, T.; DE OLIVEIRA, E.A.; CIOFFI, M.D. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Frontiers in genetics**, v.9, p.1-12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00071>.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585-595, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v.38, p.3022-3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TERÁN, G.E.; BENITEZ, M.F.; MIRANDE, J.M. Opening the Trojan horse: Phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.190, p. 1217-1234, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa019>.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

TONELLO, S.; BLANCO, D.R.; CERQUEIRA, F.J.; LIRA, N.L.; TRALDI, J.B.;

PAVANELLI, C.S.; MARGARIDO, V.P.; GAVAZZONI, M.; PUPO, M.V.; LUI, R.L. High rDNA polymorphisms in *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae): new insights about the cryptic diversity in *A. bimaculatus* species complex with emphasis on the Paraná River basin. **Neotropical Ichthyology**, v.20, p.e210147, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0147>.

WARD, R.D.; HANNER, R.; HEBERT, P.D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v.74, p.329-56, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x>.

YASUI, G.S.; SENHORINI, J.A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L.S.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L.A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v.9, p.464-70, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731114002511>.

ZANGL, L.; JUNG, M.; GESSL, W.; KOBLMUELLER, S.; RATSCHAN, C. Oriental or not: First record of an alien weatherfish (*Misgurnus*) species in Austria verified by molecular data. **BioInvasions Records**, v.9, p.375-83, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.2.23>.

3- Artigo científico II

**Effect of dosage of orally administered of 17α -methyltestosterone on sex reversion
of the yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*, Lütken, 1875)**

Artigo publicado na revista **Animal Reproduction**

ISSN 1984-3143

ORIGINAL ARTICLE

Effect of dosage of orally administered 17 α -methyltestosterone on sex reversion of the yellowtail tetra *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)

Renata da Silva Farias¹ , Karolayne Ribeiro da Silva Oliveira¹ , Marília Espíndola de Souza¹ ,
Dijaci Araújo Ferreira² , Alluanan Adelson do Nascimento Silva³ ,
Valdemiro Amaro da Silva Júnior³ , Rex Dunham⁴ , Maria Raquel Moura Coimbra^{1*} 

¹Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Colégio Agrícola Dom Agostinho Ikas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, São Lourenço da Mata, PE, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁴School of Fisheries, Aquaculture and Aquatic Sciences, Auburn University, Auburn, AL, USA

How to cite: Farias RS, Oliveira KRS, Souza ME, Ferreira DA, Silva AAN, Silva Júnior VA, Dunham R, Coimbra MRM. Effect of dosage of orally administered 17 α -methyltestosterone on sex reversion of the yellowtail tetra *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875). Anim Reprod. 2023;20(1):e20220080. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0080>

Abstract

The females of yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*), known as the freshwater sardine, are approximately 1.33 times larger than males, and thus, all-female monosex culture would increase production and reduce size variability. The present work aimed to identify the optimal dose of 17 α -methyltestosterone (MT) to be used in the masculinization of *A. lacustris* for indirect sex reversal. Three different concentrations of MT (20, 40, and 60 mg/kg of feed in the diet) were fed to the fry for 30 days. Thirty adult individuals from each treatment, including the control (0 mg MT/kg), were evaluated for gonadal development, morphological and histological sexual identification, zootechnical performance, and the possible genotoxic effect caused by prolonged exposure to MT. MT significantly ($P < 0.01$) affected the differentiation of the gonads, with the presence of possible inhibitory effects in all treatments. Intersex individuals were present in the 20 and 60 mg MT/kg treatments. All treatments were able to masculinize *A. lacustris* and the treatment with the lowest hormone concentration produced the highest percentage of males 76.7%, while the control had 46.7% males. The presence of erythrocyte nuclear alterations indicated a possible cytotoxic effect of MT in treatments 40 and 60 mg MT/kg, however, the use of the hormone did not affect the growth and the survival of the individuals. Thus, the use of MT is a viable option for obtaining neomales as a first step into the production of all-female progenies.

Keywords: biotechnology, neomale, phenotypic male, sex reversal.

Introduction

The yellowtail tetra, *Astyanax lacustris*, popularly known in Brazil as freshwater sardine, piaba or lambari, belongs to the order Characiforme, the Characidae family, and the Tetragonopterinae subfamily (Barbieri et al., 1982). They are small fish, benthopelagic, omnivorous with an insectivorous tendency and a short life cycle (Agostinho et al., 2004; Silva et al., 2012).

The yellowtail tetra aquaculture is a recent activity, and its production technology is still under development. It is an alternative financial source for small rural producers in Brazil (Fonseca et al., 2017), reaching 631 tons in 2020 (IBGE, 2020). It has a great potential to be developed in a sustainable way, promoting socio-economic development, improving food security, and developing local communities in Brazil. The yellowtail tetra has its own market niche. It has been appreciated as appetizer in restaurants, has been used as live bait for sport fishing and it is a feasible alternative for live bait in commercial tuna fishing (Valladão et al., 2018; Valenti et al., 2021).

*Corresponding author: maria.rmcoimbra2@ufrpe.br

Received: September 8, 2022. Accepted: December 31, 2022.

Financial support: None.

Conflicts of interest: The authors have no conflict of interest to declare.



Copyright © The Author(s). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Yellowtail tetra reaches sexual maturity in captivity in a period of up to four months, allowing several spawnings throughout the year (Garutti, 2003; Porto-Foresti et al., 2005; Abimorad and Castellani, 2011). Adult individuals show evident sexual dimorphism during the spawning season, males present an elongated body and are smaller than females, the latter also presenting a bulging belly (Súarez et al., 2017; Stevanato and Ostrensky, 2018).

Astyanax lacustris is a gonochoristic specie, i.e., each individual organism is either male or female (Leonard, 2019). Sex differentiation moment and sex determination system are not well known/described for *A. lacustris*, but in a sister species, *A. altiparanae*, it occurs at 58 days post-hatching (dph) and 73 dph for ovaries and testis, respectively (Adolfi et al., 2015), and it presents a XX/XY sex determination system (Lázaro et al., 2021).

The heterogeneity in the harvest size of adult males and females is a major problem faced by farmers. In order to decrease this variability and increase the efficiency and profitability of the cultivation of this species, the use of all-female progeny resulted in a higher growth rate when compared to traditional culture (Navarro et al., 2006; Bem et al., 2012). All-female progeny can be obtained via hormone sex reversal technique in a direct or indirect way, administering hormones by immersion or in the diet during the period of histological sexual differentiation. For the direct hormonal sex reversal, the estrogen hormone (estradiol-17 β) is supplied during the early stages of development. Yet for the indirect form, genotypic females are masculinized with the androgen hormone (17 α -methyltestosterone) becoming neomales, capable of producing sperm to fertilize oocytes of normal females (phenotypic and genotypic females) (Toledo-Filho et al., 1996; Dunham, 2011; Weiss et al., 2018a). In theory, the progeny resulting from the crossing of neomales (XX) with natural females (XX) will be composed exclusively of females.

Despite being widely used, the direct sexual reversion technique during larviculture is criticized for the potential risk of environmental contamination due to the periodic use of hormones (Johnstone et al., 1983; Pandian and Sheela, 1995; Thanasupsin et al., 2021) and the fact that fish for human consumption have received hormones in some stage of their life. Sex reversal and breeding, on the other hand, may be less harmful to the environment, as the frequency of hormone used will be lower, since it will only be used for the formation of the broodstock and not to reverse the offspring every new cycle, as in the direct sex reversion (Toledo-Filho et al., 1996; Piferrer, 2001; Dunham, 2011). In addition, the use of hormones for sex reversal can cause negative effects on growth, survival, and gonadal development, if a threshold dose is exceeded (Shen et al., 2015; Fatima et al., 2016). Thus, the timing, duration, and dosage of the hormone used to induce sex reversal are species-specific, and the effects and efficacy of its use for indirect sex reversal in yellowtail tetra, *A. lacustris*, have yet to be elucidated.

Studies using MT in the feed to produce neomales, which later can be used to produce an all-female population, have been done in different fish species, such as the Neotropical species jundiá (*Rhamdia quelen*) obtaining 72% of males at a dose of 60 mg/kg (Weiss et al., 2018a), and for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 96% of males were achieved at 2 mg/kg MT (Kashe et al., 2021). Also, for silver perch (*Bidyanus bidyanus*) 100% of males were obtained using 9 mg/kg (Sulaeman and Fotedar, 2017).

Thus, the aim of this work was to evaluate the effect of adding different concentrations of 17 α -methyltestosterone in the diet of yellowtail tetra *A. lacustris*, in order to establish a masculinization protocol for obtaining XX neomales.

Methods

Sexual reversal

To determine the optimal dose of the masculinizing hormone 17 α -methyltestosterone (MT), three different concentrations of the hormone in the diet were tested. The experiment was conducted at the Department of Fisheries and Aquaculture (DEPAq) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil. All procedures were performed in accordance with the Animal Ethics Committee at the Federal Rural University of Pernambuco (permit number 058/2019).

Five mature females (total length $9.7 \text{ cm} \pm 0.6$, weight $16.6 \text{ g} \pm 3.2$) and five males (total length $7.2 \text{ cm} \pm 0.5$, weight $4.8 \text{ g} \pm 1.2$) were selected and induced by intraperitoneal injection (just below the pectoral fin) of Ovopel® [(D-Ala⁶, Pro⁹-Net) – mGnRH + metoclopramide] (5 mg/kg for males and females). After hormone application, the breeders were transferred to 40-liter tanks in a ratio of 1 male: 1 female (one couple per tank). After spawning, the broodstock were removed and the eggs were kept with constant aeration and water renewal. Water quality parameters remained within acceptable values for the species during spawning and embryogenesis, mean temperature was maintained around $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.05$ and pH at 7.1 ± 0.09 .

On the second day post-hatching (dph), the larvae from the five couples were mixed in one tank and were randomly selected to avoid any family effect. Four treatments were tested with four replicates each, for a total of 16 tanks. One hundred larvae were distributed in each of the 16 polyethylene tanks of 40 L at a stocking density of 2.5 larvae/L. Each tank had an individual biological filter with a filtration capacity of 86 liters/h and constant aeration.

At three dph, *ad libitum* feeding was initiated with a diet containing 55% crude protein (CP) supplemented with different doses of MT (0, 20, 40, and 60 mg 17 α -methyltestosterone/kg feed) for 30 days, the same period tested before for direct hormonal sex reversal with estradiol-17 β (Bem et al., 2012). Fish were fed five times a day. In addition, during the first 20 days (3 to 22 dph), plankton from fertilized pond water filtered in an 80 μm mesh and freshly hatched brine shrimp nauplii (*Artemia franciscana*) were offered at a density of 500 nauplii/larvae/day, divided into three feedings. During the experiment, dissolved oxygen, temperature, and pH values were measured daily, and ammonia and nitrite values were measured weekly. Partial water changes were made when necessary.

After the 30-day period of hormone treatment, the individuals were fed twice daily exclusively with feed containing 45% CP without the addition of hormones and kept in the tanks for another 90 days.

At 122 dph, when the individuals were already sexually mature, 30 fish from each treatment were euthanized by immersion bath with eugenol to evaluate the efficiency of the hormone treatments, and final body weight, body depth (from the dorsal margin of the body to the ventral margin of the body, at the base of the pelvic fin where it attaches to the body), and total length were measured. Survival was evaluated at 32 and 122 dph.

Preparation of the feed supplemented with MT

Three diets were prepared with different doses of the hormone 17 α -methyltestosterone (20, 40, and 60 mg/kg feed) dissolved in 95% ethanol using the ethanol evaporation method (Celik et al., 2011). In addition, glycerin (0.5%/kg by volume) was added in order to prevent any harmful effects of the alcohol (El-Greisy and El-Gamal, 2012). After drying, the feed was divided into portions, packed in plastic bags and refrigerated, removing portions for immediate consumption. In the control treatment, 95% ethanol and glycerin were added to the feed, following the same procedure for drying and storage.

Sexing and histology

Gonads were evaluated at 122 dph for 30 individuals of each treatment for sex identification. The individuals were firstly classified based on gonads macroscopic morphology, as females when the presence of oocytes occupying a large part of the abdominal cavity was observed, while the males had whitish, opaque, and thin gonads (Nascimento et al., 2017). Individuals that exhibited both male and female gonads simultaneously were classified as intersex, and those that had undifferentiated gonads were classified as indeterminate.

Afterwards, those 30 individuals had their gonads evaluated histologically. For this, the samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The gonads were dehydrated in a graded series of ethanol, followed by immersion in 1-2-propylene oxide, and finally embedded in resin. Sections of 4 μm thick were made with a glass knife, which were stained with toluidine blue and examined under a light microscope.

Micronuclei and erythrocyte nuclear alterations

To evaluate a possible genotoxic effect caused by 17 α -methyltestosterone, 20 individuals of each treatment at 122 dph had peripheral blood collected via tail vein puncture with a 1.0 ml heparinized syringe. Blood smears were immediately prepared with one drop of blood (~50 μ l). The slides were dried at room temperature and then stained by the Panoptic fast staining technique (Laborclin). For each individual, two smears were prepared, and 1,000 erythrocytes were examined on each with 1,000 x magnification to determine the frequency of micronuclei and other nuclear alterations.

The evaluation of the frequency of micronuclei and other nuclear alterations were classified as described by Carrasco et al. (1990) for fish erythrocytes; micronucleus: is round or ovoid and has about one fifth of the size of the main nucleus, are non-refractory particles and present the same color and staining intensity as the main nucleus; binucleated: presents two nuclei in the same cell; blebbed nucleus: the nucleus shows a small evagination of the nuclear envelope; lobed nucleus: the nucleus presents larger evaginations than the blebbed; and notched nucleus: the nucleus presents a notable cut in the content of the nuclear material. Another type of nuclear alteration, which presents a constriction similar to the shape of the number eight, was also observed and classified as an “eight-shaped” nucleus according to Furnus et al. (2014).

Statistical analysis

Data for water quality, final body weight, body depth, and total length were presented as mean \pm standard deviation. For all data obtained, statistical tests were applied to verify the normal distribution of data and homogeneity of variances through the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Parametric variables (total length and survival) were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan’s test when significant differences between treatments were observed. For the non-parametric variables (body depth and body weight) the Kruskal-Wallis test was applied. The Chi-square (χ^2) test was used to compare the sex ratios of each treatment with the control.

The frequencies of micronuclei and other nuclear alterations were expressed per 1,000 cells ($^0/_{00}$). Kruskal-Wallis was utilized to compare the frequency of nuclear alterations between the treatments and the control, followed by Mann-Whitney test with *P* value adjusted by Bonferroni when significant differences between treatments were observed. For statistical analysis, micronuclei, which are standard indicators of genotoxicity, were considered separately from other nuclear alterations, and the nuclear alterations were considered together. Statistical analyses were performed using R v. 4.0.2 (R Core Team, 2020) and a 5% significance level was adopted for all tests.

Results

Throughout the experiment, the mean values of temperature (28.03 \pm 0.05), pH (7.14 \pm 0.09), dissolved oxygen (6.68 mg/l \pm 0.04), ammonia (0.67 \pm 0.09), and nitrite (0.82 \pm 0.32) remained within acceptable values for the species in all treatments.

At 122 dph, the values of total length, body depth and body weight did not show significant differences among treatments (*P* >0.05), with means of 5.97 cm (\pm 0.06), 1.53 cm (\pm 0.03), and 2.65 g (\pm 0.13), respectively. Survival ranged from 62% to 75% at 32 dph and 49% to 62% at 122 dph, differing between treatments at both times (*P* <0.05) (Table 1).

Table 1. Growth performance and survival of yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*) subjected to different concentrations of masculinizing hormone 17 α -methyltestosterone (MT) supplemented in the feed. Data are represented as mean \pm standard deviation of total length, body depth and body weight at 122 dph.

	Control	20 mg/kg	40 mg/kg	60 mg/kg
Total length (cm)	6.06 \pm 0.65	5.92 \pm 0.53	6.01 \pm 0.70	5.89 \pm 0.53
Body depth (cm)	1.75 \pm 0.62	1.51 \pm 0.23	1.56 \pm 0.25	1.51 \pm 0.15
Body weight (g)	3.15 \pm 1.27	2.61 \pm 0.72	2.80 \pm 0.97	2.54 \pm 0.62
Survival (32 dph)	62% ^a	65% ^{ab}	68% ^b	75% ^c
Survival (122 dph)	49% ^a	51% ^{ab}	54% ^b	62% ^c

dph: days post-hatching. Different letters in the same row indicate significant differences observed using Duncan’s test (*p* <0.05).

For the 30 individuals from each treatment that had their gonads evaluated, it was possible to identify males, females, intersex, and indeterminate individuals (Figure 1). In the control treatment, 46.7% of males and 53.3% of females were observed, while in the MT treatments the percentage of males ranged from 50% (40 mg/kg) to 76.7% (20 mg/kg) and females varied from 3.3% (20 mg/kg and 60 mg/kg) to 46.7% (40 mg/kg) (Table 2). Individuals with intersex gonads were observed in the 20 and 60 mg/kg treatments and individuals with undifferentiated gonads were observed in all MT treatments. Gonads at different stages of development (from immature through spawning capable, Araújo et al., 2019) were observed in all treatments (Figure 2). There was a significant difference ($P < 0.05$) between the frequencies of males and females found in the 20 and 60 mg/kg MT treatments and in the control (Table 2).

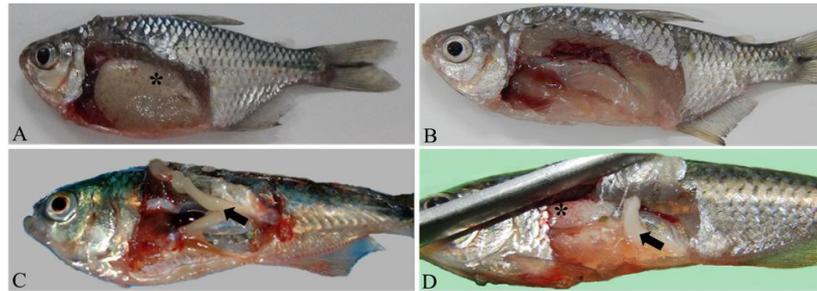


Figure 1. Representation of sexual classification based on primary characters for (A) female (*- ovary), (B) indeterminate, (C) male (arrow- testis) and (D) intersex (*- ovary and arrow- testis) of yellowtail tetras (*Astyanax lacustris*) treated with different concentrations of the masculinizing hormone 17 α -methyltestosterone supplemented in the feed.

Table 2. Sex ratio found in treatments without hormone (control) and with the addition of different dosages of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax lacustris* at 122 days post-hatching.

MT dose (mg/kg)	Male	Female	Intersex	Indeterminate	χ^2
0 (control)	14 (46.7%)	16 (53.3%)	0	0	
20 mg/kg	23 (76.7%)	1 (3.3%)	1 (3.3%)	5 (16.7%)	* p=0.0001
40 mg/kg	15 (50.0%)	14 (46.7%)	0	1 (3.3%)	NS p=0.6976
60 mg/kg	17 (56.7%)	1 (3.3%)	4 (13.3%)	8 (26.7%)	* p=0.0008

*Significant difference between treatment and control ($p < 0.05$). NS: non-significant.

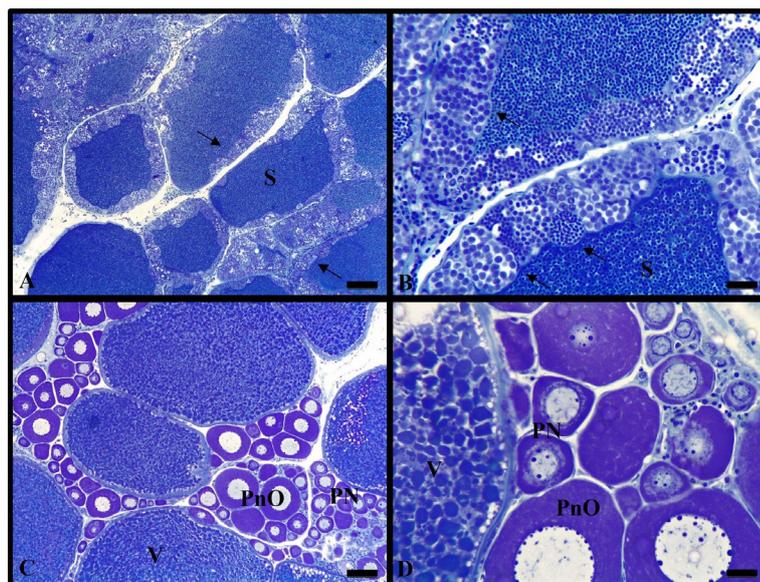


Figure 2. Testicular and ovarian histological section of yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*). (A, B) male gonad (S: sperm; arrow: cysts in different stages of spermatogenesis); (C, D) female gonad region with follicles in different stages of development (PN: perinuclear follicle; PnO: previtellogenic oocytes with perinuclear nucleolus; V- vitellogenic follicle). Scale bars: 100 μ m.

Regarding micronuclei and erythrocyte nuclear alterations, it was possible to observe all six types of alterations in all treatments and in the control, except for binucleated erythrocyte, which was not observed in the control treatment (Figure 3). Although the mean MN values showed a tendency to increase directly proportional to the MT dose, no significant differences were found between the treatments and the control (Table 3). The 40 mg/kg and 60 mg/kg treatments obtained the highest NA values, differing significantly from the control.

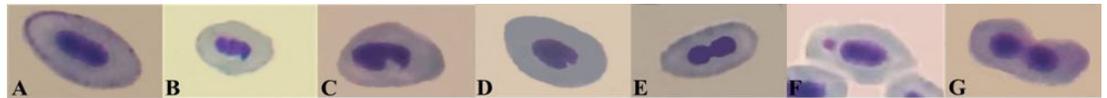


Figure 3. Micronuclei (MN) and erythrocyte nuclear alterations (NA) identified in yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*) treated with different concentrations of 17 α -methyltestosterone supplemented in the feed. Erythrocyte with normal nucleus (A), lobed nucleus (B), notched nucleus (C), blebbed nucleus (D), eight-shaped nucleus (E), micronucleus (F), and binucleated (G). 1000x magnification.

Table 3. Mean \pm standard deviation of micronuclei (MN) and nuclear alterations (NA) in *Astyanax lacustris* treated with different dosages of 17 α -methyltestosterone at 122 days post-hatching.

MT dose (mg/kg)	MN	NA
0 (control)	0.40 \pm 0.52	3.46 \pm 1.58 ^a
20	0.70 \pm 0.48	5.44 \pm 1.08 ^a
40	1.30 \pm 1.16	5.66 \pm 1.34 ^b
60	1.30 \pm 0.95	6.34 \pm 1.68 ^b

Mean value for 1000 erythrocytes. Means followed by different letters in the same column indicate significant differences using Mann-Whitney test with p value adjusted by Bonferroni.

Discussion

The use of MT had a positive influence in obtaining males of *A. lacustris* without affecting survival. A sex ratio of more than 50% males was obtained at all doses of MT used, with the lowest dose (20 mg/kg) being the most successful one, reaching more than 75% of males. Contrastingly, the highest dose (60 mg/kg) resulted in a higher number of indeterminate and intersexed individuals, which would have been expected if the dosage were too low. As no fish with undifferentiated gonads were found in the control treatment, this delay in maturation or sterility of the individuals may have been caused by the MT.

Other studies with masculinization using MT supplemented feed in different fish species, obtained a higher percentage of males as in the case of tilapia where it was possible to obtain 94% of males with 60 mg/kg (Silva et al., 2022) and for silver perch where 100% of males were obtained with 9 mg/kg (Sulaeman and Fotedar, 2017). In addition, a male percentage similar to ours was described for *Rhamdia quelen* with 72% males at a dose of 60 mg/kg (Weiss et al., 2018a). There is not always a linear relationship between increasing the MT dosage and improving the masculinization rate. In fact, treatments with excessive doses, which in our study seems to be the case of treatments 40 and 60 mg/kg, can lead to disruptions in gonadal development or sterility (Devlin and Nagahama, 2002) and could also lead to reduced masculinization, or in some instances, it could induce paradoxical feminization (Demska-Zakes and Zakes, 1997; Marjani et al., 2009; Amer et al., 2021, Karaket et al., 2023).

In some species, when hormone-induced sex reversal was performed in the early stages, feminization with estrogens showed better results than masculinization with androgens (Bombardelli and Hayashi, 2005). When direct feminization was employed at an equivalent exposure period to that of this study and under the same form of supply, 76% of females were obtained at a dose of 40 mg/kg estradiol-17 β (Bem et al., 2012). The failure to obtain full reversal (100%) in both cases may be due to the dosage and duration of hormone treatment. Moreover, according to Pandian and Sheela (1995) and Weiss et al. (2018a), the use of high hormonal doses could cause sterility which may explain the presence of adult individuals with undifferentiated gonads in our study.

The presence of intersex individuals in the MT treatments may also be an indication that the time of hormone administration was not sufficient to cover the labile period (Weiss et al.,

2018b) (i.e., the sensitive period in the early life stages during which the sexually undifferentiated gonad differentiates into male (testicular tissue) or female (ovarian tissue) gonad (Budd et al., 2015)), for masculinization in *A. lacustris*. As previously mentioned, this period has not yet been determined for *A. lacustris*, but for the sister species, *A. altiparanae*, the differentiation into ovaries and testes occurs at 58 and 73 dph, respectively (Adolfi et al., 2015). Thus, to obtain a higher rate of masculinization, the optimal dose found in this study (20 mg/kg) must be used for a period longer than 30 days to cover the entire labile period.

The presence and increased frequency of micronuclei in erythrocytes is an indicator of genetic damage, likewise, nuclear alterations in erythrocytes may be an indicator of cytotoxic effect, both caused in fish exposed to environmental and chemical contaminants (Samanta and Dey, 2012; Ribeiro et al., 2014; Viana et al., 2018). Regarding the toxicity of MT in *Astyanax*, other studies observed an increased frequency of NA when adult individuals of another sister species, *A. bimaculatus*, were treated with feed supplemented with 60 mg/kg of this hormone for 28 days (Rivero-Wendt et al., 2013a) or by immersion with 1 mg for 96 hours (Rivero-Wendt et al., 2013b). In our study, three months after the end of the 30-day period of exposure to MT, only the highest doses of MT (40 and 60 mg MT/kg) showed a significant increase in NA frequency. The treatment of 20 mg MT/kg, which presented the highest percentage of males, was not significantly different from the control treatment regarding to MN and NA, suggesting that MT use at low doses and long-term exposure during the early stages of development does not cause a genotoxic effect for *A. lacustris*.

In relation to the neomales candidates' fertility, even though Rivero-Wendt et al. (2013a) observed a reduction in spermatozoa production in the sister species, *A. bimaculatus*, treated with MT, it may be due to the fact that the individuals used in their study were adults, with the gonads already differentiated, unlike our one in which individuals were treated with MT at early stages of development, before sex differentiation. In addition, in our study, MT does not seem to affect the development of the individuals and probably it is not the cause of not achieving 100% sex reversion. Gonads from neomales candidates did not present malformation and look similar to the nontreated (control) individuals, which may indicate that possibly it will not affect their fertility.

Thus, the use of feed enriched with 17 α -methyltestosterone at a dose of 20 mg/kg during the first 30 days of feeding of yellowtail tetra (*A. lacustris*) shows the possibility to be beneficial for achieving neomales.

Conclusion

In order to complement the results achieved, further studies would be interesting to evaluate whether the time of exposure to MT and if lower doses of it influence the rate of masculinization. It remains necessary to conduct progeny tests to identify the neomales individuals that can be used in an all-female production free of hormones. The results of this study indicate that it is possible to achieve a male percentage of 76.7% in yellowtail tetra (*A. lacustris*) by feeding feed enriched with 17 α -methyltestosterone at a dose of 20 mg/kg during the first 30 days of feeding.

Acknowledgments

First author thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship provided (grant number 88882.436232/2019.01). Special thanks to Hoepers Produtos Agropecuários for donating the 17 α -methyltestosterone and Ovopel® for this research.

References

- Abimorad EG, Castellani D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari-do-rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. Bol Inst Pesca. 2011;37(1):31-8.
- Adolfi MC, Carreira ACO, Jesus LWO, Bogerd J, Funes RM, Schartl M, Sogayar MC, Borella MI. Molecular cloning and expression analysis of dmrt1 and sox9 during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. Reprod Biol Endocrinol. 2015;13(2):2-15. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-13-2>. PMID:25577427.

- Agostinho AA, Gomes LC, Veríssimo S, Okada EK. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Rev Fish Biol Fish.* 2004;14:11-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-004-3551-y>.
- Amer M, Zaki F, Tahoun A, Said M. Effects of 17 α -methyltestosterone and *Tribulus terrestris* extract on sex ratio and gonads histology of red Tilapia hybrid. *Egypt J Nutr Feeds.* 2021;24(2):189-98. <http://dx.doi.org/10.21608/ejnf.2021.210947>.
- Araújo FG, Nascimento AA, Gomes ID, Sales A, Oliveira BAC. Gonadal development and reproductive period of the characin *Astyanax aff. bimaculatus* (Characiformes: Characidae) in a tropical reservoir in southeastern Brazil. *Zoologia.* 2019;36:1-14. <http://dx.doi.org/10.3897/zoologia.36.e30610>.
- Barbieri G, Santos MVR, Santos J. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Pesqui Agropecu Bras.* 1982;17(7):1057-65.
- Bem JC, Fontanetti CS, Senhorini JA, Parise-Maltempi PP. Effectiveness of estradiol valerate on sex reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). *Braz Arch Biol Technol.* 2012;55(2):283-90. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000200015>.
- Bombardelli RA, Hayashi C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 α -metilttestosterona. *Rev Bras Zootec.* 2005;34(2):365-72. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982005000200002>.
- Budd A, Banh Q, Domingos J, Jerry D. Sex control in fish: Approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J Mar Sci Eng.* 2015;3(2):329-55. <http://dx.doi.org/10.3390/jmse3020329>.
- Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci.* 1990;47(11):2123-36. <http://dx.doi.org/10.1139/f90-237>.
- Celik I, Guner Y, Celik P. Effect of orally-administered 17 α -methyltestosterone at different doses on the sex reversal of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). *J Anim Vet Adv.* 2011;10(7):853-7. <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2011.853.857>.
- Demska-Zakes K, Zakes Z. Effect of 17 alpha-methyltestosterone on gonadal differentiation in pikeperch, *Stizostedion lucioperca* L. *Aquacult Res.* 1997;28(1):59-63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.1997.tb01315.x>.
- Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 2002;208(3-4):191-364. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1).
- Dunham RA. *Aquaculture and fisheries biotechnology, genetic approaches.* Wallingford: CABI; 2011. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845936518.0000>.
- El-Greisy ZA, El-Gamal AE. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. *Egypt J Aquat Res.* 2012;38(1):59-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2012.08.005>.
- Fatima S, Adams M, Wilkinson R. Sex reversal of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by 17 α -methyltestosterone exposure: A serial experimental approach to determine optimal timing and delivery regimes. *Anim Reprod Sci.* 2016;175:39-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.10.008>. PMID:27802873.
- Fonseca T, Costa-Pierce BA, Valenti WC. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. *Rev Fish Sci Aquacult.* 2017;25(4):316-30. <http://dx.doi.org/10.1080/23308249.2017.1320647>.
- Furnus GNA, Caffetti JD, García EM, Benítez MF, Pastori MC, Fenocchio AS. Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). *Braz J Biol.* 2014;74(1):217-21. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13712>. PMID:25055105.
- Garutti V. *Piscicultura ecológica.* São Paulo: UNESP; 2003.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal, PPM. Tabela 3940 - Produção da aquicultura, por tipo de produto [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 21]. Available from: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>
- Johnstone R, Macintosh DJ, Wright RS. Elimination of orally administered 17 α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. *Aquaculture.* 1983;35:249-57. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90095-9](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(83)90095-9).
- Karaket T, Reungkhajorn A, Ponza P. The optimum dose and period of 17 α -methyltestosterone immersion on masculinization of red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquac Fish.* 2023;8(2):174-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaf.2021.09.001>.

- Kashe MM, Farsani AS, Mehrgan MS, Hosseini-Shekarabi SP. Effect of 17- α -methyl testosterone on the sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Anim Environ. 2021;13(2):295-302. <http://dx.doi.org/10.22034/AEJ.2021.137489>.
- Lázaro TM, Rocha NRA, Monzani PS, Nakaghi LSO, Senhorini JA, Yasui GS, Nascimento NF. Sperm quality of spontaneously occurring gynogenetic males in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. J Appl Ichthyology. 2021;37(6):909-15. <http://dx.doi.org/10.1111/jai.14244>.
- Leonard JL. Transitions between sexual systems: understanding the mechanisms of, and pathways between, dioecy, hermaphroditism and other sexual systems. Switzerland: Springer; 2019.
- Marjani M, Jamili S, Mostafavi PG, Ramin M, Mashinchia A. Influence of 17-alpha methyl testosterone on masculinization and growth in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). J Fish Aquat Sci. 2009;4(1):71-4. <http://dx.doi.org/10.3923/jfas.2009.71.74>.
- Nascimento NF, Pereira-Santos M, Piva LH, Manzini B, Fujimoto T, Senhorini JA, Yasui GS, Nakaghi LSO. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. Aquaculture. 2017;471:163-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.007>.
- Navarro RD, Silva RF, Ribeiro OP Fo, Calado LL, Rezende FP, Silva CS, Santos LC. Comparação morfológica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. Zootec Trop. 2006;24:165-76.
- Pandian TJ, Sheela SG. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture. 1995;138(1-4):1-22. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01075-0](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(95)01075-0).
- Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture. 2001;197(1-4):229-81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0).
- Porto-Foresti F, Castilho-Almedia RB, Foresti F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisserto B, Gomes LC, editors. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM; 2005. p. 105-20.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2020 [cited 2022 Jul 21]. Available from: <https://www.r-project.org/>
- Ribeiro AM, Risso WE, Fernandes MN, Martinez CBR. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. Fish Physiol Biochem. 2014;40(3):645-57. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9873-8>. PMID:24114347.
- Rivero-Wendt CLG, Miranda-Vilela AL, Ferreira MFN, Borges AM, Grisolia CK. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Genet Mol Res. 2013a;12(3):3862-70. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.September.23.4>. PMID:24085447.
- Rivero-Wendt CLG, Miranda-Vilela AL, Ferreira MFN, Amorim FS, da Silva VAG, Louvandini H, Grisolia CK. Lack of genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* and *Oreochromis niloticus* of 17 α -methyltestosterone used in fish hatcheries to produce male monosex populations. Genet Mol Res. 2013b;12(4):5013-22. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.October.24.14>. PMID:24301763.
- Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. Diagn Cytopathol. 2012;40(1):84-90. <http://dx.doi.org/10.1002/dc.21592>. PMID:22180242.
- Shen Z-G, Fan Q-X, Yang W, Zhang Y-L, Wang H-P. Effects of 17 α -methyltestosterone and aromatase inhibitor letrozole on sex reversal, gonadal structure, and growth in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Biol Bull. 2015;228(2):108-17. <http://dx.doi.org/10.1086/BBLv228n2p108>. PMID:25920714.
- Silva DA, Pessoa EKR, Costa SAGL, Chellappa NT, Chellappa S. Ecologia Alimentar de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assu, Rio Grande do Norte, Brasil. Biota Amazôn. 2012;2(1):74-82. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v2n1p74-82>.
- Silva RZC, Alvarenga ÉR, Matta SV, Alves GFO, Manduca LG, Silva MA, Yoshinaga TT, Fernandes AFA, Turra EM. Masculinization protocol for Nile tilapia (*O. niloticus*) in Biofloc technology using 17- α -methyltestosterone in the diet. Aquaculture. 2022;547:737470. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737470>.
- Stevanato DJ, Ostrensky A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: characidae). Neotrop Ichthyol. 2018;16(2):e170073. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170073>.
- Súarez YR, Silva EA, Viana LF. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. Environ Biol Fishes. 2017;100(7):775-83. <http://dx.doi.org/10.1007/s10641-017-0604-3>.
- Sulaeman FR, Fotedar R. Masculinization of silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell 1838) by dietary supplementation of 17 α -methyltestosterone. Egypt J Aquat Res. 2017;43(1):109-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2016.10.002>.

- Thanasupsin SP, Chheang L, Math C. Ecological risk of 17 α -methyltestosterone contaminated water discharged from a full water recirculating earthen masculinization pond. *Hum Ecol Risk Assess.* 2021;27(6):1696-714. <http://dx.doi.org/10.1080/10807039.2021.1871845>.
- Toledo-Filho SA, Foresti F, Almeida-Toledo LF. *Biotecnologia genética aplicada a Piscicultura*. São Paulo: Departamento de Biologia-CCS/USP; 1996. (Cadernos de Ictiogenética; no. 3).
- Valenti WC, Barros HP, Moraes-Valenti P, Bueno GW, Cavalli RO. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquacult Rep.* 2021;19:100611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>.
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. South American fish for continental aquaculture. *Rev Aquacult.* 2018;10(2):351-69. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12164>.
- Viana LF, Suárez YR, Cardoso CAL, Solórzano JCJ, Crispim BDA, Grisolia AB, Lima-Junior SE. Erythrocyte nuclear abnormalities in *Astyanax lacustris* in response to landscape characteristics in two neotropical streams. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2018;75(2):327-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-017-0476-8>. PMID:29147789.
- Weiss LA, Bernardes JJ Jr, Machado C, Oliveira-Nuñer AP. Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17 α -methyltestosterone. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2018a;31(4):304-14. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n4a07>.
- Weiss LA, Bernardes JJ Jr, Nuñer APO. Identification of neomales in South American catfish *Rhamdia quelen* on the basis of the sex ratio in the progeny. *Anim Reprod.* 2018b;14(Suppl. 1):1285-92. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR0031>.

Author contributions

RSF: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing; KRISO: Investigation, Methodology; MES: Investigation, Methodology; DAF: Investigation, Methodology; AANS: Investigation, Methodology; VASJ: Resources, Writing - review & editing; RD: Writing - review & editing; MRMC: Conceptualization, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

4- Artigo científico III

Otimização de protocolo de masculinização do lambari do rabo amarelo

(*Astyanax lacustris*) utilizando 17 α -metiltestosterona na ração

Resumo

Dentre as espécies nativas produzidas comercialmente no Brasil, o lambari do rabo amarelo (*Astyanax lacustris*) é a que tem apresentado um dos maiores percentuais de crescimento do volume da produção nos últimos anos. A heterogeneidade do crescimento entre machos e fêmeas, desfavorável aos machos, desperta o interesse na produção de proles femininas. Esse trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de masculinização de *Astyanax lacustris* utilizando 17 α -metiltestosterona para a obtenção de neomachos visando a produção futura de lotes femininos. Para isso, foram utilizadas quatro doses de 17 α -metiltestosterona (MT) na ração (0, 10, 15 e 20 mg/kg) durante 30 e 60 dias. Após esse período, se iniciou a alimentação com ração sem MT e os animais foram mantidos até os 212 dias pós-eclosão, quando foram avaliados quanto ao sexo, comprimento total, altura, peso e peso das gônadas. Todos os parâmetros apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para comparações de uma mesma dose com diferentes tempos de oferta, mas apenas altura e peso de gônadas apresentaram diferença significativa para diferentes doses no mesmo tempo de oferta. Todos os tratamentos com hormônio produziram uma proporção de machos maiores do que o controle, sendo o tratamento de 10 mg/kg de MT por 30 dias o mais eficiente, produzindo 83,3% de machos.

Palavras-chave: monossexo, andrógenos, neomachos, reversão sexual.

Abstract

Among the commercially produced native fish species in Brazil, the yellowtail tetra (*Astyanax lacustris*) has shown one of the highest growth percentages in production volume in recent years. The heterogeneity in growth, favoring female production has raised the interest in an all-female production. This study aimed to optimize the masculinization protocol of *Astyanax lacustris* using 17α -methyltestosterone. For this purpose, four doses of 17α -methyltestosterone were administered in the feed (0, 10, 15, and 20 mg/kg) over 30 and 60 days. After this period, feeding with MT-free feed commenced, and the animals were kept until 212 days post-hatch. At this point, they were assessed for sex, total length, body depth, body weight, and gonad weight. All parameters showed significant differences ($p < 0.05$) when comparing the same dose at different feeding durations, but only gonad height and weight showed significant differences for different doses at the same feeding duration. All hormone treatments resulted in a higher proportion of males than the control, with the 10 mg/kg MT treatment for 30 days being the most efficient, producing 83.3% males.

Keywords: monosex, androgens, neomales, sex reversal.

Introdução

A lambaricultura é uma atividade que em crescimento nos últimos anos no Brasil, tendo um aumento de cerca de 271% no valor da produção e 83% na quantidade produzida entre 2013 e 2022 (IBGE, 2013, 2023). Os principais mercados alvos da produção são os direcionados à isca viva, seja para pesca esportiva ou comercial (GARUTTI, 2003) e como petiscos em bares e restaurantes. Apesar da capacidade de crescimento, por ser uma atividade ainda em desenvolvimento, tecnologias para aprimorar o pacote tecnológico ou aumentar sua capacidade produtiva ainda estão sendo aperfeiçoadas.

A espécie *Astyanax lacustris* conhecida como lambari do rabo amarelo ou piaba, é uma espécie de pequeno porte, onívora e que tem despertado bastante interesse para criação comercial (GARUTTI, 2003; SUSSEL, 2018). As fêmeas de *A. lacustris*, atingem um tamanho e peso superior aos machos de mesma idade (GARUTTI, 2003). Além disso, esses peixes atingem a maturação ainda no período de engorda e podem se reproduzir naturalmente nos viveiros (PORTO-FORESTI et al., 2001), gastando energia para reprodução e não para crescimento. Uma alternativa para esse problema seria o cultivo monossexo, o qual já demonstrou resultados satisfatórios comparado ao cultivo tradicional (NAVARRO et al., 2006; BEM et al., 2012).

Uma das formas de obtenção de lotes monossexo, tanto femininos quanto masculinos, é através da reversão sexual, essa técnica pode ser aplicada na forma direta ou indireta. Para o caso do lambari, onde as fêmeas são maiores, a reversão sexual na forma direta é feita utilizando hormônios estrógenos (ex. 17β -estradiol) para produzir proles femininas. Já a forma indireta requer a utilização de hormônios andrógenos (ex. 17α -metiltestosterona) para gerar fêmeas (XX) fenotipicamente masculinas, os chamados neomachos, que ao cruzarem com fêmeas naturais originam uma prole 100% feminina (DUNHAM, 2023).

Os efeitos da administração de esteroide para reversão sexual em peixes, podem ser bastante influenciados pela dose, momento e duração do tratamento (PANDIAM e SHEELA, 1995; DUNHAM, 2023). Por isso, é recomendada a utilização durante o período lábio, ou seja, o período inicial da fase larval em que os animais ainda se encontram com as gônadas indiferenciadas. Para *A. lacustris*, esse período de diferenciação sexual é variável e ocorre aos 58 dias pós-eclosão (dpe) para fêmeas e 73 dpe para machos (ADOLFI

et al., 2015).

No caso do lambari, tanto a abordagem direta utilizando hormônios feminilizantes quanto a abordagem indireta com hormônios masculinizantes já foram testadas anteriormente (BEM et al., 2012; FARIAS et al., 2023). No entanto, não há registros de um protocolo que tenha alcançado 100% de reversão sexual. Dada a complexidade na distinção de machos e neomachos nessa espécie até o presente momento, o protocolo ideal deve se aproximar dos 100% de reversão, tornando mais viável a formação de um plantel de reprodutores neomachos.

Assim, esse trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de reversão indireta para o *A. lacustris* utilizando 17 α -metiltestosterona suplementado na ração com diferentes dosagens e por diferentes períodos.

Material e Métodos

Os reprodutores de *Astyanax lacustris* utilizados, foram mantidos em viveiros escavados na Estação Prof. Johei Koike, do Departamento de Pesca e Aquicultura (Depaq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Campus Dois Irmãos (CDI)/Sede), onde foram desenvolvidos os experimentos. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da UFRPE (CEUA-UFRPE nº 6348140423).

Dieta suplementada com 17 α -metiltestosterona

Três dietas foram preparadas com diferentes doses do hormônio 17 α -metiltestosterona (Alfarever® Metiltestosterona 50%) (10, 15 e 20 mg/kg de ração) dissolvidos em óleo de soja, de acordo com o recomendado pelo fabricante. Após a homogeneização, a ração foi dividida em porções e mantida em freezer durante sete dias, retirando-se porções para consumo imediato. A cada sete dias um novo lote de ração foi preparado. Apenas o óleo de soja foi adicionado à ração do grupo controle, seguindo o mesmo procedimento de armazenamento.

Reversão sexual

Foram selecionados seis animais adultos para a indução hormonal, sendo três fêmeas (comprimento total $8 \text{ cm} \pm 0,9$, peso $10,7 \text{ g} \pm 4,5$) e três machos ($6,8 \text{ cm} \pm 0,5$, $4,1 \text{ g} \pm 0,8$). A desova semi-natural nos animais foi induzida utilizando Ovopel® [(D-Ala6, Pro9-Net) – mGnRH + metoclopramide] (5 mg/kg para machos e fêmeas) via injeção intraperitoneal aplicada abaixo da nadadeira peitoral. Após a aplicação do hormônio, cada casal foi transferido para uma caixa de 61 L de polietileno com aeração constante e a temperatura da água mantida em $27,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$ e $\text{pH } 7 \pm 0,1$.

Após a desova, os reprodutores foram retirados das caixas e a água foi parcialmente renovada (80%). No segundo dia pós-eclosão (dpe), as larvas foram misturadas e distribuídas nas unidades experimentais (oito tratamentos com 3 réplicas cada) de polietileno com 50 litros de volume útil. Foram distribuídas 250 larvas por caixa, numa densidade de estocagem de 5 larvas/litro. As unidades foram mantidas em sistema fechado com aeração constante e a qualidade da água foi mantida com trocas parciais diariamente nos primeiros 20 dias e depois a cada dois dias. Diariamente 2x ao dia foram aferidos os valores de oxigênio dissolvido (Instrutherm MO-920), pH e temperatura da água (Linelab PH PRP), e a cada três dias, amônia e nitrito foram avaliados por meio de kits colorimétricos (LabconTest).

A alimentação das larvas se iniciou ao 3º dia pós eclosão (dpe). Nos 20 primeiros dias (3-23 dpe), foi ofertado de forma suplementar plâncton proveniente de viveiro escavado previamente fertilizado e filtrado em malha de $50 \text{ }\mu\text{m}$ e náuplios recém eclodidos de artêmia (*Artemia franciscana*), na densidade de 500 náuplios/larva/dia, divididos em três refeições. Do 15º ao 20º dia de alimentação, foi feito gradativamente a substituição do alimento vivo pelo alimento inerte uma de 20% ao dia, até que no 21º os animais iniciaram a alimentação 100% com dieta inerte. Como alimentação principal, foi ofertado ração farelada para peixes onívoros 5x ao dia “ad libitum”, contendo 55% de proteína bruta (PB) acrescida de diferentes doses de hormônio masculinizante em quatro tratamentos: T1 – tratamento controle (sem adição de hormônio na ração), T2 – adição de 10 mg de 17α -metiltestosterona /kg de ração, T3 – adição de 15 mg de 17α -metiltestosterona /kg de ração, e T4 – adição de 20 mg de 17α -metiltestosterona /kg de ração. Esses valores de MT foram definidos com base nos resultados obtidos por Farias et al. (2023), sendo sugerido doses menores que 20 mg/kg. Os mesmos tratamentos foram realizados com oferta de ração suplementada com MT por 30 dias e por 60 dias.

Após o período de tratamento hormonal de 30 e 60 dias, os animais passaram a ser alimentados com ração contendo 45% de PB sem adição de hormônio, 2x ao dia até os 212 dpe. Aos 212 dpe, 30 peixes de cada tratamento foram coletados, eutanasiados por overdose de eugenol (100 mg/L) em banho de imersão e avaliados quanto ao sexo, peso, comprimento total, altura (da margem dorsal do corpo até a margem ventral do corpo, no pedúnculo da barbatana pélvica). A sobrevivência foi avaliada aos 32, 62, e 212 dpe.

Histologia

Aos 212 dpe, 30 animais de cada tratamento foram eutanasiados, como descrito anteriormente, e tiveram suas gônadas retiradas para avaliação histológica. Para isso, as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As gônadas foram desidratadas em uma série graduada de etanol, seguido por clarificação inicial em solução 1:1 de etanol absoluto e resina à base glicol metacrilato (Leica©) com polimerizador. Os fragmentos de gônada foram emblocados em resina e cortados a 4 µm de espessura com navalha de vidro, corados com azul de toluidina e posteriormente analisados em microscópio óptico.

Análise estatística

Os dados de qualidade da água, comprimento total, altura, peso final e peso de gônadas estão apresentados como média \pm desvio padrão. Todos os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificação da normalidade da distribuição dos dados e homogeneidade da variância, respectivamente. A avaliação do efeito das doses foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis de comparação múltiplas, sendo avaliado isoladamente o período de oferta das doses. Ademais a avaliação do efeito do tempo de oferta da dose foi realizada através do teste pareado de Wilcoxon, sendo avaliado isoladamente os tratamentos adotados no presente estudo. A avaliação do efeito do tratamento na sobrevivência ao longo do período experimental foi realizada através de uma análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas), quando foram observadas diferenças significativas foi aplicado o pos-hoc de Duncan. O efeito da duração da oferta das doses sobre a sobrevivência foi avaliado isoladamente nos tratamentos através do teste-t. A comparação da proporção sexual entre os tratamentos e o controle foi realizado

através do teste Qui-quadrado (χ^2). As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 12 adotando um nível de significância de 5% para todos os testes.

Resultados

Durante todo o período experimental, os parâmetros de qualidade da água foram mantidos dentro dos limites aceitáveis para a espécie e suas respectivas médias foram temperatura ($27,5 \pm 0,5$ °C), pH ($7,42 \pm 0,41$), oxigênio dissolvido ($6,64 \pm 0,75$ mg/l), amônia ($0,72 \pm 0,06$ mg/l) e nitrito ($1,32 \pm 0,25$ mg/l).

Entre os tratamentos que receberam o MT por 30 dias, não houve diferença significativa para as variáveis de desempenho zootécnico, as médias variaram entre 5,49 cm e 5,87 cm para comprimento total, 1,47 a 1,58 cm de altura, 2,13 a 2,88 g de peso total e 0,11 a 0,28 g de peso de gônadas (Tabela 1). Já para os tratamentos com 60 dias de MT, houve diferença significativa para os parâmetros altura ($p=0,006$) e peso de gônadas ($p=0,000$). As médias variaram entre 5,54 e 5,91 cm para comprimento total, 1,38 a 1,62 cm de altura, 2,14 a 2,92 g de peso total e 0,09 a 0,32 g de peso de gônadas. Quando as comparações foram feitas entre o período de oferta do MT para cada dose utilizada, observou-se diferença significativa em todos os tratamentos.

A sobrevivência variou de 67% a 71% aos 32 dpe, de 61% a 68% aos 62 dpe e entre 49% e 59% aos 212 dpe, apresentando diferença estatística entre os tratamentos e entre os tempos de oferta ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Os animais tiveram suas gônadas avaliadas por meio de histologia e foram classificados como macho, fêmea ou indeterminado (gônada indiferenciada) (Figura 1). Apenas os tratamentos controles e o 10 mg/kg por 30 dias não apresentaram indivíduos indeterminados aos 212 dpe. Os tratamentos de 30 dias tiveram uma porcentagem de machos variando entre 46,7% no controle a 83,8% no tratamento com 10mg/kg de MT ($p < 0,05$). Já para os tratamentos de 60 dias de oferta de MT, o percentual de machos variou de 43,4% no controle a 66,7% no tratamento com 10 mg/kg de MT ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1. Dados biométricos para *A. lacustris* tratados com diferentes doses de 17 α -metiltestosterona (0, 10, 15 e 20 mg/kg) suplementado na ração durante dois períodos de oferta (30 e 60 dias).

Dados biométricos	T1 - Controle		T2 - 10 mg/kg		T3 - 15 mg/kg		T4 - 20 mg/kg	
	30 dias	60 dias						
Comp. total (cm)	5,87 \pm 0,96 ^A	5,91 \pm 0,99 ^B	5,49 \pm 0,99 ^A	5,54 \pm 0,56 ^B	5,51 \pm 0,72 ^A	5,61 \pm 0,75 ^B	5,54 \pm 0,41 ^A	5,60 \pm 0,63 ^B
Altura (cm)	1,58 \pm 0,30 ^A	1,62 \pm 0,35 ^{aB}	1,51 \pm 0,30 ^A	1,38 \pm 0,17 ^{bB}	1,47 \pm 0,25 ^A	1,40 \pm 0,30 ^{bB}	1,53 \pm 0,15 ^A	1,50 \pm 0,20 ^{abB}
Peso total (g)	2,88 \pm 1,74 ^A	2,92 \pm 1,78 ^B	2,24 \pm 1,07 ^A	2,15 \pm 0,59 ^B	2,13 \pm 0,85 ^A	2,14 \pm 0,96 ^B	2,17 \pm 0,47 ^A	2,23 \pm 0,84 ^B
Peso de gônadas (g)	0,28 \pm 0,36 ^A	0,32 \pm 0,39 ^{aB}	0,17 \pm 0,11 ^A	0,09 \pm 0,05 ^{bB}	0,11 \pm 0,08 ^A	0,20 \pm 0,19 ^{aB}	0,19 \pm 0,07 ^A	0,14 \pm 0,10 ^{aB}
Sobrevivência (32 dpe)	71% ^{aA}	69% ^{abA}	70% ^{aA}	68% ^{aB}	67% ^{aA}	69% ^{bB}	71% ^{aA}	68% ^{aB}
Sobrevivência (62 dpe)	67% ^{cA}	64% ^{aB}	65% ^{bA}	61% ^{bB}	62% ^{aA}	64% ^{aB}	68% ^{dA}	63% ^{cB}
Sobrevivência (212 dpe)	59% ^{aA}	51% ^{bB}	58% ^{cA}	54% ^{aB}	50% ^{bA}	49% ^{aB}	58% ^{aA}	52% ^{aB}

Letras diferentes na mesma linha, representam diferenças significativas ($p < 0,05$). Para as variáveis comprimento total, altura, peso e peso total, letras minúsculas representam a avaliação do efeito das doses, resultado do teste de Kruskal-Wallis realizado isoladamente para cada tempo. Letras maiúsculas representam a avaliação do efeito do tempo de oferta, resultado do teste de Wilcoxon pareado realizado de forma isolada na dose de hormônio ofertada. Na sobrevivência, letras minúsculas na mesma linha, representam o resultado do pos-hoc de Duncam para doses diferentes avaliadas isoladamente no tempo. Letras maiúsculas representam a avaliação do efeito do tempo na sobrevivência, avaliado de forma isolada nas doses de hormônio ofertada através do test-t.

Tabela 2. Proporção sexual aos 212 dpe em *Astyanax lacustris* tratados com diferentes doses de 17 α -metilttestosterona.

Dose MT	Macho	Fêmea	Indeterminado	χ^2
<i>30 dias</i>				
0 (controle)	14 (46,7%)	16 (53,3%)	0	
10 mg/kg	25 (83,3%)	5 (16,7%)	0	*p=0,003
15 mg/kg	24 (80,0%)	3 (10,0%)	3 (10,0%)	*p=0,001
20 mg/kg	21 (70,0%)	3 (10,0%)	6 (20,0%)	*p=0,002
<i>60 dias</i>				
0 (controle)	13 (43,3%)	17 (56,7%)	0	
10 mg/kg	20 (66,7%)	5 (16,7%)	5 (16,7%)	*p=0,006
15 mg/kg	18 (60,0%)	7 (23,3%)	5 (16,7%)	*p=0,033
20 mg/kg	19 (63,3%)	3 (10,0%)	8 (26,7%)	*p=0,002

* Diferença significativa entre o tratamento e o controle ($p < 0,05$).

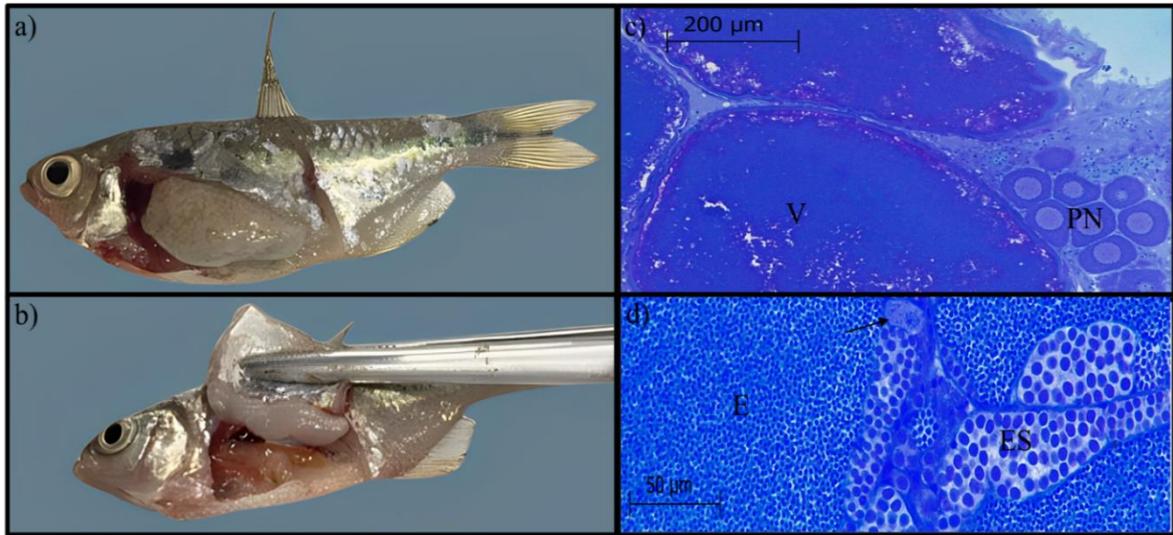


Figura 1. Representação da morfologia (a, b) e histologia (c, d) de fêmeas e machos de *Astyanax lacustris*; (c) gônada feminina (V – ovócito vitelogênico, pronto para desova, PN – ovócito perinuclear); (d) gônada masculina (E – esperma, ES – espermatogônia, seta – espermatogônia indiferenciada).

Discussão

A utilização de protocolos de reversão hormonal em peixes, embora amplamente utilizados, ainda são passíveis de críticas, tanto devido à possibilidade de descarga de efluentes contendo hormônios em corpos d'água, quanto à perspectiva de consumir organismos que foram expostos a hormônios em alguma etapa de seu desenvolvimento (PANDIAN E SHEELA, 1995; THANASUPSIN et al., 2021). A utilização de protocolos de reversão indireta atenua esses problemas, uma vez que a administração de hormônios é necessária apenas para formação do plantel de reprodutores. Isso implica numa frequência menor de utilização de hormônios, além de garantir que os animais que serão destinados ao mercado não tenham sido submetidos a tratamento hormonal em nenhum momento (PIFERRER, 2001; DUNHAM, 2023).

Apesar de termos obtido 83,3% de machos para o tratamento utilizando a menor dose durante o período mais curto (10 mg/kg durante 30 dias), é possível inferir que uma dosagem ainda menor de MT possa gerar lotes 100% monossexo. Farias et al. (2023)

utilizando 20 mg/kg de MT dissolvido em álcool adicionado à ração, produziram 76,7% de machos de *A. lacustris*, mas também encontraram 3,3% de animais intersexo e 16,7% de indeterminados nesta dosagem, sugerindo que a dose utilizada ainda estava muita alta para a espécie. No presente estudo, aplicando o mesmo tratamento, mas com a utilização do veículo óleo para incorporação do MT na ração, encontramos uma porcentagem similar de machos (70%), indicando uma influência mínima ou nula do veículo (álcool ou óleo) na reversão sexual, conforme já indicado por Phelps e Popma (2000) na reversão de tilápia *Oreochromis niloticus*.

Com exceção do grupo que recebeu 10 mg/kg por 30 dias e dos controles, nos demais tratamentos indivíduos indiferenciados foram observados aos 212 dpe. Considerando que esse período é significativamente posterior ao período de maturação sexual para a espécie no cativeiro (150 dpe, GARUTTI, 2003), é possível que esses animais tenham se tornado estéreis devido ao excesso de hormônio. Segundo Devlin e Nagahama (2022), o uso de dose excessiva de hormônio pode levar a interrupções no desenvolvimento gonadal ou até a esterilidade.

O tempo de oferta do hormônio foi determinante na proporção de machos produzidos. Embora o período de diferenciação sexual seja de 58 dpe para fêmeas e 73 dpe para machos (ADOLFI et al., 2015), foi observado que todos os tratamentos de 30 dias com MT, mesmo não abrangendo todo o período lábil, apresentaram desempenho superior, quanto à proporção de machos produzida, quando comparado aos tratamentos com 60 dias. Como os parâmetros momento, duração e dose são espécie-específico e desempenham um papel crucial para o sucesso da técnica de reversão, os resultados obtidos no presente trabalho e por Farias et al. (2023) indicam que o período ideal de oferta do MT para o *A. lacustris* é a partir do momento que os animais iniciam a ingestão de alimento exógeno, seguido por um período de 30 dias. A ausência de necessidade de um período prolongado de oferta de hormônio é interessante, pois facilitar o manejo durante essa fase inicial e se torna menos prejudicial ambientalmente.

Foi possível observar um atraso no desenvolvimento das gônadas no tratamento com 10 mg/kg e 60 dias MT, que aos 212 dpe teve peso médio de gônadas de 0,09 g. Um efeito inibitório no desenvolvimento das gônadas já foi identificado em *Pseudorasbora parva* tratado com MT, isso ocorre devido à capacidade do MT de provocar efeitos desreguladores em diversas vias metabólicas, interferindo na expressão de genes

relacionados à síntese de esteroides sexuais (WANG et al., 2020).

A reversão sexual não é sempre 100% efetiva em algumas espécies (DUNHAM, 2023), portanto é necessário testar outras doses menores que 10 mg/kg de MT para identificar se seriam mais adequadas a *A. lacustris*. Essa porcentagem de machos encontrada (83%) já viabilizaria a formação de plantéis de reprodutores neomachos para a produção de lotes XX, restando ainda a identificação dos neomachos através de testes de progênie.

A aplicação da técnica de reversão sexual em peixes de água doce ainda é pouco explorada em espécies nativas do Brasil. Até o momento, foram conduzidas poucas pesquisas nessa linha, como aquelas envolvendo o lambari do rabo amarelo *Astyanax lacustris* (feminilização e masculinização) (BEM et al., 2012; FARIAS et al., 2023), o tambaqui *Colossoma macropomum* (feminilização) (REIS e ALMEIDA, 2018) e o jundiá *Rhamdia quelen* (feminilização e masculinização) (WEISS et al., 2017, 2018; AMARAL-JUNIOR et al., 2008) foram realizadas. Dessa forma, esse trabalho contribui com uma etapa importante na produção de populações monossexo.

Conclusão

Neste trabalho, foram identificados 83,3% de machos para o tratamento 10 mg/kg durante 30 dias, um avanço de quase 10% ao obtido anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa para o *A. lacustris*. Esse trabalho é um avanço no desenvolvimento de pesquisas com reversão sexual utilizando espécies nativas de peixe no Brasil, aperfeiçoando seu pacote tecnológico e possibilitando o cultivo apenas do gênero mais produtivo zootecnicamente. Todavia, futuros trabalhos utilizando doses ainda menores são necessários para que se possa identificar a dose ideal para a produção de lotes próximo de 100% monossexo. Além disso, é fundamental avançar na identificação de marcadores moleculares associados ao sexo para possibilitar a identificação rápida e precisa dos neomachos usando métodos não invasivos que mantenham o bem-estar do animal.

Referências

ADOLFI, M.C.; CARREIRA, A.C.; JESUS, L.W.; BOGERD, J.; FUNES, R.M.; SCHARTL, M.; SOGAYAR, M.C.; BORELLA, M.I. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, p.1-15, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-13-2>.

AMARAL JUNIOR, H.; NUNES, M.F.S.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*, **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.9, p.1-7, 2008.

BEM, J.C.; FONTANETTI, C.S.; SENHORINI, J.A.; PARISE-MALTEMPI, P.P. Effectiveness of Estradiol Valerate on Sex Reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p.283-290, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000200015>.

DEVLIN, R.H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v.208, p.191-364, 2002. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1).

DUNHAM, R.A. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology, Genetic Approaches*, terceira edição. Cambridge: CABI, 2023. 372p.

FARIAS, R.S.; OLIVEIRA, K.R.S.; SOUZA, M.E.; FERREIRA, D.A.; SILVA, A.A.N.; JÚNIOR, V.A.S.; DUNHAM, R.; COIMBRA, M.R.M. Effect of dosage of orally administered 17 α -methyltestosterone on sex reversion of the yellowtail tetra *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875). **Animal Reproduction**, v.20; p.e20220080, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0080>.

GARUTTI, V. *Piscicultura ecológica*. São Paulo: UNESP, 2003.

IBGE. Produção da pecuária municipal. Tabelas Produção de aquicultura, por tipo de produto. 2013 – 2022. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas>>. Acesso em: 15 de agosto de 2023.

NAVARRO, R.D.; SILVA, R.F.; FILHO, O.P.R.; CALADO, L.L.; REZENDE, F.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, L.C. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyms, 1842) em diferentes sistemas de cultivo. **Zootecnia Tropical**, v.24, p.165-176, 2006.

PANDIAN, T.J.; SHEELA, S.G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v.138, p.1-22, 1995. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01075-](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(95)01075-)

0.

PHELPS, R.P.; POPMA, T.J. Sex reversal of tilapia. In COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (eds) *Tilapia Aquaculture in the Americas*, Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, 2000. p.34–59

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229-81, 2001. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0).

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; ALMEIDA, R.B.C. Cultivo do Lambari. Panorama da Aquicultura, 2001. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/cultivo-do-lambari/>>. Acesso em: 15 setembro 2023.

REIS, V.R.; ALMEIDA, F.L. Effect of 17β -oestradiol on the sex ratio of tambaqui, *Colossoma macropomum*, **Aquaculture Research**, v.50, p.154-161, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.13878>.

SUSSEL, F. R. Lambaricultura, consolidando-se na aquicultura brasileira. *Aquaculture Brasil*, 2018. Disponível em: <<https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/234/lambaricultura,-consolidando-se-na-aquicultura-brasileira>>. Acesso em: 15 setembro 2023.

THANASUPSIN, S.P.; CHHEANG, L.; MATH, C. Ecological risk of 17α -methyltestosterone contaminated water discharged from a full water recirculating earthen masculinization pond. **Human and Ecological Risk Assessment**, v.27, p.1696-714, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10807039.2021.1871845>.

WANG, J.; ZHOU, J.; YANG, Q.; WANG, W.; LIU, Q.; LIU, W.; LIU, S. Effects of 17α -methyltestosterone on the transcriptome, gonadal histology and sex steroid hormones in *Pseudorasbora parva*. **Theriogenology**, v.155, p.88-97, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.035>.

WEISS, L.A.; JÚNIOR, J.J.; DE OLIVEIRA NUÑER, A.P. Identification of neomales in South American catfish *Rhamdia quelen* on the basis of the sex ratio in the progeny. **Animal Reproduction**, v.14, p.1285-92, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR0031>.

WEISS, L.A.; BERNARDES-JÚNIOR, J.J.; MACHADO, C.; DE-OLIVEIRA-NUÑER, A.P. Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17α -methyltestosterone. **Revista Colombiana**

5- Considerações finais

Utilizando o gene Citocromo oxidase I, identificou-se que a espécie de lambari do rabo amarelo proveniente do reservatório de Moxotó (Paulo Afonso, Bahia) no submédio São Francisco, é a *Astyanax lacustris* e que esse grupo se diferencia molecularmente do grupo de *A. lacustris* da bacia do Rio Paraná.

A correta identificação a nível de espécie é crucial para direcionar e guiar a gestão e conservação dessas populações. A estreita proximidade entre os indivíduos do gênero *Astyanax* permite a realização de cruzamentos viáveis e a formação de híbridos, contudo, existe o risco de que essa mistura comprometa a integridade genética de ambas ou alguma dessas espécies. Portanto, é fundamental evitar a introdução de exemplares provenientes da bacia do rio Paraná na bacia do rio São Francisco, e vice-versa, a fim de preservar a diversidade genética única de cada população original.

Para os tratamentos de reversão sexual utilizando 17 α -metiltestosterona, foi observado que o tempo e a dose ideal de oferta de MT para larvas de *A. lacustris* é de 30 dias na dose de 10 mg de MT/kg de ração. Dessa forma sendo possível produzir 83,3% de machos.

As análises de anormalidades no micronúcleo e alterações do núcleo do eritrócito, mostraram que mesmo no uso de doses altas 20 a 60 mg de 17 α -metiltestosterona /kg de ração durante 30 dias, não foram capazes de causar danos genéticos significativos aos animais avaliados. Dessa forma, podemos inferir que doses menores do que as avaliadas (20 – 60 mg/kg), como é o caso da sugerida no terceiro artigo (10 mg/kg), também não serão capazes de provocar danos genéticos nesses animais, além de ser mais ambientalmente amigável.

Os resultados indicam a possibilidade de que doses menores que 10 mg/kg ofertadas durante 30 dias, sejam capazes de produzir uma prole 100% masculina. Além disso, estudos avaliando métodos de diferenciação entre machos naturais e neomachos, além da viabilidade reprodutiva desses neomachos ainda estão em desenvolvimento.

6- Referências

ABIMORAD, E.G.; CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari-do-rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, p.31-38, 2011.

ABREU, M.R.; SILVA, L.M.; FIGUEIREDO-ARIKI, D.G.; SATO, R.T.; KURADOMI, R.Y.; BATLOUNI, S.R. Reproductive performance of lambari (*Astyanax altiparanae*) in a seminatural system using different protocols. **Aquaculture Research**, v.52, p.471-83, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.14905>.

ADAMOV, N.S.D.M; NASCIMENTO, N.F.D; MACIEL, E.C.S; PEREIRA-SANTOS, M; SENHORINI, J.A; CALADO, L.L; EVANGELISTA, M.M; NAKAGHI, L.S.O; GUERRERO, A.H.M; FUJIMOTO, T; YASUI, G.S. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of World Aquaculture Society**, v.48, p.741-750, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jwas.12390>.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; VERÍSSIMO, S.; OKADA, E.K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.14, p.11-19, 2004.

AKAISHI, F.M; SILVA DE ASSIS, H.C; JAKOBI, S.C.G; EIRAS-STOFELLA, D.R; ST-JEAN, S.D; COURTENAY, S.C; LIMA, E.F; WAGENER, A.L.R; SCOFIELD, A.L. OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v.46, p.244-253, 2004.

AMARAL JUNIOR, H.; NUNES, M.F.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**. v.12, p.1-7, 2008.

ARIKI, D.G.; DE ABREU, M.R.; DE JESUS SILVA, L.M.; SATO, R.T.; BATLOUNI, S.R. Attempts for increasing *Astyanax altiparanae* spawning rates and percentage of responsive oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 254, p.107262, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107262>.

BALDISSEROTTO, B; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, 3ª edição. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2020.

BARBIERI, G.; SANTOS, M.V.R.; SANTOS, J.M. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1057-65, 1982.

BEM, J.C. Desenvolvimento gonadal inicial e reversão sexual em *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI, CHARACIDAE). 2009. 97p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Rio Claro, SP.

BEM, J.C.; FONTANETTI, C.S.; SENHORINI, J.A.; PARISE-MALTEMPI, P.P. Effectiveness of Estradiol Valerate on Sex Reversion in *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p.283-290, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000200015>.

CARNEIRO-LEITE, L.; BASHIYO-SILVA, C.; OLIVEIRA, Y.A.; BORGES, L.P.; SANCHEZ, M.P.; SILVA, L.G.; LOBATO, S.I.; RODRIGUES-LISONI, F.C.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Seminal characteristics and sensitivity of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) sperm to cryoprotective solutions based on dimethylsulfoxide and methylglycol. **Neotropical Ichthyology**, v.18, p. e200039, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0039>.

CESAR, M.P.; MURGAS, L.D.S.; ARAÚJO, R.V.; DRUMMOND, C.D. **Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura**. Lavras: Editora UFLA, 2004. 27p.

COLLEN, B.; WHITTON, F.; DYER, E.E.; BAILLIE, J.E.M.; CUMBERLIDGE, N.; DARWALL, W.R.T.; POLLOCK, C.; RICHMAN, N.I.; SOULSBY, A.M.; BÖHM, M. Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism: Global freshwater species congruence. **Global Ecology and Biogeography**, v.23, p.40-51, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/geb.12096>.

DUNHAM, R.A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology**, Genetic Approaches, 3rd Edition. Cambridge: CABI, 2023. 372p.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.; ANDRADE, E.S.; LÓPEZ, P.A.; FREITAS, R.T.; FERREIRA, M.R. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, v.77, p.1570-4, 2012. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.025.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B.A.; VALENTI, W.C. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v.25, p.316-30, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1320647>.

FONSECA, T.; VALENTI, W.C.; GIANNETTI, B.F.; GONÇALVES, F.H.; AGOSTINHO, F. Environmental accounting of the yellow-tail lambari aquaculture: sustainability of rural freshwater pond systems. **Sustainability**, v.14, p.2090, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/su14042090>.

FORESTI., 2001. Panorama da aquicultura. Cultivo do Lambari: Uma especie de pequeno porte e grandes responsabilidades. Brasil, 2001. Disponível em: < [FURUYA, W.M.; MICHELATO, M.; SALARO, A.L.; DA CRUZ, T.P.; BARRIVIERA-FURUYA, V.R. Estimation of the dietary essential amino acid requirements of colliroja *Astyanax fasciatus* by using the ideal protein concept. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v.43, p.888-94, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-8>.](https://panoramadaaquicultura.com.br/cultivo-do-lambari/#:~:text=Esp%C3%A9cies%20nativas%20de%20peixes%20como,) %2C%20a%20carpa%2Dcomum%20(> . Acesso em: 15 de setembro de 2023.</p>
</div>
<div data-bbox=)

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: UNESP, 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A.; Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Ser Zool**, v.13, p.65–88, 2000.

HAYASHI, C.F.; MEURER, W.R.; BOSCOLO, L.C.; KAVATA, B.; LACERDA, C.H.F. Níveis de arraçamento para alevinos de lambari (*Astyanax bimaculatus*). In: Congresso da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais**. 2002.

HULME, P.E. Rough waters for native Chinese fish. **Science**, v.347, p.484-484, 2015. DOI:

IBGE. Produção da pecuária municipal. Tabelas Produção de aquicultura, por tipo de produto. 2013 – 2023. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas>>. Acesso em: 06 de dezembro de 2023.

JATOBÁ, A.; SILVA, B.C. Stocking density in the juvenile production of two characins species in a recirculating system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.1469-74, 2015.

JOHNSTONE, R.; MACINTOSH, D.J.; WRIGHT, R.S. Elimination of orally administered 17α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. **Aquaculture**, v.35, p.249-257, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90095-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90095-9).

JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; HLIWA, P.; CIERESZKO, A. Characteristics and cryopreservation of semen of sex-reversed females of Salmonid fish. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, p.964, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22020964>.

KUBITZA, F. Produção de pescado no mundo e a aquicultura. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.17, p.14-23, 2007.

LOPES, M.C.; SILVA, N.J.; HENRIQUE, M.B. Custos e viabilidade econômica da produção de alevinos de lambaris reproduzidos artificialmente. **Informações Econômicas**, v.44, p.60-8, 2014.

LUCENA, C.A.; SOARES, H.G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v.4072, p.101-125, 2016.

MARQUES, A.M.; BOARATTI, A.Z.; BELMUDES, D.; FERREIRA, J.R.; MANTOAN, P.V.; MORAES-VALENTI, P.; VALENTI, W.C. Improving the efficiency of lambari production and diet assimilation using integrated aquaculture with benthic species. **Sustainability**. V.13, p.10196, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/su131810196>.

NASCIMENTO, N.F.; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L.H.; MANZINI, B.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J.A.; YASUI, G.S.; NAKAGHI, L.S. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture**, v.471, p.163-71, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.007>.

NASCIMENTO, N.F.; MONZANI, P.S.; PEREIRA-SANTOS, M.; NIEDZIELSKI, D.; SENHORINI, J.A.; SILVA, L.A.; NAKAGHI, L.S.O.; YASUI, G.S. The first case of induced gynogenesis in Neotropical fishes using the yellowtail tetra (*Astyanax altiparanae*) as a model organism. **Aquaculture**, v.514, p.1-7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734432>.

NAVARRO, R.D.; RIBEIRO FILHO, O.P.; DA SILVA FORTES, R.; CALADO, L.L.; SIQUEIRA SILVA, C.; PEREIRA REZENDE, F.; SANTOS, L.C. Influência do sexo no desempenho de lambari prata (*Astyanax scabripinnis*, Jenyns, 1842). **Zootecnia Tropical**, v. 21, n. 4, p. 359-369, 2003.

NAVARRO, R. D.; SILVA, R.F.; FILHO, O.P.R.; CALADO, L.L.; REZENDE, F.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, L.C. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. **Zootecnia Tropical**, v.24, p.165-176, 2006.

PADAO, E. Differenziazione e inversione sessuale (feminizzazione) di avanottidi Trota (*Salmo irideus*) trattati con ormone follicolare. **Monit. Zool. Ital.**, v.48, p.195-203, 1937.

PANDIAN, T.J.; SHEELA, S.G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v.138, p.1-22, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01075-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01075-0).

PASCHOALINI, A.L.; SAVASSI, L.A.; WEBER, A.A.; MOREIRA, D.P.; RIBEIRO, Y.M.; RIZZO, E. e BAZZOLI, N. Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.47, p.797-810, 2021. DOI: [10.1007/s10695-021-00938-5](https://doi.org/10.1007/s10695-021-00938-5).

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229-281, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0).

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; ALMEIDA, R.B.C. Cultivo do lambari: uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, v.11, p.15-19, 2001.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSERTO, B., GOMES, L.C. (eds.), Espécies nativas para piscicultura no Brasil. UFSM, Santa Maria, p.105-120, 2005.

POVH, J.A.; DE OLIVEIRA, C.A.L.; RIBEIRO, R.P.; SHIOTSUKI, L.; TEIXEIRA, S.A.; FORNARI, D.C.; CORRÊA FILHO, R.A.C. Perspectivas para o melhoramento genético de peixes nativos. Congresso Brasileiro de Zootecnia, Manaus, AM, 2022.

REIS, V.R.; ALMEIDA, F.L. Effect of 17β -oestradiol on the sex ratio of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Research**, v.50, p.154-61, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.13878>.

REIS, V.R.; ALMEIDA, F.L.; PIFERRER, F. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.1, p.22-28, 2016.

SABBAG, O.J.; TAKAHASHI, L.S.; SILVEIRA, A.N.; ARANHA, A.S. Costs and economic viability of production of the Lambari Tetra in Monte Castelo, São Paulo State: a case study. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, p.307-15, 2011.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5, p.1-9, 2017. DOI: 10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9.

SALARO, A.L.; CAMPELO, D.A.V.; PONTES, M.D.; ZUANON, J.A.S.; FURUYA, V.R.B.; FURUYA, W.M. Avanços na nutrição e produção de lambaris. In: Aquicultura no Brasil: novas perspectivas (DIAS, M.T. e MARIANO, W.S. Org.) vol. II, São Carlos, SP, Brazil: Editora Pedro & João Editores, p.491-501, 2015.

SANTOS, M.P.; DO NASCIMENTO, N.F.; YASUI, G.S.; PEREIRA, N.L.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J.A.; NAKAGHI, L.S.; Short-term storage of the oocytes affects the ploidy status in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Zygote**, v. 26, p.89-98, 2018. DOI: 10.1017/S0967199417000739.

SCHULZ, U.H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 615-622, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842001000400010>.

SILVA, D.A.; PESSOA, E.K.R.; COSTA, S.A.G.L.; CHELLAPPA, N.T.; CHELLAPPA, S. Ecologia alimentar de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assu, Rio Grande do Norte, Brasil. **Biota Amazônia**, v.2, p.74-82, 2012.

SILVA, J.; BRAMBILA-SOUZA, G.; DE MAGALHÃES ARAUJO, D.; MOREIRA, R.G. Effects of vitamin A supplementation on ovarian development of *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) during the non-breeding season. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.265, p.111-132, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111132>.

SILVA, R.C.; BRITTO, D.M., SANTOS, C.A.; GIORDANI, S.C.; PEDREIRA, M.M. Sexual differentiation and sex reversal in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by hormone 17 α methyltestosterone similar to that used in cultivation systems. **Aquaculture**, v.574, p.739624, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739624>.

SUSSEL, F.R.; VIEGAS, E.M.; EVANGELISTA, M.M.; GONÇALVES, G.S.; SALLES, F.A.; GONÇALVES, L.U. Replacement of animal protein with vegetable protein in the diets of *Astyanax altiparanae*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.36, p.343-8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v36i4.23>.

TOLEDO-FILHO, S.A.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Biotecnologia genética aplicada a Piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética** nº 3. São Paulo: Departamento de Biologia-CCS/USP, 1996. 60p.

VALENTI, W.C.; BARROS, H.P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G.W.; CAVALLI, R.O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v.19, p.100611, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>.

VILELA, C.; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus*; (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.23, p.491-496, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v23i0.2706>.

YASUI, G.S.; SENHORINI, J.A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L.S.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L.A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v.9, p.464-70, 2015. DOI: 10.1017/S1751731114002511.

WEISS, L.A.; BERNARDES-JÚNIOR, J.J.; MACHADO, C.; DE-OLIVEIRA-NUÑER, A.P. Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17 α -methyltestosterone. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.31, p.304-14, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n4a07>.

ANEXO I

Identificação das sequências de COI utilizadas no capítulo 1.

Espécie	Latitude	Longitude	Estado	BOLD	Genbank
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.325	-44.766	MG	BAST477-12	KY268271
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.217	-44.804	MG	BAST468-12	KY268255
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.217	-44.804	MG	BAST467-12	KY268254
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,148	-43,826	MG	BAST571-12	KY268236
<i>Astyanax lacustris</i>	-15,323	-43,665	MG	BAST287-12	KY268234
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,148	-43,826	MG	BAST570-12	KY268223
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,289	-44,786	MG	BAST501-12	KY268155
<i>Astyanax lacustris</i>	-9.925	-37.123	BA	BAST1154-13	KY268117
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.325	-44.766	MG	BAST474-12	KY268105
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,448	-44,021	MG	BAST496-12	KY268012
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.325	-44.766	MG	BAST476-12	KY267997
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,289	-44,786	MG	BAST502-12	KY267985
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,226	-44,808	MG	BAST470-12	KY267931
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,448	-44,021	MG	BAST497-12	KY267899
<i>Astyanax lacustris</i>	-18,721	-44,346	MG	BAST363-12	KY267864
<i>Astyanax lacustris</i>	-19,626	-44,489	MG	BAST360-12	KY267863
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.35	-44,952	MG	BAST507-12	KY267816
<i>Astyanax lacustris</i>	-15,323	-43,665	MG	BAST289-12	KY267780
<i>Astyanax lacustris</i>	-10.149	-36.959	SE	BAST1148-13	KY267711
<i>Astyanax lacustris</i>	-15,511	-47,044	GO	BAST1426-13	KY267623
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,326	-44,767	MG	BAST506-12	KY267608
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,222	-46,418	MG	BAST575-12	KY267561
<i>Astyanax lacustris</i>	-15,511	-47,044	GO	BAST1424-13	KY267549
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.35	-44,952	MG	BAST508-12	KY267506
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,326	-44,767	MG	BAST505-12	KY267445
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,448	-44,021	MG	BAST498-12	KY267369
<i>Astyanax lacustris</i>	-18,721	-44,346	MG	BAST364-12	KY267351
<i>Astyanax lacustris</i>	-19,626	-44,489	MG	BAST357-12	KY267350
<i>Astyanax lacustris</i>	-19,626	-44,489	MG	BAST359-12	KY267317
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,222	-46,418	MG	BAST512-12	KY267273
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,289	-44,786	MG	BAST500-12	KY267265
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,222	-46,418	MG	BAST513-12	KY267146
<i>Astyanax lacustris</i>	-17.96	-45,704	MG	BAST280-12	KY267135
<i>Astyanax lacustris</i>	-15,511	-47,044	GO	BAST1425-13	KY267058
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,222	-46,418	MG	BAST511-12	KY267044
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,217	-44,804	MG	BAST466-12	KY266987
<i>Astyanax lacustris</i>	-15,323	-43,665	MG	BAST286-12	KY266983
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,763	-48,262	SP	BAST091-12	KY267018

<i>Astyanax lacustris</i>	-23,555	-46,041	SP	BAST386-12	KY267052
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,044	-53,727	MS	BAST415-12	KY267165
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,635	-52,822	PR	BAST410-12	KY267181
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,898	-48,389	SP	BAST1122-13	KY267190
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,766	-53,258	PR	BAST072-12	KY267253
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,378	-47,427	SP	BAST333-12	KY267274
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,024	-48,828	SP	BAST154-12	KY267276
<i>Astyanax lacustris</i>	-21,897	-53.79	MS	BAST454-12	KY267319
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,675	-52,119	PR	BAST267-12	KY267324
<i>Astyanax lacustris</i>	-20,236	-48,678	SP	BAST179-12	KY267344
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,233	-53,784	MS	BAST441-12	KY267365
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,555	-46,041	SP	BAST387-12	KY267384
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,518	-45,894	SP	BAST083-12	KY267391
<i>Astyanax lacustris</i>	-11,524	-54,355	SP	BAST165-12	KY267436
<i>Astyanax lacustris</i>	-21,897	-53.79	MS	BAST455-12	KY267439
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,635	-52,822	PR	BAST411-12	KY267461
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,647	-53.077	PR	BAST235-12	KY267570
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,647	-53.077	PR	BAST236-12	KY267587
<i>Astyanax lacustris</i>	-11.5246	-54.3552	SP	BAST166-12	KY267652
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,378	-47.427	SP	BAST334-12	KY267769
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,518	-45,894	SP	BAST084-12	KY267820
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.044	-53.727	MS	BAST416-12	KY267834
<i>Astyanax lacustris</i>	-21,897	-53.79	MS	BAST457-12	KY267845
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,675	-52.119	PR	BAST266-12	KY267919
<i>Astyanax lacustris</i>	-21.184	-49.123	SP	BAST239-12	KY267929
<i>Astyanax lacustris</i>	-17,887	-47,669	GO	BAST895-13	KY267979
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.763	-48,262	SP	BAST092-12	KY267988
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,647	-53,077	PR	BAST237-12	KY268007
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,635	-52.822	PR	BAST408-12	KY268022
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,024	-48,828	SP	BAST652-13	KY268043
<i>Astyanax lacustris</i>	-21,184	-49,123	SP	BAST240-12	KY268058
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,518	-45,894	SP	BAST085-12	KY268087
<i>Astyanax lacustris</i>	-11.52	-54.35	SP	BAST180-12	KY268092
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,518	-45,894	SP	BAST082-12	KY268173
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,378	-47.427	SP	BAST335-12	KY268179
<i>Astyanax lacustris</i>	-23,555	-46,041	SP	BAST385-12	KY268249
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,378	-47.427	SP	BAST332-12	KY268252
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,372	-53,523	MS	BAST443-12	KY268279
<i>Astyanax lacustris</i>	-22,044	-53.727	MS	LBPV-44959	KY268287
<i>Astyanax lacustris</i>	-23.134	-49.676	PR	FUPR1136-10	JN988697
<i>Astyanax lacustris</i>	-23.134	-49.676	PR	FUPR1135-10	JN988698
<i>Astyanax lacustris</i>	-23.134	-49.676	PR	FUPR1134-10	JN988699
<i>Astyanax lacustris</i>	-23.413	-49.571	PR	FUPR1133-10	JN988700

<i>Astyanax lacustris</i>	-23.096	-48.251	MS	FUPR1132-10	JN988701
<i>Astyanax lacustris</i>	-21.013	-49.690	MS	FUPR1131-10	JN988702
<i>Astyanax lacustris</i>	-21.013	-49.690	SP	FUPR1130-10	JN988703
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.828	-48.371	SP	FUPR1129-10	JN988704
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.828	-48.371	MG	FUPR1051-10	JN988705
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.673	-53.086	MG	FUPR1050-10	JN988706
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.673	-53.086	MG	FUPR1049-10	JN988707
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.673	-53.086	MG	FUPR1048-10	JN988708
<i>Astyanax lacustris</i>	-21.378	-47.659	MG	FUPR1047-10	JN988709
<i>Astyanax lacustris</i>	-21.378	-47.659	SP	FUPR1046-10	JN988710
<i>Astyanax lacustris</i>	-22.791	-53.349	SP	FUPR1042-10	JN988714
<i>Astyanax lacustris</i>	-21.927	-47.368	SP	FUPR1036-10	JN988749
<i>Astyanax lacustris</i>	-23.333	-48.567	PR	FUPR1037-10	JN988696
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,643	-35,117	PB	BAST1369-13	KY267465
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,643	-35,117	PB	BAST1370-13	KY267210
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,416	-35,126	RN	BAST1371-13	KY267592
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,416	-35,126	RN	BAST1372-13	KY267193
<i>Astyanax lacustris</i>	-7,464	-34,978	PB	BAST1373-13	KY268125
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,104	-35,191	RN	BAST1383-13	KY267266
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,104	-35,191	RN	BAST1384-13	KY267115
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,104	-35,191	RN	BAST1385-13	KY267075
<i>Astyanax lacustris</i>	-6,104	-35,191	RN	BAST1386-13	KY268217